

***Cis-* und *trans*-Regulation bei *Drosophila* T-Box Genen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Christian Dorner
geboren am 20.04.1977
in Neumarkt i. d. OPf

Mainz, im Januar.2008

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I-A Genregulation	1
I-A-1 T-Box Gene bei <i>Drosophila</i>	2
I-A-2 Das Gen <i>optomotor-blind</i> (<i>omb</i>)	4
I-A-2.1 Die Insertion <i>omb</i> [P6]	8
I-A-2.2 Die Insertion <i>Quadroon</i> [For].....	9
I-A-2.3 Mutationen in der <i>Omb</i> T-Domäne	9
I-A-2.3.1 ATCUN Bindestelle in <i>Omb</i>	9
I-A-2.3.2 <i>C. elegans</i> <i>Tbx2</i> und olfaktorische Adaption.....	10
I-A-2.3.3 OMB DNA Bindestelle	11
I-A-2.3.4 <i>omb</i> -WRE.....	11
I-A-3 Enhancer-reporter-Konstrukte	12
I-B Das Protein <i>Org-1</i> (<i>Optomotor-blind related gene-1</i>).....	13
I-B.1 Polyglutamin Trakte und deren Expansion.....	16
I-B.2 Polyalanin Trakte und deren Expansion	16
I-C <i>Decapentaplegic</i> (<i>Dpp</i>).....	18
I-D Sammlungen von <i>Drosophila</i> Deletionslinien.....	20
I-E Ziel dieser Arbeit.....	22
II. Material & Methoden	24
II-1. Verwendetes Material	24
II-1.1 Fliegenstämme	24
II-1.2 Laborgeräte.....	25
II-1.3 Chemikalien und sonstiges Verbrauchsmaterial	26
II-1.4 Medien und Lösungen.....	27
II-1.5 Enzyme.....	29
II-1.6 Kits	30
II-1.7 Sonstige Materialien:.....	30
II-1.8 Benutzte Vektoren:.....	30
II-1.9 Primer und andere Oligonukleotide	31
II-1.10 Software und Datenbanken	31
II-2. Verwendete Methoden	32
II-2.1 Histologische Methoden.....	32
II-2.1.1 Präparation der Imaginalscheiben aus L3 Larven	32
II-2.1.2 X-GAL Färbungen	32
II-2.1.3 Injektion von P-Elementvektoren in <i>Drosophila</i> -Embryonen.....	33

II-2.1.4 In situ Hybridisierung.....	34
II-2.2 Molekulare Methoden	35
II-2.2.1 Restriktionsverdau.....	35
II-2.2.2 Dephosphorylierung und Phosphorylierung.....	35
II-2.2.3 Ligationsreaktion.....	36
II-2.2.4 Transformation in chemokompetente Bakterienzellen	37
II-2.2.5 Herstellen chemokompetenter Bakterien	37
II-2.2.6 Annealing von Oligonukleotiden	38
II-2.2.7 Gelelektrophorese.....	38
II-2.2.8 Plasmidpräparation.....	39
II-2.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
II-2.2.9.1 Standard PCR	40
II-2.2.9.2 Long Range PCR.....	40
II-2.2.9.3 Kolonie-PCR zum Überprüfen einer Vielzahl von <i>E.coli</i> Klonen.....	41
II-2.2.9.4 Inverse PCR zum Bestimmen des Insertionsortes von P-Elementen.....	41
II-2.2.10 Universal Fast Walking (UFW)	42
II-2.2.11 Sequenzierung	42
II-2.2.12 DNA-Präparation aus adulten Fliegen oder Larven.....	42
II-2.2.13 Phenol-Chloroform Extraktion.....	42
II-2.2.14 Ethanol Fällung	43
II-2.2.15 Isolierung mit QIAGEN genomic Tip 100G.....	43
II-2.2.16 Isolierung der DNA aus einzelnen Larven oder Fliegen.....	43
II-2.2.17 Zielgerichtete Erzeugung von (Punkt)Mutationen in Plasmiden	44
II-2.2.18 Anhängen von A-Überhängen an PCR-Produkte (A-Tailing)	44
II-2.2.19 Herstellen eines linearen Vektors mit T-Überhängen (T-Tailing).....	45
II-2.2.20 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden für Southern Blots.....	45
II-2.2.21 Southern Blots und Autoradiographie.....	46
III. Ergebnisse.....	47
III-A <i>omb</i> und Omb.....	47
III-A-1 Untersuchungen zur Regulation von <i>omb</i> :	47
III-A-1.1 Das <i>omb</i> upstream-deletion Projekt.....	47
III-A-1.2 Enhancer-reporter Konstrukte	51
III-A-1.3 Charakterisierung einer Omb Nullmutante nach Mobilisierung von Omb[P6].....	52
III-A-1.4 Molekulare Charakterisierung des transposablen Elementes Qd[For]	55
III-A-1.5 Molekulare Charakterisierung von In(1) <i>ombH31</i>	59
III-A-1.6 <i>omb</i> -WRE	61

III-A-2 Mutationen in Omb.....	62
III-A-2.1 Mutationen in der Omb T-Domäne: K431E, K431R und K431G.....	62
III-A-2.2 Mutagenese der potentiellen ATCUN Bindestelle: Omb[H454A].....	64
III-A-2.3 Mutation in der DNA-Bindedomäne: Omb[A504V].....	65
III-B Konstruktion der Dpp-GFP Fusionskonstrukte.....	66
III-B-1Herstellen und Subklonieren der einzelnen Bestandteile.....	67
III-B-2 Mehr-Komponenten Ligation und Einfügen der GFP Sequenz.....	69
III-B-3 Herstellen der Endkonstrukte.....	70
III-C Polyalanin- und Polyglutaminexpansionen in Org-1	72
III-C-1 Erstellen eines für alle geplanten Konstrukte geeigneten Basisvektors.....	72
III-C-2 Herstellen des 158bp Oligomerkonstruktes zur Insertion in pBluescript SK ⁻	75
III-C-3 Vorbereitung des Org1 C-terminalen glutaminreichen Traktes zum Austausch. 76	
III-C-4 Einführen einer MluI Schnittstelle in den C-Terminus zur späteren Manipulation des Alanin-reichen Traktes.....	78
III-C-5 Deletieren der ORG1- eigenen glutaminreichen Region	81
III-C-6 Deletieren der ORG1-eigenen alaninreichen Region.....	82
III-C-7 Herstellen eines Zwischenvektors zur Subklonierung der für Glutaminhomopolymere kodierenden Oligomere.....	83
III-C-8a Herstellen eines Zwischenvektors zur Subklonierung der für Homopolyalanin kodierenden Oligomere	84
III-C-8b Herstellen eines pAc5.1/V5-His-A Derivats zur Subklonierung der Homoalaninpolymere	85
III-C-9 Herstellen und Klonieren von Glutamin-Homopolymertrakten verschiedener Länge.....	87
III-C-10 Herstellen von Alanin-Homopolymertrakten verschiedener Länge	89
III-C-11 Zusammenfassung der Ergebnisse:.....	90
III-D Arbeiten am DROSDEL Projekt.....	93
IV. DISKUSSION	99
IV-A-1 Untersuchungen zur Regulation von <i>omb</i> :	99
IV-A-1.1 Das Omb URR Deletion Projekt	99
IV-A-1.2 Enhancer-reporter Konstrukte	99
IV-A-1.3 Charakterisierung einer vollständigen Omb Nullmutante nach Mobilisierung von <i>omb</i> [P6]	100
IV-A-1.4 Charakterisierung der Insertion Qd[For]	100
IV-A-1.5 Genaue Kartierung von <i>In(1)ombH31</i>	101
IV-A-1.6 <i>omb</i> -WRE	102
IV-A-2 Erzeugung verschiedener Mutationen in der Omb T-Domäne.....	102
IV-B Erstellen von Dpp-GFP-Fusionskonstrukten	104
IV-C Polyglutamin und Polyalanin Expansionen in Org-1	105

IV-D Mitarbeit am DROSDEL Projekt.....	107
Zusammenfassung	110
V. Literaturverzeichnis	111
VI. Anhang	119
VI.1 Anhang zu Teil C: Historische Abfolge alternativer Versuche der Klonierungsstrategie zur Erstellung der Polyalanin und Polyglutamin Konstrukte.....	119
VI.1.1 Erstellen eines Polyglutaminakzeptorvektors aus pDrive-Selbstligat	119
VI.1.2 Erstellen eines T-Tail Zwischenvektors zur Subklonierung der Homoglutaminpolymere.....	120
VI.1.3 Erstellen eines pSK-DraIII Derivates zur erfolgreichen Subklonierung der Glutaminhomopolymere.....	122
VI.1.4 Adaptorbasiertes Subklonieren der Glutaminpolymere	124
VI.1.5 A/T basierte Subklonierung der Polyglutaminhomomere.....	125
VI.1.6 Adaptorbasiertes Subklonieren der Homopolyalanin kodierenden Oligos.....	125
VI.2 Montage der Einzelsequenzen über die Deletion der URR bei der Linie A2	127
VI.3 Liste der verwendeten Oligos	128
VI.4 Original-Sequenzen:.....	135
VI.4.1 Übersicht über die Original-Sequenzen des upstream deletion Projekts	135
VI.4.1 Übersicht Original-Sequenzen der Mutagenese-Experimente in <i>omb</i> und WRE136	
VI.4.2 Übersicht Original-Sequenzen der Analyse von Qd[For].....	137
VI.4.3 Übersicht Original-Sequenzen der Dpp-GFP-Fusionskonstrukte.....	138
VI.5 Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
VI.6 Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM DER TBX GENE (PORSCH ET AL., 1998). DIE DROSOPHILA VARIANTEN SIND HERVORGEHOVEN. DIE ABBILDUNG UMFASST NICHT ALLE ACHT *DROSOPHILA MELANOGASTER*-TBX GENE. 3

ABBILDUNG 2: WILDTPISCHE EXPRESSION (A) UND OMB ÜBEREXPRESSION GETRIEBEN DURCH *DPP*-GAL4 (B). DER VERLUST DES AUGES IST ZU SEHEN (AUS PORSCH ET AL., 2004). 5

ABBILDUNG 3: DIE GRAPHIK ZEIGT EINE SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ÜBER DEN OMB LOKUS. ENTGEGEN DER URSPRÜNGLICHEN VERÖFFENTLICHUNG (PFLUGFELDER AND HEISENBERG, 1995) WURDE DIE NUMMERIERUNG DER BASEN VERÄNDERT. POSITION EINS BEZIEHT SICH NUN NICHT MEHR AUF DEN DISTALEN BRUCHPUNKT VON *In(1)OMBH31*, SONDERN AUF DEN START DER TRANSKRIPTIONSEINHEIT. DIE TRANSKRIPTIONSEINHEIT IST IN VIOLETT ZU SEHEN. DIE INTRON-EXON STRUKTUR DES TRANSKRIPTES IST DARUNTER ANGEGEBEN. BOXEN STEHEN FÜR DIE EXONS, LINIEN FÜR DIE INTRONS. IN HELLBLAU IST DIE OLR GEZEIGT, DIE SICH BIS NAHE AN *CG3556* ERSTRECKT. DIE ZUGEHÖRIGKEIT DIESER REGION MUSS NOCH GEKLÄRT WERDEN. ÄHNLICH VERHÄLT ES SICH MIT DER *URR*, DIE DUNKELBLAU EINGETRAGEN IST. DER BEREITS GEFUNDENE FLÜGELHANCER (*SIVASANKARAN ET AL., 2000*) IST AN ENTSPRECHENDER STELLE EINGETRAGEN. DIE P-ELEMENTE P2 UND P3 SIND ALS SCHWARZE DREIECKE EINGEZEICHNET. 7

ABBILDUNG 4: INSERTIONSORT DES P-ELEMENTES P6 IM OMB LOKUS. DURCH DIE NÄHE ZUR ALTERNATIVEN TRANSKRIPTIONSSTARTSTELLE UND ZU EINEM OBLIGATEN INTRON, BESTeht DURCH MOBILISIERUNG VON P[6] DIE CHANCE, EINE VOLLSTÄNDIGE OMB PROTEIN-NULLMUTANTE ZU ERSTELLEN. 9

ABBILDUNG 5: DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE ANALYSE DER OMB *URR* NACH *SIVASANKARAN (2000)*. DER FLÜGELHANCER WURDE IM cDNA FRAGMENT *POMB7* ENTDECKT. DAS FRAGMENT *POMB25* WURDE, WIE IN DER ABBILDUNG ZU SEHEN IST, NICHT BEARBEITET UND SOLL IN DIESER ARBEIT UNTERSUCHT WERDEN. ES EXISTIEREN EBENFALLS LÜCKEN AN MANCHEN STELLEN DURCH NICHT-ÜBERLAPPEN DER cDNA FRAGMENTE. AN ANDERER STELLE WURDEN WEITERE ENHANCER GEFUNDEN (AUGE UND BEIN), DIE HIER ABER NICHT VON WEITERER BEDEUTUNG SIND. 12

ABBILDUNG 6: WILDTPISCHE EXPRESSION (A), ÜBEREXPRESSION GETRIEBEN MIT *DPP*-GAL4 (B) UND *GMR* GAL4 (SPÄTERE ENTWICKLUNG; C). DAS FEHLEN DER BORSTEN ZWISCHEN DEN *OMMATIDIEN* IST IN C DEUTLICH ERKENNBAR (AUS PORSCH ET AL., 2004). 14

ABBILDUNG 7: AMINOSÄURESEQUENZ VON *ORG-1*. BLAU HERVORGEHOVEN IST DIE KONSERVIERTE T-DOMÄNE (70%). IN ROT SIND DIE *ORG-1* EIGENEN POLYGLUTAMIN- UND POLYALANINTRAKTE ZU SEHEN. BERÜCKSICHTIGT WURDEN IN DIESER DARSTELLUNG NUR WIEDERHOLUNGEN VON MINDESTENS FÜNF AMINOSÄUREN. IN VIOLETT SIND DIE KONSERVIERTEN LETZTEN AMINOSÄUREN DARGESTELLT. 15

ABBILDUNG 8: AMINOSÄURESEQUENZ VON *ORG-1*. BLAU IST, WIE IN ABBILDUNG DARÜBER DIE ZU 70% KONSERVIERTE T-DOMÄNE ANGEZEIGT. IM GEGENSATZ ZU OBIGER ABBILDUNG SIND HIER ABER ALLE GLUTAMINE UND ALANINE BERÜCKSICHTIGT, WAS DIE POLYMERTRAKTE ABER DENNOCH DEUTLICH ZU TAGE TRETEN LÄSST. 15

ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FERTIGEN *DPP*-GFP-FUSIONSPROTEINS. DIE IN BLAU EINGEZEICHNETE DOMÄNE WIRD IN VIVO ABGESPALTEN UND DIEN T WOHL NUR DER RICHTIGEN STRUKTURGEBUNG DES LIGANDEN, DER HIER SCHWARZ EINGEZEICHNET IST. MITTELS KÜNSTLICH EINGEFÜGTEN *SACII* SCHNITTSTELLEN WURDE DIE FÜR GFP KODIERENDE SEQUENZ KURZ HINTER DER *CLEAVAGE SITE* EINGEFÜGT. 19

ABBILDUNG 10: DIE ABBILDUNG ZEIGT EINE SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE GENOMISCHE REGION DER *OMB* *URR*. DIE BEIDEN INSERTIONEN SIND EINGETRAGEN. DER UNTERE TEIL ZEIGT DIE REGION NACH DER ERFOLGREICHEN MOBILISIERUNG DER BEIDEN P-ELEMENTE. 47

ABBILDUNG 11: ÜBERSICHT ÜBER DIE VOLLSTÄNDIGEN ERGEBNISSE DER CHARAKTERISIERUNG DER P[2]-P[3] DELETIONSLINIEN. IN DER SCHEMATISCHEN ÜBERSICHT DER GENOMISCHEN REGION SIND ALLE PCR-PRIMER ALS PFEILE EINGEZEICHNET. ALLE SONDEN SIND ALS SCHWARZE LINIEN MIT IHRER NUMMER ZU SEHEN. IN DER TABELLE DARUNTER FINDEN SICH DIE RESULTATE DER EXPERIMENTE. DA ALLE BLOT-EXPERIMENTE DOPELT AUSGEFÜHRT WURDEN, EINMAL MIT *HINDIII* VERDAUTER DNA UND EINMAL MIT *ECO*RI VERDAUTER DNA, GIBT ES FÜR JEDE HYBRIDISIERUNG ZWEI SPALTEN. H STEHT FÜR *HINDIII*, E FÜR *ECO*RI. EIN PLUS STEHT FÜR EINEN POSITIVEN BEFUND (D. H. DASS DAS FRAGMENT NOCH MINDESTENS TEILWEISE VORHANDEN IST). EIN MINUS STEHT FÜR EINEN NEGATIVEN BEFUND (D. H. DASS DAS FRAGMENT WAHRSCHENLICH NICHT MEHR EXISTIERT. IN MANCHEN FÄLLEN KONNTE AUFGRUND EINER SEHR SCHWACHEN FÄRBUNG DES RÖNTGENFILMS NICHT MIT ABSOLUTER SICHERHEIT GESAGT WERDEN, OB DAS FRAGMENT NOCH EXISTIERT, ODER OB MAN VON HINTERGRUND AUSZUGEHEN HAT. DIESE FÄLLE SIND MIT EINEM FRAGEZEICHEN MARKIERT. ROT UNTERLEGT SIND DIE LINIEN, DIE AUFGRUND WENIGER POSITIVER BEFUNDE AM GEEIGNETSTEN SCHIENEN, PER LONG RANGE PCR NÄHER ZU BETRACHTEN. RECHTS SIND BEISPIELHAFT FÜR ALLE AUTORADIOGRAMME ZWEI *HINDIII* BLOTS MIT DEN SONDEN 1 UND 3 ZU SEHEN. DIE LINIEN A2, A7, A11 UND A17 SIND MIT ROTEN PFEILEN GEKENNZEICHNET. DIE LINIE A33 IST NICHT AUF DIESEN BEISPIELHAFT GEZEIGTEN BLOTS AUFGETRAGEN. ANHAND DIESER DATEN ERFOLGTE DIE AUSWERTUNG. ALS KONTROLLE WURDEN DIE LINIEN Nr83 UND Nr26, DIE JEWEILS DIE INSERTION [P2] ODER P[3] TRAGEN BENUTZT. 49

ABBILDUNG 12: DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE VERSCHIEDENEN POMB-FRAGMENTE UND DEREN POSITION RELATIV ZUR *OMB* URR. DIE ROT UMRANDETEN BEREICHE WURDEN IN DIESER ARBEIT BEARBEITET. SIE SCHLIESSEN NOCH VORHANDENE LÜCKEN IN DER GESAMTANALYSE VON SIVASANKARAN ET AL. 2000 (VGL. ABBILDUNG IN EINLEITUNG). 51

ABBILDUNG 13: DIE ABBILDUNG ZEIGT DEN INSERTIONSORT DES P-ELEMENTES *OMB*P[6]. EXON 1B BEZEICHNET DEN ALTERNATIVEN STARTPUNKT DER TRANSKRIPTION NACH S. SCHARF (2002). DIE VERWENDETE SONDE UND DIE IM TEXT BESCHRIEBENEN PRIMER SIND EINGETRAGEN. 53

ABBILDUNG 14: DIE ABBILDUNG ZEIGT EINE ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER PCR UND BLOT-EXPERIMENTE. POTENTIELLE DELETIONSMUTANTEN SIND DIE LINIEN 783, 784, 785 UND 788. DIESE LINIEN ZEIGEN KEIN PCR PRODUKT AUF MINDESTENS DER DEN INSERTIONSORT PROXIMAL FLANKIERENDEN SEITE. DIE SOUTHERN BLOTS WURDEN MIT DNA AUS HETEROZYGOTEN FLIEGEN HERGESTELLT. DA MANCHE LINIEN ZUM ZEITPUNKT DES BLOT-EXPERIMENTES NICHT IN AUSREICHENDER MENGE VORHANDEN WAREN, FEHLEN IN DIESEN FÄLLEN DIE BLOT-DATEN. DIE PCR ERGEBNISSE SPRACHEN IN DIESEN FÄLLEN ABER GEGEN EINE DELETION, WESWEGEN DIE BLOTS NICHT NACHGEHOLT WURDEN. DA DIE GENOMISCHE SONDE XXI.4-5.25 E/E DEN INSERTIONSORT VON [P6] UMFASST, ZEUGEN ZUSÄTZLICHE BANDEN VON BRUCHPUNKTEN. IM BEREICH DER SONDE. 54

ABBILDUNG 15: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE BISHER ERLÄUTERTEN EXPERIMENTE UND DEREN ERGEBNISSE. ALLE PRIMER SIND ALS GRÜNE PFEILE IN IHRE LAUFRICHTUNG GEZEICHNET. DIE PCR-PRODUKTE SIND ALS GRÜNE LINIEN ZU SEHEN UND ENTWEDER MIT HAKEN (WENN ERFOLGREICH) ODER MIT KREUZ (WENN NICHT ERFOLGREICH) MARKIERT. ZUERST FAND EINE GROBE KARTIERUNG MIT DEN PCR REAKTIONEN 1-4 STATT, DANN EINE FEINKARTIERUNG MIT PCR 5 UND 6. DER ROTE PUNKT GIBT DEN SO VERMUTETEN INSERTIONSORT AN. BASEGENAUEN AUFSCHLUSS UND SEQUENZSTRUKTUR DER ENDEN DER INSERTION Qd[FOR] WURDE DURCH iPCR ERHALTEN. ALLE iPCR PRIMER SIND ZUSÄTZLICH MIT EINEM KASTEN IN DER FARBE IHRER ZUSAMMENGEHÖRIGKEIT UMFASST. DIE RESTRIKTIONSSTELLEN IM GENOMISCHEN BEREICH SIND DURCH ROTE STRICHE MARKIERT, DIE DEN NAMEN DES ENZYMS TRAGEN. DIE ZWEITE SCHNITTSTELLE LIEGT IMMER IRGENDWO IN DER INSERTION. . 56

ABBILDUNG 16: AUTORADIOGRAMM EINES SOUTHERNBLOTS, AUF DEM MIT VERSCHIEDENEN ENZYMEN VERDAUTE GENOMISCHE QD UND WT DNA NACH HYBRIDISIERUNG MIT EINER RADIOAKTIV MARKIERTEN SONDE (XIII.46 11,5 SAL/SAL) GEGENEINANDER VERGlichen WERDEN UM DIEJENIGEN FRAGMENTE ISOLIEREN ZU KÖNNEN, DIE EINEN TEIL DER INSERTION TRAGEN. IN DER ERSTEN SPUR JEDES PAARES IST IMMER DIE WT DNA AUFGETRAGEN, IN DER ZWEITEN DANN DIE ENTSPRECHENDE Qd DNA. ROT HERVORGEHOBEN SIND DIE SPUREN, BEI DENEN EINE GRÖßENZUNAHME EINES FRAGMENTES GEGENÜBER DER WT KONTROLLE ZU SEHEN IST. DIESE FRAGMENTE TRAGEN TEILE DES MOBILN ELEMENTES UND SOLLTEN ISOLIERT WERDEN. 57

ABBILDUNG 17: DIE GRAPHIK ZEIGT, WIE DAS EXPERIMENT FORTGEFÜHRT WURDE. DAS GEL WURDE IN DER MITTE NACH DER ELEKTROPHORESE GETEILT. TEIL I DES GELS, AUF DAS ANALYTISCHE MNGEN AN Qd[FOR] DNA AUFGETRAGEN WURDEN, WURDE ANSCHLIEßEND GEBLOTTET UND MIT DER SONDE XIII.46 11,5 SAL/SAL HYBRIDISIERT, UM DIE POSITION DER RICHTIGEN FRAGMENTE AUS DEM GENOMISCHEN VERDAU ERKENNEN ZU KÖNNEN. DIESE DATEN WURDEN VOM AUTORADIOGRAMM MAßSTABGERECHT AUF TEIL II DES GELS, DER DEN PRÄPARATIVEN VERDAU ENTHÄLT, ÜBERTRAGEN. DORT WURDEN AN ENTSPRECHENDER STELLE GELSTÜCKE AUSGESCHNITTEN UND DIE DARIN ENTHALTENE DNA ISOLIERT. 58

ABBILDUNG 18: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE MOLEKULARE KARTIERUNG DES BRUCHPUNKTES DER INVERSION IN(1)OMBH31. DIE GRÜNEN PFEILE STEHEN FÜR DIE VERWENDETEN PRIMER, DER HAKEN UNTER DEM ENTSPRECHENDEN REVERSE PRIMER ZEIGT DEN ERFOLG AUF H31 DNA AN. DARUNTER SIND DIE GRÖßEN ALLER PCR PRODUKTE ZU SEHEN, DIE AUF WT-DNA ERHALTEN WURDEN. DER ROTE PUNKT MARKIERT DIE ETWA 380BP GROßE REGION, IN DER DER BRUCHPUNKT LIEGEN MUß. 60

ABBILDUNG 19: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE INVERSE PCR, DIE BASEGENAUEN AUFSCHLUß ÜBER DEN INVERSIONSSTARTPUNKT H31 GEBEN SOLLTE. DIE GRÜNEN PFEILE ZEIGEN DIE PRIMER, VON DENEN 856 AUCH ZUM SEQUENZIEREN DES iPCR-PRODUKTES VORGESEHEN WAR. DIE RESTRIKTIONSSTELLEN DES ENZYMS HIN6I SIND EBENFALLS DARGESTELLT. EINE SCHNITTSTELLE LIEGT DEMNACH VOR DEM VERMUTETEN INVERSIONSSTART, DIE ZWEITE IRGENDWO INNERHALB DER INVERSION. DER ROTE PUNKT STELLT DEN BRUCHPUNKT DAR. 60

ABBILDUNG 20: PCR ERGEBNISSE DER ERSTEN EINGRENZUNG ZUR MOLEKULAREN LOKALISATION DER BRUCHSTELLE H31. DA DER MARKER AUF DEN BILDERN NUR SCHLECHT ZU SEHEN IST, WURDE DIE 1000BP BANDE DURCH DEN PFEILKOPF MIT WEIßER LINIE DARGESTELLT. DIE GRÖßEN ENTSPRECHEN BEI DER WT KONTROLLE (LINKES BILD) ALLE DEN ERWARTUNGEN. BEI H31 FUNKTIONIERTEN NUR DIE BEIDEN PCR REAKTIONEN EINS UND ZWEI. 61

ABBILDUNG 21: SEQUENZABGLEICH VON PKS[TCF1mut4A] MIT DER SEQUENZ DER MUTAGENISIERTEN VARIANTE PKS[TCF1mut4ABsrGI]. DIE ERFOLGREICH EINGEFÜHRTE MUTATION IST ROT HERVORGEHOBEN. 61

ABBILDUNG 22: DIE ABBILDUNG ZEIGT DEN ABGLEICH DER PROTEINSEQUENZ DES MUTIERTEN PLASMIDES pBAT7071[OMB431KtoE] GEGEN pBAT7071[WT]. DIE ERHALTENE MUTATION IST ROT HERVORGEHOBEN. DIE ORIGINALSEQUENZ FINDET SICH IM ANHANG. DIE ÜBERSETZUNG ERFOLGTE DURCH EXPASy, DAS ALIGNMENT MIT BLASTp. 62

ABBILDUNG 23: DIE ABBILDUNG ZEIGT DEN ABGLEICH DER SEQUENZ DES MUTIERTEN PLASMIDES pBAT7071[OMB431KtoG] GEGEN pBAT7071[WT]. DIE ERHALTENE MUTATION IST ROT HERVORGEHOBEN. DIE ORIGINALSEQUENZ FINDET SICH IM ANHANG. DIE ÜBERSETZUNG ERFOLGTE DURCH EXPASy, DAS ALIGNMENT MIT BLASTp. DIE SEQUENZUNTERSCHIEDE AM ENDE DER MUTANTENSEQUENZ BERUHEN WAHRSCHEINLICH AUF EINER SCHLECHTEN LESBARKEIT DER DNA SEQUENZ IN DIESEM BEREICH (S. ANHANG). 63

ABBILDUNG 24: DIE ABBILDUNG ZEIGT DEN ABGLEICH DER SEQUENZ DES MUTIERTEN PLASMIDES pBAT7071[OMB431KtoR] GEGEN pBAT7071[WT]. DIE ERHALTENE MUTATION IST ROT HERVORGEHOBEN. DIE ORIGINALSEQUENZ FINDET SICH IM ANHANG. DIE ÜBERSETZUNG ERFOLGTE DURCH EXPASY, DAS ALIGNMENT MIT BLASTP. DER SEQUENZUNTERSCHIED AM BEGINN DER MUTANTENSEQUENZ BERUHEN WAHRSCHEINLICH AUF EINER SCHLECHTEN LESBARKEIT DER DNA SEQUENZ IN DIESEM BEREICH (S. ANHANG). 63

ABBILDUNG 25: DIE ABBILDUNG ZEIGT DEN ABGLEICH DER SEQUENZ DES MUTIERTEN PLASMIDES pBAT7071[OMB454HtoY] GEGEN pBAT7071[WT]. DIE ERHALTENE MUTATION IST ROT HERVORGEHOBEN. DIE ORIGINALSEQUENZ FINDET SICH IM ANHANG. DIE ÜBERSETZUNG ERFOLGTE DURCH EXPASY, DAS ALIGNMENT MIT BLASTP. AUF GRUND DER SCHLECHTEN QUALITÄT DER DNA-SEQUENZ, WAR DIESE NUR BEREICHSWEISE LESBAR. SIE ZEIGT JEDOCH IM RELEVANTEN BEREICH DIE ERFOLGREICHE MUTAGENESE 64

ABBILDUNG 26: DIE ABBILDUNG ZEIGT DEN ABGLEICH DER SEQUENZ DES MUTIERTEN PLASMIDES pBAT7071[OMB508AtoV] GEGEN pBAT7071[WT]. DIE ERHALTENE MUTATION IST ROT HERVORGEHOBEN. DIE ORIGINALSEQUENZ FINDET SICH IM ANHANG. DIE ÜBERSETZUNG ERFOLGTE DURCH EXPASY, DAS ALIGNMENT MIT BLASTP..... 65

ABBILDUNG 27: ÜBERSICHT DER PROTEINSEQUENZ DER VERSCHIEDENEN DPP-KONSTRUKTE NACH M. ROTH (ROTH, 2003). IN BLAUER FARBE IST DAS MYC-TAG ZU SEHEN. GRÜN MARKIERT IST DER IN D-DEL ELIMINIERTER BEREICH. DIE ROTE MARKIERUNG ZEIGT DIE IN D-DUP ZUSÄTZLICH EINGEFÜGTEN GELADENEN AMINOSÄUREN. 66

ABBILDUNG 28: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PROTEINS DECAPENTAPLEGIC (DPP). DIE EINZELNEN PCR FRAGMENTE, DIE ZUR ERSTELLUNG DES DPP-GFP-FUSIONS-KONSTRUKTES BENUTZT WURDEN SIND FARBIG EINGETRAGEN. FRAGMENT 1A UND FRAGMENT 2 SIND BEI ALLEN DREI KONSTRUKTEN GLEICH. FRAGMENT 1B ENTHÄLT DIE GELADENE REGION, DIE DELETIERT (IN DPP-DEL) UND DUPLIZIERT (IN DPP-DUP) IST. 67

ABBILDUNG 29: TEIL 1 DER GRAPHIK GIBT AUFSCHLUSS ÜBER DIE HERKUNFT DER EINZELNEN TEILFRAGMENTE. SO WURDE DAS FÜR ALLE KONSTRUKTE IDENTISCHE FRAGMENT 1A PER RESTRIKTIONSVERDAU MIT DEN ENDONUKLEASEN EcoRI UND AgeI AUS DEM KONSTRUKT „pCDNA3 –Dpp-myc“ (M. ROTH) GESCHNITTEN. FRAGMENT 1B UND FRAGMENT 2 WURDEN MITTELS PCR AMPLIFIZIERT. DER EINSATZ VON LINKERPRIMERN, DIE SacII ERKENNUNGSSEQUENZEN TRAGEN, SOLLTE LETZTLICH DIE GFP-INSERTION ZWISCHEN DIESEN FRAGMENTEN ERMÖGLICHEN. FRAGMENT ZWEI, DAS EBENFALLS IN ALLEN ZIELKONSTRUKTEN IDENTISCH IST, WURDE EBENFALLS VON „pCDNA3 –Dpp-myc“ AMPLIFIZIERT. FRAGMENT 1B, DAS DIE DPP-VARIATION TRÄGT, WURDE JEWEILS VOM ENTSPRECHENDEN pCDNA3-KONSTRUKT (M. ROTH) AMPLIFIZIERT. DIE GFP SEQUENZ WURDE AUS p2XEGFP (CLONETECH) AMPLIFIZIERT. 68

ABBILDUNG 30: VIER-KOMPONENTEN-LIGATION UND GFP INSERTION. IM ERSTEN SCHRITT WURDEN DIE FRAGMENTE 1A, 1B UND 2 ÜBER EcoRI UND NotI IN DEN VEKTOR pAc5.1/V5-HIS-A EINLIGIERT. NACH EINEM RESTRIKTIONSVERDAU DES ZWISCHENKONSTRUKTES AN DER NEU EINGEFÜGTEN UND EINZIGARTIGEN SacII SCHNITTSTELLE ZWISCHEN FRAGMENT 1B UND 2 KANN DAS GFP FRAGMENT DURCH UNGERICHTETE LIGATION EINGEFÜGT WERDEN (BILD2). BILD 3 ZEIGT DAS FERTIGE DPP-GFP-FUSIONS-KONSTRUKT IN pAc5.1/V5-HIS-A. MIT HILFE DER BEIDEN ALS PFEILE EINGEZEICHNETEN PRIMER WAR EINE ÜBERPRÜFUNG DER EINBAURICHTUNG DURCH PCR MÖGLICH. 69

ABBILDUNG 31: ÜBERSICHT ÜBER DAS ERSTELLEN DES pUAST ENDKONSTRUKTES. DAS DPP-GFP-FUSIONS-KONSTRUKT WURDE MIT EcoRI WIEDER AUS DEM VEKTOR pAc5.1/V5-HIS-A GESCHNITTEN UND IN DEN EBENFALLS MIT EcoRI GEÖFFNETEN P-ELEMENT VEKTOR pUAST LIGIERT. EINE ZUERST VORGESEHENE GERICHTETE EcoRI-NotI BASIERTE UMKLONIERUNG KONNTE AUFGRUND DER ÜBERRASCHENDEN RESTRIKTIONSSCHNITTSTELLENKONFIGURATION NICHT ERFOLGEN. DIE EINBAURICHTUNG WURDE DURCH PCR MIT EINEM FRAGMENT-EXTERNEN UND EINEM –INTERNEN PRIMER UND SEQUENZIERUNG MIT pUAST EIGENEN, DIE MCS FLANKIERENDEN PRIMERN ÜBERPRÜFT. DER PFEIL ZEIGT JEWEILS IN DIE KORREKTE ABLESERICHTUNG DER SEQUENZ IM ZIELVEKTOR. 71

ABBILDUNG 32: STRUKTUR DES OLIGOMER-KONSTRUKTES ZUR MODIFIKATION DES pBLUESCRIPT SK- POLYLINKERS. IN GRÜN SIND DIE NEUEN RESTRIKTIONSSCHNITTSTELLEN MARKIERT, DIE DURCH SPACER (SCHWARZ) VONEINANDER GETRENNT SIND. IN ROT IST DANN DIE SEQUENZ DES 3XFLAG TAGS ZU SEHEN. DER DARAN ANSCHLIEßENDE ORG1 C-TERMINUS IST BLAU DARGESTELLT, DAS STOPPCODON UNTERSTRICHEN. AM BEGINN UND AM ENDE DES OLIGOMERS BEFINDEN SICH EBENFALLS BASENÜBERHÄNGE, DIE EINE ERFOLGREICHE RESTRIKTION AM RANDE ERMÖGLICHEN. 73

ABBILDUNG 33: DETAILLIERTES SCHEMA ZUR KONSTRUKTION VON pSK[KNM3XFLAGC13STOPX] AUS pBLUESCRIPT SK UND EINEM 158 BP OLIGOMER-KONSTRUKT. 74

ABBILDUNG 34: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KONSTRUKTION DES pBLUESCRIPT SK POLYLINKER- INSERTS AUS VIER KÜRZEREN EINZELSTRÄNGEN. GESTRICHELTE LINIEN STELLEN DIE AKTIVITÄT DES KLENOW ENZYMES DAR. DIE PFEILE STEHEN FÜR DIE ABSCHLIEßENDE PCR-REAKTION. 75

ABBILDUNG 35: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER STRATEGIE ZUM “IN FRAME” EINFÜGEN DER NEUEN RESTRIKTIONSSCHNITTSTELLE NheI IM ORG1 C-TERMINUS. DER BLAUE BALKEN STELLT DIE ORG1 SEQUENZ DAR (GENAUE SEQUENZ IM ANHANG), DER SCHWARZE DIE VEKTOREN ENDE. ES WERDEN ZWEI PCR PRODUKTE AMPLIFIZIERT (ROTE UND GRÜNE GESTRICHELTE LINIE), DIE JEWEILS AN EINEM ENDE DIE ORIGINALSEQUENZ ZUR NheI SEQUENZ MUTIEREN. ÜBER KpnI, NheI UND NdeI IST SCHLIEßLICH DIE 3-KOMPONENTEN LIGATION MÖGLICH. DES WEITEREN IST IN GELB DIE PCR, MIT DEREN AMPLIFIKAT DAS ANHÄNGEN DER MluI SITE AN DAS ENDE DES ORG1 C-TERMINUS MÖGLICH IST (SIEHE NÄCHSTER SCHRITT), DARGESTELLT. 77

ABBILDUNG 36: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER STRATEGIE ZUM AUSTAUSCH DER ORG1-C-TERMINALEN ORIGINALSEQUENZ GEGEN DIE MIT DER NHEI SCHNITTSTELLE MODIFIZIERTE VERSION IM ORIGINALVEKTOR PSK[ORG1C] (M. PORSCH). DER NAME DES NEUEN VEKTORS IST PSK[ORG1CKNHEN].	77
ABBILDUNG 37: A/T SUBKLONIEREN DES ORG1-NDE-MLU-C-TERMINUS FRAGMENTES IN PDRIVE. DER NAME DES NEUEN VEKTORS IST PDRIVE[ORG1CNHE/MLU]. DIE PDRIVE EIGENE MLU1 SCHNITTSTELLE, IST GRÜN HINTERLEGT.	78
ABBILDUNG 38 ZUSAMMENBAU DES MODIFIZIERTEN ORG1 C-TERMINUS IN PSK[KNM3XFLAGC13STOPX]. DER NEUE VEKTOR HEIßT PSK[ORG1CKNHEM3XFLAGC13STOPX].	80
ABBILDUNG 39: DIESES OLIGO, DAS AUS DEN EINZELSTRÄNGEN 728 UND 729 ERSTELLT WURDE BESITZT ENDEN, DIE ZU BSSHII (ROT) UND NHEI (BLAU) KOMPATIBEL SIND. IN GRÜN IST DIE BSTEII SCHNITTSTELLE MARKIERT, DIE DIE SPÄTERE EINKLONIERUNG DER GLUTAMINHOMOPOLYMER KODIERENDEN OLIGONUKLEOTIDE ERMÖGLICHT.	81
ABBILDUNG 40: HERSTELLUNG DES VEKTORS PSK[ORG1CΔBSSHII/NHEI→BSTEIIM3XFLAGC13STOPX] IN DIESEM VEKTOR WURDE DIE GLUTAMINREICHE ORG1 REGION ZWISCHEN DER SEQUENZEIGENEN BSSHII UND DER ARTIFIZIELLEN NHEI SCHNITTSTELLE DELETIERT UND DURCH EIN OLIGO (728/729) MIT BSTEII ERKENNUNGSSEQUENZ ERSETZT.	81
ABBILDUNG 41: DIESES OLIGO, DAS AUS DEN EINZELSTRÄNGEN 767 UND 768 ERSTELLT WURDE, BESITZT ENDEN, DIE ZU NHEI (ROT) UND MLU1 (BLAU) KOMPATIBEL SIND. IN GRÜN IST DIE DRAlII SCHNITTSTELLE MARKIERT, DIE DIE SPÄTERE EINKLONIERUNG DER ALANINHOMOPOLYMER ERMÖGLICHT.	82
ABBILDUNG 42: HERSTELLUNG DES VEKTORS PSK[ORG1CANHE/MLU→DRAlII3XFLAGC13STOPX] AUS PSK[ORG1CKNHEM3XFLAGC13STOPX] DURCH DELETION DER ALANINREICHEN REGION UND INSERTION EINES DRAlII-OLIGOS (767/768).	82
ABBILDUNG 43: HERSTELLEN DES NEUEN POLYGLUTAMIN ZWISCHENVEKTORS (GEPLANT) AUS PAC5.1/V5-HIS-A DURCH EINKLONIEREN EINES OLIGOMERS (788/789) ZWISCHEN KPNI UND MLU1 (PAC5.1/V5-HIS-A[KBDBM]).	84
ABBILDUNG 44: SEQUENZ DES OLIGOS ZUR INSERTION VON POLYGLUTAMINHOMOPOLYMEREN. IN ROT IST DIE KPNI SEQUENZ, IN BLAU DIE BEIDEN BSTEII SEQUENZEN, DIE DIE DRAlII SCHNITTSTELLE (GRÜN) UMGEBEN. DIE ÜBERSCHNEIDENDEN BASEN SIND GELB GEKENNZEICHNET. IN VIOLETT FOLGT DIE ABSCHLIEßENDE MLU1 SEQUENZ.	84
ABBILDUNG 45: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE KOMPLETTE STRATEGIE ZUR SUBKLONIERUNG DER HOMOPOLYALANIN KODIERENDEN OLIGOMERE.	85
ABBILDUNG 46: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ÜBER DIE KONSTRUKTION DES VEKTORS PAC5.1/V5-HIS-A[ENKBNDMX] ZUR SUBKLONIERUNG DER POLYALANINTRAKTE. NEBEN DIESER AUFGABE IST DIES AUCH DER ZIELVEKTOR FÜR DIE ENDKONSTRUKTE (ZELLKULTUREXPERIMENTE), WAS DEN UMFANGREICHEN NEUEN POLYLINKER ERKLÄRT.	86
ABBILDUNG 47: POLYMERLIGATE AUF ANALYSEGEL. IM FALL VON GLUTAMINPOLYMEREN SIND 3µL DER REAKTION AUF EIN 12% POLYACRYLAMIDGEL GELADEN. WIE MAN ANHAND DER LEITERARTIGEN STRUKTUR SEHEN KANN, SIND VERSCHIEDENLANGE MULTIMERE ENTSTANDEN.	88
ABBILDUNG 48: SEQUENZ EINES GLUTAMINOLIGOS. DIE SEQUENZ KODIERT FÜR SECHS GLUTAMINE UND IST MIT IHREN ÜBERHÄNGEN (ROT) SOWOHL MIT EINEM SCHWESTEROLIGO ALS AUCH MIT EINER GEÖFFNETEN DRAlII SCHNITTSTELLE KOMPATIBEL.	88
ABBILDUNG 49: EINKLONIEREN DER HOMOGLUTAMINPOLYMERTRAKTE IN DEN ZWISCHENVEKTOR. DIESER SCHRITT STEHT NOCH AUS.	88
ABBILDUNG 50: IM FALL VON ALANINPOLYMEREN IST DIE GESAMTE LIGATIONSREAKTION AUF ZWEI SPUREN VERTEILT AUF EINEM 2% AGAROSEGEL ZU SEHEN (WEGEN AUFREINIGUNG;). WIE MAN ANHAND DER LEITERARTIGEN STRUKTUR SEHEN KANN, SIND VERSCHIEDENLANGE MULTIMERE ENTSTANDEN.	89
ABBILDUNG 51: SEQUENZ EINES ALANINOLIGOS. DIE SEQUENZ KODIERT FÜR SECHS ALANINE UND IST MIT IHREN ÜBERHÄNGEN (ROT) SOWOHL MIT EINEM SCHWESTEROLIGO ALS AUCH MIT EINER GEÖFFNETEN DRAlII SCHNITTSTELLE KOMPATIBEL.	90
ABBILDUNG 52: SCHEMATISCHE GESAMTÜBERSICHT ÜBER DIE IM TEXT BESCHRIEBENEN UND NOCH GEPLANTEN SCHRITTE ZUR KONSTRUKTION DER HOMOGLUTAMINPOLYMERE IN ORG-1. DIE SCHWARZEN ZIFFERN BESCHREIBEN DEN WEG DES EIGENTLICHEN ORG-1 KONSTRUKTES. DIE WEIßEN ZIFFERN BESCHREIBEN DIE ERSTELLUNG DER POLYMERE IN EINEM GEEIGNETEN ZWISCHENVEKTOR. IM SCHRITT 5 WERDEN DIESE DARAUSS IN DEN ORG-1 C-TERMINUS EINGEFÜGT. DIE LEGENDE ZU DEN SYMBOLEN IST AUS ABBILDUNG 53 ZU ENTNEHMEN.	91
ABBILDUNG 53: SCHEMATISCHE GESAMTÜBERSICHT ÜBER DIE IM TEXT BESCHRIEBENEN DURCHFÜHRTE UND NOCH GEPLANTEN SCHRITTE DER KONSTRUKTION DER HOMOALANINPOLYMERE IN ORG-1. DIE SCHWARZEN ZIFFERN BESCHREIBEN DEN WEG DES EIGENTLICHEN ORG-1 KONSTRUKTES. DIE WEIßEN ZIFFERN BESCHREIBEN DIE ERSTELLUNG DER POLYMERE IN EINEM GEEIGNETEN ZWISCHENVEKTOR. IM SCHRITT 5 WERDEN DIESE DARAUSS IN DEN ORG-1 C-TERMINUS EINGEFÜGT.	92
ABBILDUNG 54: NACH RYDER ET AL, 2004. BILD 1A ZEIGT DEN AUFBAU EINES RS3 UND RS5 ELEMENTES. DIE BEIDEN SCHWARZEN PFEILE STEHEN FÜR DIE FRTS. EINE DAVON LIEGT JEWEILS IM ERSTEN INTRON, SO DASS DAS <i>WHITE</i> GEN UNTERTEILT WIRD. EINE INTERNE REKOMBINATION NACH AKTIVIERUNG DER FLIPPASE ERZEUGT DIE IN 1B DARGESTELLTEN RSr-ELEMENTE. DEREN <i>WHITE</i> GEN IST NICHT MEHR VOLLSTÄNDIG UND DAHER NICHT FUNKTIONSFÄHIG, DAHER HABEN DIE REKOMBINANTEN WEIßE AUGEN. LIEGEN DIESE IN <i>TRANS</i> UND WERDEN WIEDERUM REKOMBINIERT, ENTSTEHT DIE IN 1C GEZEIGTE DELETION. DER BEREICH ZWISCHEN DEN FRTS WIRD DABEI ELIMINIERT. DAS <i>WHITE</i> GEN WIEDER VERVOLLSTÄNDIGT. SO IST EINE SELEKTION DER NACHKOMMEN NACH ROTER AUGENFARBE WIEDER MÖGLICH.	94

ABBILDUNG 55: DETAILLIERTES KREUZUNGSSHEMA FÜR „FLIP OUT“ UND „FLIP IN“ EXPERIMENTE AUF CHROMOSOM 3R. JEDER TEIL BESTEHT AUS DREI KREUZUNGEN. NACH JE DER ERSTEN KREUZUNG WIRD DER HITZESCHOCK FÜR 45MINUTEN BEI 37°C GEGEBEN, UM DIE FLIPPASEAKTIVITÄT ZU INDUZIEREN. DIE NACHKOMMEN DER ZWEITEN KREUZUNG WERDEN DANN NACH IHREM MARKER SELEKTIERT UND EINZELNE INDIVIDUEN WIEDERUM MIT BALANCERN GEKREUZT, UM EINEN STABILEN STAMM ZU ETABLIEREN. 94

ABBILDUNG 56: ÜBERSICHT ÜBER DIE LAGE UND DEN ERFOLG DER DELETIONEN AUF 3R 89-100E. DIE FARBE DER BALKEN, ZEIGT DAS ERGEBNIS DER KREUZUNGEN AN. EIN GRÜNER BALKEN DEMONSTRIERT DEN REKOMBINATIONSERFOLG EINER DEFIZIENZ. STEHT EIN SCHWARZER BALKEN, SO WAR DIE REKOMBINATION NICHT ERFOLGREICH, ODER ES KONNTE KEIN LEBENSFÄHIGER STAMM ETABLIERT WERDEN. EIN ROTER BALKEN STEHT FÜR GENOMISCHE BEREICHE MIT VORHERGESAGTER HAPLOINSUFFIZIENZ. EINE KREUZUNG WURDE HIER NICHT DURCHGEFÜHRT, WOHL ABER DER BEREICH DURCH BENACHBARTE ÜBERLAPPUNGEN VERSUCHT ZU REDUZIEREN. EINE GRÜNE SCHRIFT STEHT FÜR DEN ERFOLGREICH ETABLIERTEN STAMM, EINE ROTE SCHRIFT FÜR DEN MISSERFOLG. DIE BUCHSTABEN VOR DEM OFFIZIELLEN NAMEN BEDEUTEN DEN LABORCODE DER KREUZUNGSREIHE. DAS WEIBCHENSYMBOL HINTER EINEM NAMEN ZEIGT, DASS DIESES KREUZUNGSEXPERIMENT NUR WEIBLICHE REKOMBINANTE HERVORGEBRACHT HAT. 96

ABBILDUNG 57: FINALE KONSTRUKTION DER ALANIN HOMOPOLYMERKONSTRUKTE UND UMKLONIERUNGSSTRATEGIE IN DIE ZIELVEKTOREN pAc5.1[ORG1NTΔC] UND pUAST[ORG1NTΔC] 106

ABBILDUNG 58: FINALE KONSTRUKTION DER GLUTAMIN HOMOPOLYMERKONSTRUKTE UND UMKLONIERUNGSSTRATEGIE IN DIE ZIELVEKTOREN pAc5.1[ORG1NTΔC] UND pUAST[ORG1NTΔC] 107

ABBILDUNG 59: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ÜBER DIE KONSTRUKTION DES ZWISCHENVEKTORS pDRIVE[BBStEIIIN] AUS EINEM pDRIVE[SL] (SELBSTLIGAT). 120

ABBILDUNG 60: SEQUENZ DES OLIGOS 741/742, DAS DEN EINBAU DER POLYGLUTAMINHOMOMERE IN pDRIVE[SL] ERMÖGLICHT. IN ROT IST DIE XbaI SEQUENZ GEKENNZEICHNET, IN BLAU DIE BssHII SCHNITTSTELLE. DES WEITEREN FOLGEN DIE SEQUENZEN FÜR BStEII (GRÜN), NheI (BRAUN) UND XhoI IN VIOLETT. 120

ABBILDUNG 61: HERSTELLUNG DES STUI DERIVAT VON pSK[ORG1CΔBssHII/NheI →BStEIIIM3xFLAGC13STOPX] ZUR KONSTRUKTION DES T-ÜBERHANG VEKTORS UM A-GETAILTE POLYGLUTAMINTRAKTE SUBZUKLONIEREN. 121

ABBILDUNG 62: TEIL 1 ZEIGT DIE SEQUENZ DES OLIGOS 778/779 ZUR INSERTION EINER STUI SCHNITTSTELLE IN BStEII DES ΔQ BEREICHS DES ORG1 C-TERMINUS. IN ROT SIND DIE BEIDEN BStEII KOMPATIBLEN ENDEN GEZEIGT. IN BLAU DIE NEUE STUI SCHNITTSTELLE. TEIL 2 ZEIGT DIE MIT STUI GESCHNITTENE UND T-GETAILTE SEQUENZ, IN DIE A-GETAILTE HOMOPOLYMERE EINGESETZT WERDEN KÖNNEN. 121

ABBILDUNG 63: NACH DEM A/T TAILING IST WIRD DIE SEQUENZ IMMER NOCH KORREKT TRANSLATIERT. IN ROT IST DIE FÜR HOMOPOLYGLUTAMIN KODIERENDE INSERIERTE SEQUENZ ZU SEHEN, IN BLAU DIE STUI SCHNITTSTELLE. GRÜN IST DAS ANGEHÄNGTE T ZU SEHEN. DIE ZWEITE ZEILE ZEIGT DIE AMINOSÄURESEQUENZ. 122

ABBILDUNG 64: GEPLANTE STRATEGIE ZUM ERSTELLEN EINES VEKTORS, IN DEM DIE HOMOGLUTAMINPOLYMERE ZWISCHENKLONIERT WERDEN KÖNNEN. EIN OLIGO ZERSTÖRT DIE VEKTOREIGENE DRaIII SITE IM F1 ORIGIN. DANACH WIRD IN DEN POLYLINKER ÜBER KpNI UND MluI EINE BStEII-DRaIII-BStEII SEQUENZ EINGEFÜGT (SIEHE Abb13B). ÜBER DIE DRaIII KLONIERUNG SOLLTEN DIE HOMOPOLYMERE DIREKT EINGEFÜGT WERDEN, UND DIE BStEII SITE AN BEIDEN ENDEN DABEI REGENERIERT WERDEN. DIES ERMÖGLICHTE DAS UMKLONIEREN IN DIE BEREITS DAFÜR MODIFIZIERTE ORG1 SEQUENZ. DA pSK[KNM3xFLAGC13STOPXΔDRaIII] NICHT ERZEUGT WERDEN KONNTE, WURDE DER LETZTE SCHRITT NICHT IN DIE TAT UMGESETZT. 123

ABBILDUNG 65: BASENFOLGE DER OLIGOMERE ZUR ERSTELLUNG DER HOMOPOLYMERTRAKTE. DIE SEQUENZ CODIERT JEWEILS FÜR SECHS GLEICHE AMINOSÄUREN. DIE ÜBERHÄNGE SIND SO GEWÄHLT, DASS LIGATION JEWEILS NUR IN EINER ORIENTIERUNG MÖGLICH IST. 124

ABBILDUNG 66: BASENFOLGE DER BStEII-GLUTAMIN-OLIGO-ADAPTOREN. BEIDE SIND SO KONSTRUIERT, DASS EIN ÜBERHANG (HIER ROT MARKIERT) AN DIE POLYMERE LIGIERT WERDEN KANN, DER ZWEITE ÜBERHANG AN DIE BStEII-SCHNITTSTELLE IM VEKTOR (BLAU MARKIERT). DER SCHWARZE SEQUENZTEIL CODIERT EBENFALLS FÜR GLUTAMIN. DA ASYMMETRISCHE SCHNITTSTELLEN VERWENDET WERDEN, UM DAS INSERT IN DER RICHTIGEN LESERICHTUNG ZU INSERIEREN, IST FÜR JEDE SEITE EIN EIGENER ADAPTOR NÖTIG. 124

ABBILDUNG 67: SCHEMATISCHE GESAMTDARSTELLUNG DER STRATEGIE, MIT HILFE ZWEIER ADAPTOREN DIE POLYMERE GERICHTET IN EINEN ZIELVEKTOR ÜBER DIE ASYMMETRISCHE SCHNITTSTELLE BStEII ZU KLONIEREN. GELB MARKIERT SIND DIE ADAPTOREN, WEIß IST EIN BEISPIEL FÜR EIN POLYGLUTAMINOLIGO-DIMER DARGESTELLT. SCHWARZ IST DER VEKTOR GEZEIGT. 125

ABBILDUNG 68: BASENFOLGE DER FÜR HOMOPOLYALANIN KODIERENDEN OLIGOADAPTOREN. BEIDE SIND SO KONSTRUIERT, DASS EIN ÜBERHANG (HIER ROT MARKIERT) AN DIE POLYMERE LIGIERT WERDEN KANN, DER ZWEITE ÜBERHANG AN DIE DRaIII SCHNITTSTELLE IM VEKTOR (BLAU MARKIERT). DER SCHWARZE SEQUENZTEIL CODIERT EBENFALLS FÜR ALANIN. DA ASYMMETRISCHE SCHNITTSTELLEN VERWENDET WERDEN, UM DAS INSERT IN DER RICHTIGEN LESERICHTUNG ZU INSERIEREN, IST FÜR JEDE SEITE EIN EIGENER ADAPTOR NÖTIG. 126

ABBILDUNG 69: SCHEMATISCHE GESAMTDARSTELLUNG DER STRATEGIE, MIT HILFE ZWEIER ADAPTOREN DIE POLYMERE GERICHTET IN EINEN ZIELVEKTOR ÜBER DIE ASYMMETRISCHE SCHNITTSTELLE DRaIII ZU KLONIEREN. GELB MARKIERT SIND DIE ADAPTOREN, WEIß IST EIN BEISPIEL FÜR EIN POLYALANINOLIGO-DIMER DARGESTELLT. SCHWARZ IST DER VEKTOR GEZEIGT. 126

ABBILDUNG 70: DIE ABBILDUNG ZEIGT ALLE SIEBEN SICH ÜBERSCHNEIDENDEN TEILSEQUENZEN ZU EINEM BILD ZUSAMMENGESETZT. AUF GRUND SCHLECHTER SEQUENZQUALITÄT STEHEN AN MANCHEN POSITIONEN N. DA DIE EINZELNEN SEQUENZEN ABER ÜBERLAPPEN, WAR EIN ALIGNMENT DENNOCH UNPROBLEMATISCH. DIE SCHWARZEN BALKEN ZEIGEN DIE FLANKIERENDEN VEKTORSEQUENZEN DES SUBKLONS pDRIVE[A2-LR-PCR]. DIE BEIDEN SEQUENZIERPRIMER 622 UND 621 LIEGEN IM POLYLINKER DES VEKTORS. BLAU (221) UND BRAUN (222) IST DIE GENOMISCHE SEQUENZ ZU SEHEN, DIE P2 FLANKIERT. DIE VIOLETTEN BALKEN ZEIGEN DIE CHARAKTERISTISCHEN P-ELEMENTENDEN, DIE BEIDE NOCH VORHANDEN SIND. FARBIG ABGEGRENZT SIND DIE ZUR MONTAGE DER ABBILDUNG VERWENDETEN SEQUENZEN, DEREN ORIGINALE WEITER UNTEN IM ANHANG ZU SEHEN SIND. DIE GRÖßE DER SEQUENZ ZWISCHEN DEN P-ELEMENTENDEN HAT NUR MEHR EINE GRÖßE VON CA. 2,3 KB. DAS ZWEITE P-ELEMENT P[3] IST NICHT MEHR ZU SEHEN (WENN DAS INVERTED REPEAT NICHT VON DIESEM STAMMT). DIE GENOMISCHE SEQUENZ DER *OMB* URR ZWISCHEN DEN TRANSPOSABLEN ELEMENTEN IST JEDENFALLS DELETIERT. 127

ABBILDUNG 71: ORIGINALSEQUENZEN DER „UPSTREAM DELETION LINIE“ A2, DIE ZUM ERSTELLEN DER GESAMTSEQUENZ IN VI.2. ALLE WEITEREN DETAILS SIND DORT ZU FINDEN..... 135

ABBILDUNG 72: ORIGINALSEQUENZEN ALLER IN DER ARBEIT DURCHFÜHRTEN MUTAGENESEN. DIE ANNOTATION IST IM ERGEBNISTEIL ZU SEHEN. 136

ABBILDUNG 73: ORIGINALSEQUENZEN DER iPCR PRODUKTE VON Qd[FOR]. DIE ERSTEN BEIDEN SEQUENZEN ENTSPRECHEN DEM LINKEN ENDE DER INSERTION (MAEII), DIE UNTEREN BEIDEN SEQUENZEN ENTSPRECHEN DEM RECHTEN ENDE DER INSERTION. (Bsh1236I). ES WURDE EINE WEITERE iPCR (SAU3AI) VERSUCHT UM ANHAND DIESER DATEN WEITER IN DIE INSERTION ZU LESEN, WAS ABER NICHT GELANG. 137

ABBILDUNG 74: ORIGINALSEQUENZEN DER DPP-GFP-FUSIONSKONSTRUKTE. GRÜN IST GFP-SEQUENZ MARKIERT (NACH ALIGNMENT DER SEQUENZ MIT P-2XEGFP-1). DIE EINGEFÜGTE SACII LINKER-SITE IST UNTERSTRICHEN. BLAU IST DIE MODIFIKATION IN DPP-DUP-GFP UND DPP-DEL-GFP HERVORGEHOBEN. DER PRIMER 625A LIEST VOM MODIFIZIERTEN DPP-BEREICH (FRAGMENT 1B) IN DIE GFP SEQUENZ. DER PRIMER 678 IST EIN GFP INTERNER PRIMER, DER IN FRAGMENT2, DAS DPP C-TERMINALE ENDE LIEST. SO WIRD SICHERGESTELLT, DASS DIE GESAMTE SEQUENZ IN ORDNUNG IST. FRAGMENT 1A WURDE AUS DEM AUSGANGSKLON (PCDNA3-DPP-MYC VON M. ROTH GESCHNITTEN UND NICHT MEHR VOLLSTÄNDIG SEQUENZIERT.... 138

I. Einleitung

I-A Genregulation

Das eukaryotische Individuum besteht aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen, die unterschiedliche Aufgaben in Entwicklung und Funktion des Organismus besitzen. Alle diese Zellen beinhalten in der Regel eine vollständige Kopie des Genoms mit seinen tausenden an Genen. Für ein Funktionieren des Organismus ist deshalb eine räumliche und zeitliche Organisation von Genexpression unabdingbar, da nicht jedes Genprodukt in jedem Gewebe gleichzeitig hergestellt werden darf. Dies wird durch eine Vielzahl von Mechanismen auf verschiedenen Ebenen des Expressionsprozesses gewährleistet. So kann Genregulation beispielsweise bereits auf Chromatinebene stattfinden, indem die Zugänglichkeit der DNA-Doppelhelix für Transkriptionsfaktoren durch die assoziierten Histone und die Faltung des Chromatins in jedem Zelltyp individuell geregelt wird (Übersicht: (Narlikar et al., 2002)).

Zur erfolgreichen Genexpression sind für jedes Gen individuelle Sets an DNA bindenden Faktoren und Kofaktoren nötig (McKenna and O'Malley, 2002). Diese Faktoren, binden beispielsweise spezifisch an den Enhancerbereich eines Gens und bilden dort Komplexe um die Initiation der Transkription zu fördern. So kann über die Verfügbarkeit unterschiedlicher Sets an Transkriptionsfaktoren oder ihrer Kofaktoren in einem bestimmten Zelltyp ebenfalls Kontrolle über das zur Verfügung stehende Repertoire an Proteinen ausgeübt werden.

Aber nicht nur die Präsenz eines Proteins in einer Zelle, sondern auch dessen Menge ist oft für zellspezifische Funktionen von Bedeutung. Um das Expressionsniveau eines Gens zu regulieren, besitzen viele Gene unterschiedliche Enhancer und Suppressor Bereiche. Durch Bindung weiterer Molekülkomplexe an diese wird eine Steigerung oder Erniedrigung der Transkriptionsrate erreicht. Da Transkription im Nukleus, Translation aber im Cytoplasma der Zelle stattfindet, kann auch über selektiven Transport von mRNA über spezifische Transporter in der Kernmembran zur Genregulation beitragen. Ebenso kann durch unterschiedliche Prozessierung der mRNA Einfluss auf das zu exprimierende Protein genommen werden. Eine weitere Möglichkeit der Regulation stellt letztlich auch die Modifikation des Primärproteins selbst dar.

Wie die oben aufgeführten Beispiele zeigen, finden auf allen Ebenen des Weges vom Gen zum Protein und selbst danach, Prozesse statt, die dafür sorgen, dass jeder Zelltyp über die für seine Funktion spezifisch benötigten Komponenten verfügt.

In dieser Arbeit soll ein Beitrag dazu geleistet werden, Aspekte dieser Regulation an zwei T-Box Genen bzw. deren Proteinen im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* besser zu verstehen. Hierzu soll die 5' der *optomotor-blind (omb)* Transkriptionseinheit gelegene Genregion (*upstream regulatory region, URR*) auf regulatorische Elemente, wie Enhancer hin untersucht werden. Ein weiterer Abschnitt befasst sich mit dem Einfluss homopolymerer Trakte bestimmter Aminosäuren auf die Funktion von Transkriptionsfaktoren. Dazu wurde als Modell das Gen *optomotor-blind related Gen-1 (org-1)* gewählt, das bereits in der Vergangenheit partiell charakterisiert worden ist (Porsch et al., 1998).

In der Entwicklung der Flügelimaginalscheibe steht *omb* unter der Kontrolle von Dpp ((Grimm and Pflugfelder, 1996); (Lecuit et al., 1996); (Nellen et al., 1996)). In der Entwicklungsbiologie hat die Flügelimaginalscheibe paradigmatische Bedeutung für Morphogen-kontrollierte Musterbildungsprozesse erlangt. In Einklang mit dem *french flag* Modell, wird das Dpp-Zielgen *spalt* oberhalb einer hohen Dpp-Konzentrationschwelle, *omb* oberhalb einer niedrigeren Dpp-Konzentrationschwelle transkribiert. Um den Mechanismus des Langstreckentransportes von Dpp in der Flügelimaginalscheibe besser verstehen zu können, wurden GFP-Fusionskonstrukte von Dpp-Varianten erstellt, die sich in der Interaktion mit der extrazellulären Matrix (ECM) unterscheiden. In transgenen Fliegen sollte sich damit der Einfluss der ECM-Interaktion auf die Dpp-Mobilität direkt visualisieren lassen.

I-A-1 T-Box Gene bei *Drosophila*

Die Mitglieder dieser Genfamilie sind Transkriptionsfaktoren und besitzen alle eine evolutionär konservierte DNA Bindungsdomäne, die sogenannte T-Domäne, die von der T-Box kodiert wird (Bollag et al., 1994). Ein phylogenetischer Stammbaum ist in Abbildung 1 zu sehen.

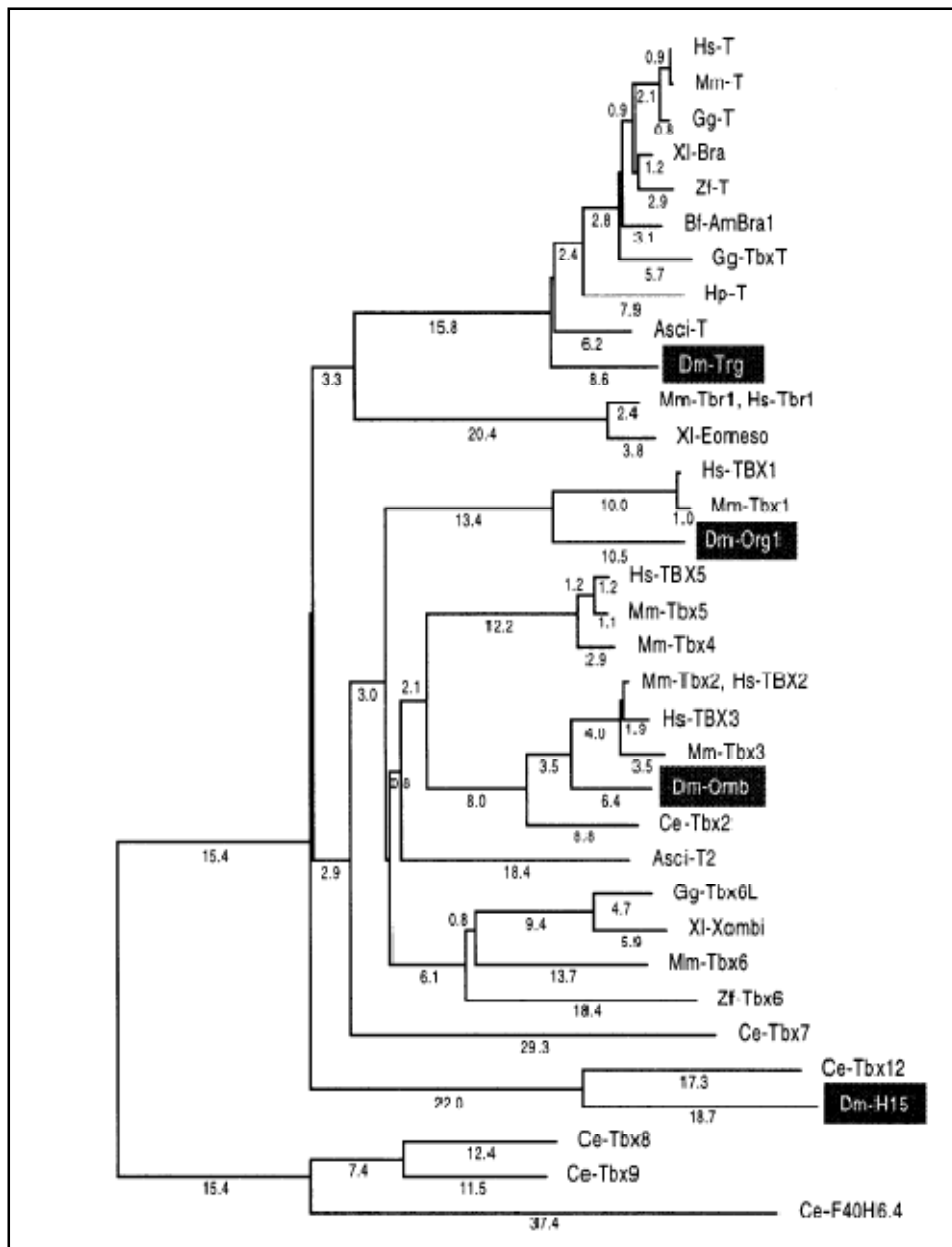


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Tbx Gene (Porsch et al., 1998). Die *Drosophila* Varianten sind hervorgehoben. Die Abbildung umfasst nicht alle acht *Drosophila melanogaster*-Tbx Gene.

Mutationen in T-box Genen sind bei *Drosophila* mit *bifid* (Morgan and Bridges, 1916) und der Maus mit *Brachyury* (Dobrovolskaia-Zavadskaja, 1927) bereits seit längerer Zeit bekannt. Später konnten beide Gene isoliert werden ((Herrmann et al., 1990), (Pflugfelder et al., 1992a)). Statistische Analysen der Proteinsequenz legten nahe, dass eine etwa 200 Aminosäuren große Domäne bei OMB potentiell DNA bindende Funktion hat. Diese Region war auch im Brachyury Protein der Maus zu finden. Durch weitere Experimente konnte gezeigt werden, dass die T-Domäne für die Protein-DNA Interaktion notwendig und

hinreichend ist. ((Pflugfelder et al., 1992a), (Kispert et al., 1995)). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Brachyury an eine 20bp große nahezu palindromische Sequenz bindet, die aus zwei Hälften besteht (CACACCT AGGTGTGAAATT) welche einzeln oder in Clustern in Tbx-kontrollierten Genen auftreten können ((Kispert and Herrmann, 1993); (Kispert et al., 1995); (Papapetrou et al., 1997)). Dies ließ sich auch für alle weiteren bisher bekannten T-Box Proteine nachweisen, so dass eine Halbsequenz als gemeinsame Konsensussequenz der DNA-Bindedomäne (AGGTGTGA) betrachtet werden kann.

Im Laufe der Zeit wurden weitere Gene der T-Box Familie zugeordnet. Bei *Drosophila* sind neben *omb* zum Beispiel noch *Doc1-3*, *byn*, *H15* und *mid*, sowie *org-1* bekannt. Die Mehrzahl der untersuchten T-Box Proteine sind Transkriptionsaktivatoren ((Kispert et al., 1995); (Conlon et al., 2001), (Hiroi et al., 2001); (Lamolet et al., 2001)). TBX2 und TBX3/ET, die OMB Homologe in Vertebraten, sind hingegen als Transkriptionsrepressoren bekannt ((Carreira et al., 1998); (He et al., 1999); (Jacobs et al., 2000); (Paxton et al., 2002); (Prince et al., 2004)). Viele Gene der Tbx Familie sind in menschlichen Erbkrankheiten mutiert: z. B.: TBX1 (DiGeorge Syndrom; VCFS), TBX3 und TBX5 (Ulnar Mammary Syndrom und Holt-Oram Syndrom) ((Chapman et al., 1996); (Bamshad et al., 1997); (Basson et al., 1997); (Porsch et al., 1998); (Scambler, 2000); (Packham and Brook, 2003); (Jacobs et al., 2000)). TBX2 wird außerdem in vielen Brust- und anderen Tumoren amplifiziert (Jacobs et al., 2000).

I-A-2 Das Gen *optomotor-blind* (*omb*)

Das Gen *optomotor-blind* (*omb*) gehört zur Unterfamilie der TBX2 Gene. Die erste *omb* Mutante *In(1)ombH31* wurde in einem Screen gefunden, in dem EMS-Mutanten auf ihr optomotorisches Verhalten hin in einer Versuchsarena untersucht wurden ((Heisenberg, 1972); (Heisenberg and Götz, 1975)). *In(1)ombH31* ist eine große Inversion zwischen den Bruchpunkten 4C5-6 und 12D2-E. Ein Nebenprojekt dieser Arbeit befasst sich mit der molekular genauen Lokalisierung dieser Inversion.

Die mutanten Tiere zeigten ein verändertes Verhalten in der optomotorischen Wendereaktion, sowohl beim Laufen (Heisenberg et al., 1978) als auch beim Fliegen (Blondeau and Heisenberg, 1982) in der Arena. Bei der histologischen Untersuchung des *In(1)ombH31* Gehirnes wurde festgestellt, dass in mutanten Fliegen die VS (Vertical System) und HS (Horizontal System) Neurone nicht vorhanden sind. In wildtypischen Tieren gehören diese Neurone zu den Riesenneuronen der Lobulaplatte (LPGNs), des vierten Neuropils der

optischen Loben von Dipteren. Sie sind, wie für andere große Dipteren bereits gezeigt wurde, für die Verarbeitung von visuellen Informationen aus großen Teilen des Sehfeldes nötig (Hausen and Egelhaaf, 1989). Der Defekt bezieht sich aber nur auf visuelle Großfeldinformationen, nicht auf die Wahrnehmung einzelner Objekte (Bausenwein et al., 1986). Neben dem Fehlen der Riesenneurone wurden noch einige weitere Defekte festgestellt. So ist beispielsweise das Volumen der Lobulaplatte in dieser Mutante um ca. 30% reduziert (Heisenberg et al., 1978) und das innere optische Chiasma (IOC), das die Neuropile der Medulla, Lobula und Lobulaplatte miteinander verbindet, ist verändert ((Heisenberg et al., 1978); (Blondeau and Heisenberg, 1982); (Brunner et al., 1992); (Hofmeyer et al., 2008)). *Omb* ist aber nicht nur in der Gehirnentwicklung, sondern auch in der Entwicklung der Anhänge, wie Antennen, Beine und Flügel und der Augenentwicklung von Bedeutung. Nullmutationen von *omb* sind letal (Pflugfelder et al., 1992b). Ektopische Expression führt zum Beispiel in der Antenne zum Verlust der Arista, in den Beinen zum Verlust von Tarsensegmenten. In der Augenentwicklung führt ektopische Expression zur starken Reduktion der Ommatidien oder gar zum Gesamtverlust der Retina (Abbildung 2), während bei hypomorphen *omb* Allelen eine erhöhte Ommatidienzahl zu beobachten ist. *Omb* scheint demnach für die Begrenzung des Retinagewebes zuständig zu sein ((Poeck et al., 1993b); (Porsch et al., 2005)).

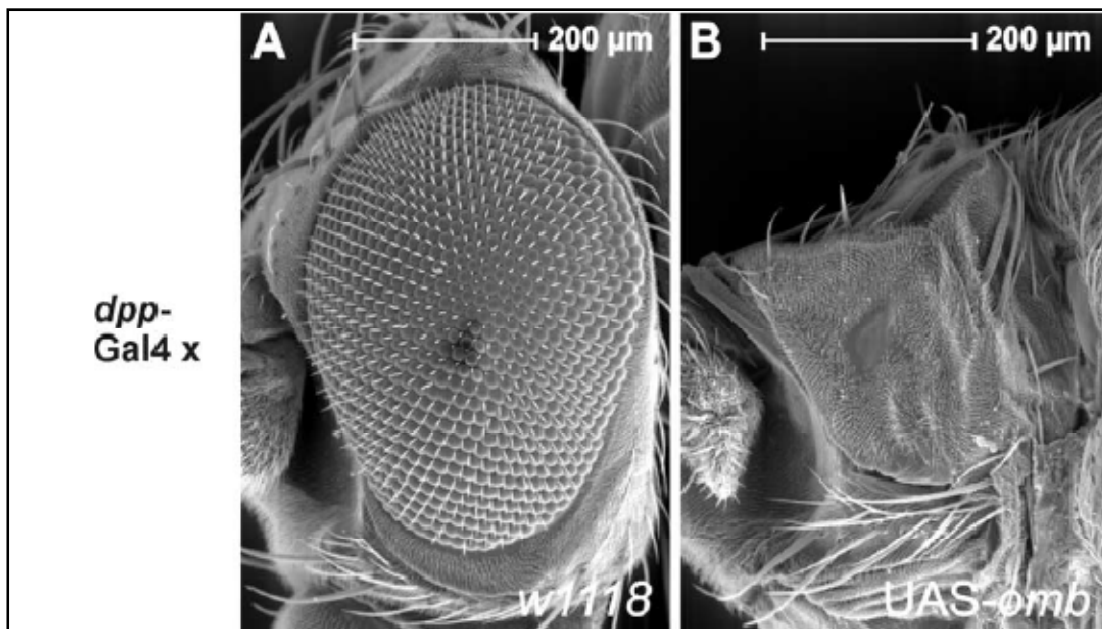


Abbildung 2: Wildtypische Expression (A) und *omb* Überexpression getrieben durch *dpp-Gal4* (B). Der Verlust des Auges ist zu sehen (aus Porsch et al, 2004).

Omb wurde auf dem X-Chromosom im Chromomer 4C5-6 lokalisiert (Heisenberg et al., 1978). Der gesamte Genbereich wurde durch ein Chromosomal Walk Experiment über 340kb untersucht und genetisch analysiert ((Pflugfelder et al., 1990); (Pflugfelder et al., 1992a)). Daraus ergab sich, dass sich der *omb* Locus über eine Sequenz von mehr als 150kb erstreckt, und somit eines der größten *Drosophila* Gene ist. Eine genaue distale und proximale Abgrenzung von Nachbargenen konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden. Daher wird davon ausgegangen, dass der gesamte Bereich distal der *omb* Transkriptionseinheit bis zum nächsten bekannten Gen, CG3626 in dieser Richtung und CG3556 in proximaler Richtung, noch dem *omb* Locus zugehörig ist. Diese Abgrenzung basiert im 3' Bereich auf genetischen Daten und im 5' Bereich auf der Aktivität von enhancer trap Insertionen. Sie muss aber in künftigen Versuchen noch bestätigt werden.

Es gibt einige letale und drei weitere lebensfähige Allele, nämlich *bifid* (*bi*) und *lacquered* (*lac*), die die Entwicklung der Flügelvenen und der Flügelmorphologie beeinflussen sowie *Quadroon* (*Qd*), in dem die Pigmentierung des Abdomens verändert ist.

Bei Northern Blot Analysen wurden 15 Transkripte nachgewiesen, von denen aber nur zwei den Bereich aller letalen Bruchpunkte für *omb* umspannen (Pflugfelder et al., 1992a), nämlich das 70kb große Primärtranskript T7 und das durch Spleißen daraus entstehende 6kb große Transkript T3, das für OMB codiert (Poeck et al., 1993a). Das Primärtranskript besteht aus acht Exons und sieben Introns. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung dieser Genomregion nach Pflugfelder und Heisenberg (Pflugfelder and Heisenberg, 1995). Am 3' Bereich der Transkriptionseinheit schließt sich eine große in drei Hauptdomänen unterteilte regulatorische Region an, genannt „*Optic lobe regulatory region*“ (OLR). Deren Funktion in der Entwicklung der optischen Loben, daher der Name, wurde bereits ausführlich untersucht ((Brunner et al., 1992); (Hofmeyer et al., 2008)). Auch vom 5' Bereich, der sogenannten „*upstream regulatory region*“ (URR), wird vermutet, dass es regulatorischen Einfluss auf die *omb* Expression besitzt. Es konnte bereits ein Flügel-Enhancer in dieser Region nachgewiesen werden (Sivasankaran et al., 2000). Abbildung 3 gibt einen Überblick über diese Region. Um diesen Befund zu bestätigen und weitere regulatorische Elemente in dieser Region aufzuspüren, wurden Deletionslinien mit Hilfe von P-Elementen erzeugt.

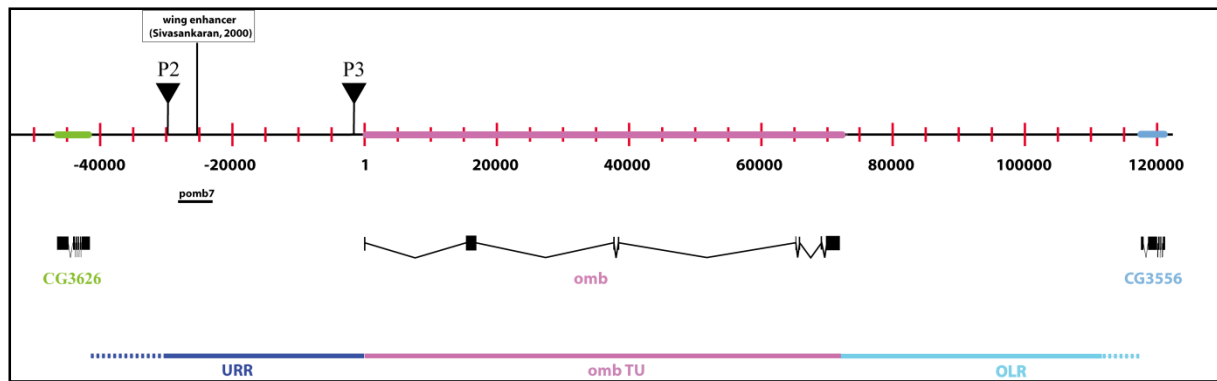


Abbildung 3: Die Graphik zeigt eine schematische Übersicht über den omb Locus. Entgegen der ursprünglichen Veröffentlichung (Pflugfelder and Heisenberg, 1995) wurde die Nummerierung der Basen verändert. Position eins bezieht sich nun nicht mehr auf den distalen Bruchpunkt von In(1)ombH31, sondern auf den Start der Transkriptionseinheit. Die Transkriptionseinheit ist in violett zu sehen. Die Intron-Exon Struktur des Transkriptes ist darunter angegeben. Boxen stehen für die Exons, Linien für die Introns. In Hellblau ist die OLR gezeigt, die sich bis nahe an CG3556 erstreckt. Die Zugehörigkeit dieser Region muss noch geklärt werden. Ähnlich verhält es sich mit der URR, die dunkelblau eingetragen ist. Der bereits gefundene Flügelenhancer (Sivasankaran et al., 2000) ist an entsprechender Stelle eingetragen. Die P-Elemente P2 und P3 sind als schwarze Dreiecke eingezeichnet.

Als P-Elemente wird eine Gruppe von transposablen Elementen im Genom von *Drosophila* bezeichnet, (Übersicht: (Engels, 1989); (Rio, 1990)) die sich durch konservierte invertierte Sequenzwiederholungen an beiden Enden auszeichnen. Daneben gibt es noch weitere Familien mobiler Elemente, wie beispielsweise die FB-Elemente. Ein intaktes wildtypisches P-Element ist etwa 2,9kb groß und enthält zwischen den terminalen invertierten Sequenzwiederholungen (31bp; (O'Hare and Rubin, 1983)) vier Exons und drei Introns. Die Exons kodieren für das Enzym Transposase, das für seine Mobilisierung nötig ist ((Spradling and Rubin, 1982), (Engels, 1984)). Diese wird durch Translation einer 2,5kb großen mRNA, die durch Splicing entsteht, exprimiert. Dieser Prozess findet in der Keimbahn statt und führt zu einem funktionellen Enzym. In den somatischen Zellen, findet man eine größere mRNA, die das dritte Intron noch enthält, und zu keinem funktionellen Enzym führt. Die Insertionsstelle des P-Elements ist durch eine acht Basenpaare große Genomduplikation gekennzeichnet (Engels, 1989). Obwohl P-Elemente keine ausgeprägte Sequenzpräferenz haben, ist doch eine Bevorzugung des 5' Bereiches von Transkriptionseinheiten zu sehen. ((Spradling et al., 1995); (Liao et al., 2000)).

Die durch Transposase initiierte Exzision der P-Elemente erfolgt nicht immer genau an der Insertionsstelle. Es können dabei auch P-Element Reste im Genom verbleiben oder aber Bereiche flankierender genomischer DNA mit entfernt werden (Engels et al., 1990). Auf diese

Weise entstehen oft unvollständige P-Elemente, die über keine eigene funktionelle Transposasequelle mehr verfügen. Es ist aber dennoch möglich, soweit die invertierten Enden noch vollständig vorhanden sind, beispielsweise durch das Einkreuzen externer Transposasegene, eine Mobilisierung dieser Elemente hervorzurufen.

Dies macht P-Elemente, auch in dieser Arbeit, zu einem wichtigen molekularen Werkzeug um beispielsweise Deletionen an bestimmten Stellen des Genoms zu erzeugen, ((Daniels et al., 1985); (Cooley et al., 1990); (Green and Shepherd, 1979)), eigene Konstrukte in das Genom einzubringen ((Heslip and Hodgetts, 1994); (Nassif and Engels, 1993)) oder zu ersetzen (Gloor et al., 1991).

Durch eine durch die Transposition solcher P-Elemente generierte Deletion einer ca. 30kb großen, oberhalb der Transkriptionseinheit (TU) gelegenen Region soll in dieser Arbeit die Funktion dieser Region näher untersucht werden. Dazu wurden bereits früher zwei P-Elementinsertionslinien durch Rekombination auf ein Chromosom gebracht. Durch die gleichzeitige Mobilisierung dieser P-Elemente, P2 und P3, sollte eine Deletion, die diese Region umspannt, erzeugt werden. Über 30 Linien, die in diesem Deletionsexperiment erzeugt wurden, sollten molekular analysiert werden. Eine Mutante, die den Verlust der gesamten Region zwischen den P-Elementen P2 und P3 nachweislich trägt, wurde ausgewählt und auf phänotypische Effekte hin untersucht.

Daneben wurde in dieser Arbeit noch die molekulare Charakterisierung der Insertionslinien, omb[P6] und Quadroon[For], begonnen.

Durch Punktmutationen in bestimmten Domänen sollten außerdem weitere Erkenntnisse über die Eigenschaften von Omb erzielt werden.

I-A-2.1 Die Insertion omb[P6]

Das P-Element P6 ist in der Linie omb[P6] wenige Basenpaare upstream eines alternativen Transkriptionsstartpunktes (Scharf, 2002) und etwa 1,5 kb upstream von Exon II des publizierten Transkriptes inseriert ((Pflugfelder et al., 1992a), (Diegelmann, 1999)). Durch Mobilisierung dieses P-Elementes und dem damit erhofften Verlust benachbarter genomischer Sequenzen, wurde versucht, diesen alternativen Transkriptionsstart zu eliminieren. Auf diese Weise sollte eine OMB Protein-Nullmutante erzeugt werden können. Eine Reihe von Fliegenlinien wurde nach der P-Element Mobilisierung durch Transposase

molekular analysiert. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht über die entsprechende genomische Region.

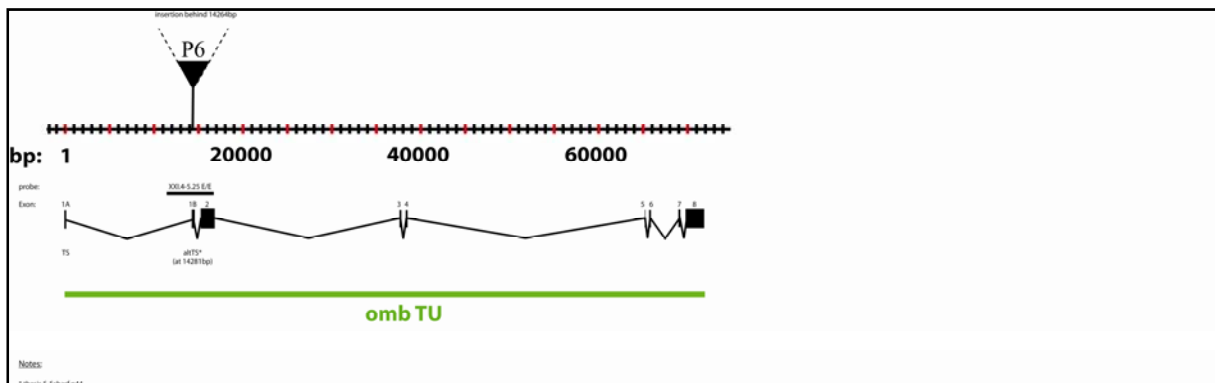


Abbildung 4: Insertionsort des P-Elementes P6 im *omb* Lokus. Durch die Nähe zur alternativen Transkriptionsstartstelle und zu einem obligaten Intron, besteht durch Mobilisierung von P[6] die Chance, eine vollständige *Omb* Protein-Nullmutante zu erstellen.

I-A-2.2 Die Insertion Quadroon[For]

Quadroon bezeichnet eine Gruppe von *omb* Allelen, in denen vor allem die erweiterte Pigmentierung der abdominalen Tergiten in beiden Geschlechtern auffällt. Qd1 wurde als Spontanmutante von Thompson 1959 isoliert (Thompson, 1959). Qd1 enthält zwei Insertionen im *omb* upstream Bereich (Pflugfelder and Heisenberg, 1995).

Das Allel Quadroon[For] wurde von Marc Fortini isoliert und enthält ein hochmobiles transposables Foldback Element, das, entgegen den bekannten „hot spots“ von P-Element Insertionen im 5'-Bereich, downstream der TU inseriert ist. Bislang waren nur die Endsequenzen der Insertion bekannt. Um zu verstehen, wie Qd[For] die Expression von *omb* in bestimmten Geweben verstärken kann, sollte die molekulare Analyse des auf 20 kb geschätzten Elementes fortgeführt werden.

I-A-2.3 Mutationen in der Omb T-Domäne

I-A-2.3.1 ATCUN Bindestelle in Omb

Bei der ATCUN (Amino-terminal Cu(II) and Ni(II) binding motif; (Harford and Sarkar, 1995) handelt es sich, wie der Name sagt, um ein Metallionen bindendes Protein-Motiv. Kupfer- und Nickelionen sind für biologische und zellphysiologische Prozesse, wie beispielsweise die Bindung von freien Radikalen, von Bedeutung ((Regan, 1995); (Koch et al., 1997)). Krankheiten, wie Wilson's- und Menke's Syndrom werden einer Fehlfunktion im

Kupfertransport zugeschrieben (Bull and Cox, 1994). Die Beschaffenheit von Metallbindestellen kann durch Spektroskopie und die dreidimensionale Strukturanalyse der Proteine aufgeklärt werden (Ubbink et al., 2002). Dabei zeigte sich, dass das stets an dritter Position der Motivstruktur vorkommende und evolutionär konservierte Histidin von besonderer Bedeutung ist.

Neben dem menschlichen Speichelprotein Histatin-5 (Grogan et al., 2001), oder dem Neuropeptid neuromedin-C (Gasmi et al., 1997) wurde eine ATCUN-ähnliche Bindestelle auch in TBX3 gefunden. Dieses Motiv besteht aus dem Aminosäuretriplett Ser224Met225His226 (Sankararamakrishnan et al., 2005), liegt innerhalb der T-Domäne und ist in allen Tbx3 homologen Proteinen konserviert. Es ist nicht bekannt, ob dieses Motiv in Tbx3-Proteinen tatsächlich Metallionen binden kann und welche funktionelle Konsequenz eine solche Bindung hätte. Die Bedeutung des ATCUN Motivs sollte in Omb untersucht werden. Dazu wurde das an dritter Position des Motivs stehende His durch Punktmutation durch eine andere Aminosäure, Arginin, ersetzt, die strukturelle Ähnlichkeiten zu Histidin hat.

I-A-2.3.2 C. elegans Tbx2 und olfaktorische Adaption

Es wurden zwei Mutanten in *C. elegans* mit einem Defekt in der Adaptation an attraktive Geruchstoffe isoliert (Miyahara et al., 2004). Beide Mutationen betreffen das *C. elegans* Tbx2 Gen. Überraschenderweise ist jeweils die gleiche Aminosäure Lysin in der T-Domäne betroffen, die einmal zu Glutaminsäure, einmal zu Arginin mutiert ist. Die Wahrnehmung der Geruchstoffe, nachgewiesen durch unveränderte Chemotaxis, ist aber anscheinend nicht beeinflusst. Die betroffene Aminosäure ist in *Drosophila melanogaster* Omb konserviert (K431). Sie liegt in der Nähe von Aminosäuren, die nach dem Strukturmodell des menschlichen TBX3 Proteins Bedeutung für die DNA Bindung haben (Muller and Herrmann, 1997). Es wäre daher denkbar, dass die Mutation die Tbx-DNA Wechselwirkung (auf eine möglicherweise subtile Art) stört. Die Mutationen sind hypomorph, da Nullmutanten in *C. elegans* Tbx2 letal sind. Durch Einführung dieser Mutationen in das Omb Protein sollte ihr Einfluss auf die DNA Bindung zunächst in vitro untersucht werden.

I-A-2.3.3 OMB DNA Bindestelle

In dem *omb* Allel *I(1)omb[13]* wurde eine Mutation gefunden, die aus einem Aminosäureaustausch an der Stelle 508 von Alanin zu Valin besteht. Um den Einfluss dieser Mutation an der Stelle, die im humanen TBX3 konserviert ist, auf die DNA-Bindefähigkeit zu testen, wurde durch *site directed mutagenesis* ein OMB Konstrukt so konstruiert, dass es der Mutation entspricht. *Band Shift Essays* sollten die DNA-Protein Interaktion nach *in vitro* Translation des Konstrukts visualisieren (Sen, 2006)

I-A-2.3.4 omb-WRE

In der downstream der *omb* Transkriptionseinheit gelegenen *optic lobe regulatory region* (ORR) findet sich an Position 116036-116200, d.h. mehr als 116 kb entfernt vom *omb* Transkriptionsstartpunkt ein 164 bp Fragment („Fragment K“), welches als imaginales *Wingless response element* (WRE) fungiert. Die Aktivität dieses Enhancers entspricht in allen larvalen Geweben weitestgehend dem Expressionsmuster des diffusiblen Proteins Wingless. Anders als *wingless*, das auch im Embryo stark exprimiert wird, ist das ombWRE im Embryo inaktiv. Das WRE enthält eine Bindungsstelle (BS) für den Transkriptionsfaktor TCF, der am Ende der Wingless-Signalkaskade steht. Mutation dieser Bindungsstelle führt aber nicht zum völligen Verlust der Aktivität des WRE-Enhancers, sondern zu einem veränderten Expressionsmuster. In der larvalen Flügelimaginalscheibe zeigt das wildtypische WRE das für *wingless* charakteristische Expressionsmuster mit einem prominenten Streifen auf der dorso-ventralen (D/V) Kompartimentgrenze, mit einem Oval, das die *pouch*-Region umgibt und mit einem Streifen in der Notum-Region (Hofmeyer, 2001). Mutation der TCF-BS führt in der *pouch* zu einem invertierten Expressionsmuster: der WREmut Enhancer ist in der D/V-Region inaktiv, zeigt aber in proximaler und distaler Richtung zunehmende Aktivität. Das WRE enthält anscheinend Bindungsstellen für transkriptionelle Aktivatoren, deren Wirkung bei TCF-Bindung unterdrückt oder moduliert ist. Durch Vergleich des WREmut Expressionsmuster mit publizierten Expressionsmustern anderer Transkriptionsfaktoren (TF) und durch Analyse potentieller Bindungsstellen dieser TF im Bereich des WRE wurden einige Kandidatenproteine ermittelt, die für das veränderte Muster des WREmut verantwortlich sein könnten. Durch Mutation der entsprechenden Bindungsstellen sollte ihre Relevanz für das WREmut Muster ermittelt werden.

1-A-3 Enhancer-reporter-Konstrukte

Neben der Deletion der *omb* URR, sollten in dieser Arbeit durch verschiedene Enhancer-Reporter Konstrukte weitere in der Region vorhandene regulatorische Elemente aufgedeckt werden. Der dazu verwendete Enhancer-Tester Vektor pCPLZ besitzt hierfür eine Kopie des beta-Galaktosidase Gens unter dem Einfluss eines schwachen Promotors. Das potentiell regulativ aktive Sequenzstück wird dazu kloniert und das Konstrukt in Fliegen injiziert. Enthält das eingesetzte und jetzt an lacZ Expression gekoppelte Fragment regulatorische Bereiche, kann dessen Aktivität durch X-Gal Färbung sichtbar gemacht werden. Dazu sind bereits eine Reihe von Experimenten durchgeführt worden (Sivasankaran et al., 2000). Da diese Enhancer reporter Analyse die URR nicht lückenlos abdeckt, sollte das Experiment wiederholt und mit neuen Konstrukten vervollständigt werden (Abbildung 5). Eine Reihe von P-Element-Linien mit bereits etablierten Konstrukten, konnte von Ian Duncan bezogen und direkt analysiert werden. Einige weitere Fliegenstämme aus dem Vorgängerexperiment existierten nicht mehr, so dass in diesen Fällen zwar das Plasmid bezogen, aber neu in *Drosophila* injiziert werden musste. Schließlich sollten noch einige neue Konstrukte hergestellt werden, die die bisher fehlenden Sequenzbereiche umfassen und mit den Nachbarsequenzen überlappen, um die Analyse von Sivasankaran et al. aus dem Jahre 2000 zu vervollständigen.

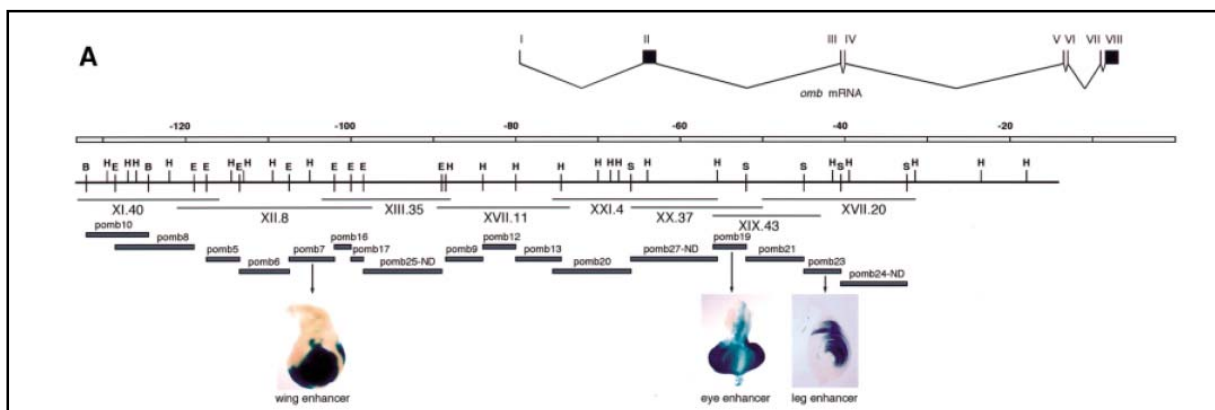


Abbildung 5: Die Abbildung zeigt die Analyse der *omb* URR nach Sivasankaran (2000). Der Flügelenhancer wurde im cDNA Fragment pomb7 entdeckt. Das Fragment pomb25 wurde, wie in der Abbildung zu sehen ist, nicht bearbeitet und soll in dieser Arbeit untersucht werden. Es existieren ebenfalls Lücken an manchen Stellen durch Nicht-Überlappen der cDNA Fragmente. An anderer Stelle wurden weitere Enhancer gefunden (Auge und Bein), die hier aber nicht von weiterer Bedeutung sind.

I-B Das Protein Org-1 (Optomotor-blind related gene-1)

Wie *optomotor-blind* gehört auch *optomotor blind related gene 1* zur Familie der T-Box Gene. *Org-1* ist homolog zum TBX1 Gen der Vertebraten. Für TBX1 besteht ein Zusammenhang zum DiGeorge Syndrom, einer unter der Bezeichnung CATCH22 (Driscoll et al., 1992) zusammengefassten Gruppe von Defekten. DiGeorge Syndrom ist die häufigste durch Deletion ausgelöste menschliche Erbkrankheit, was *Drosophila org-1* zu einem interessanten Modellgen macht (Porsch et al., 1998).

Org-1 wurde 1998 von Porsch et al. bei einem Screen einer *Drosophila* Cosmid Bibliothek nach weiteren, zu *omb* verwandten, *Drosophila* T-Box Genen mit einer gegen die T-Box Sequenz gerichteten Sonde identifiziert, kloniert und molekular analysiert. Das Gen ist, wie *omb*, auf Chromosom X lokalisiert. Die zytologische Position ist 7E3-4;7F1-2. Die etwa 8,5kb große Transkriptionseinheit besteht aus acht Exons und sieben Introns. (Porsch et al., 1998). Ektopische Expression von *org-1* führt in der Antenne zur Umwandlung des kompletten dritten Segmentes in ein Beinsegment. Auch die Beinentwicklung ist betroffen. So sind die proximalen Segmente stark verkürzt, während die distalen miteinander verschmelzen. Im Auge wird bei ektopischer *org-1* Expression die Anzahl der Ommatidien um ca. 15% erhöht. Bei ektopischer Expression in einem späteren Entwicklungsstadium gehen die Borsten zwischen den Ommatidien verloren, wie in Abbildung 6C zu sehen ist (Porsch et al., 2005).

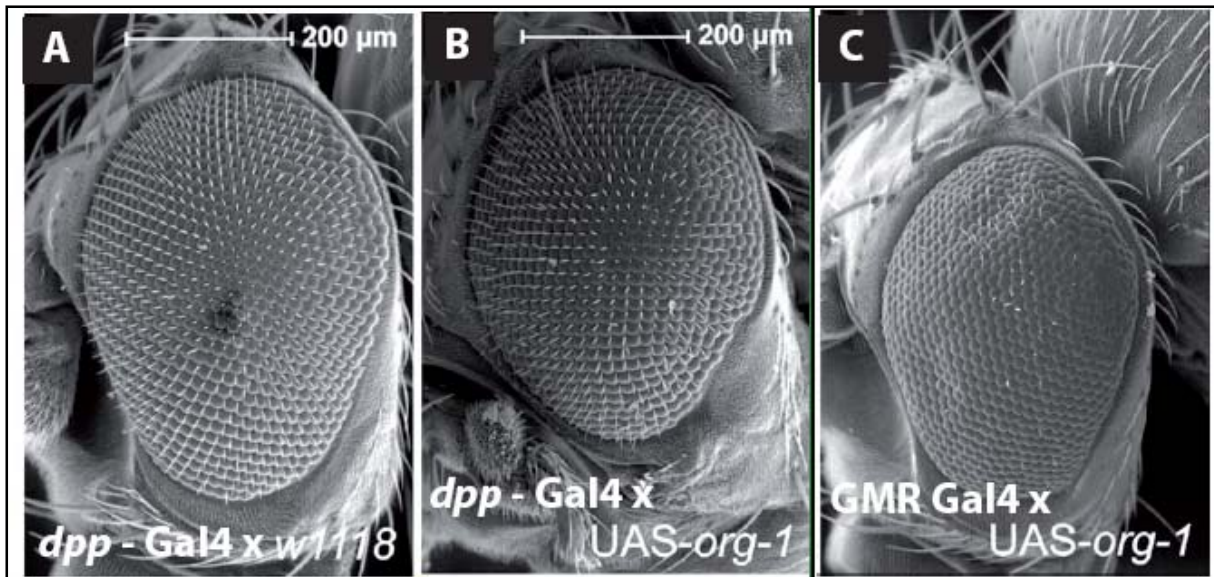


Abbildung 6: Wildtypische Expression (A), Überexpression getrieben mit *dpp*-Gal4 (B) und GMR Gal4 (spätere Entwicklung; C). Das Fehlen der Borsten zwischen den Ommatidien ist in C deutlich erkennbar (aus Porsch et al, 2004).

Org-1 lässt sich konzeptionell in drei Domänen unterteilen, die N-(terminale), T- (box) und C-(terminale) Domäne. Durch Austausch-Experimente der Domänen untereinander und mit denen des verwandten T-Box Genes *omb* wurden Erkenntnisse zur Funktion dieser Domänen gewonnen (Porsch et al., 2005). In seiner C-terminalen Domäne besitzt Org-1 sowohl Glutamin-reiche, als auch Alanin-reiche Trakte. Abbildung 7 zeigt deren Lokalisation im Protein. In Abbildung 8 sind zur besseren Übersicht alle Glutamine und Alanine gekennzeichnet, nicht nur die Cluster. Da, wie in den folgenden Kapiteln angesprochen, Glutamin-reiche Regionen möglicherweise Transaktivatorfunktion haben, während Alanin-reiche Regionen mit Repression von Genexpression in Zusammenhang stehen, wurde in dieser Arbeit begonnen, Konstrukte von Org-1 zu generieren, die über verschieden große Homopolymertrakte dieser beiden Aminosäuren verfügen. Künftige Expressionsstudien in Zellkultur und an transgenen Fliegen sollen weiteren Aufschluss über die Funktion solcher Homopolymertrakte liefern und so unter Umständen zur Aufklärung der Mechanismen der durch Homopolymertraktexpansionen verursachten Krankheiten beitragen.

Aminosäuresequenz des *Drosophila* Tbx1 (ORG-1)

1	MTHLMGPTEC	AGAMMTTTSM	QFLDTSLTDY	NCYGNDYWTS	PYMTGGLSPM
51	KQIEACIQTA	GKDRSSYKPL	EQIDAKLADI	ETHSTGSTGT	ANSNSSTSSI
101	SNPSCPDQSS	SSSSSSVSLP	TDYAGVHSEA	SMAPTAGGTA	VTTTSAGGVS
151	ASTASKKFKG	QHKKDNNSAE	NGTVKPNSHN	ISKGESEPVH	PSLAQAIIVVL
201	ETKALWDQFH	AQGTEMIITK	TGRRMFPTFQ	VRIGGLDPHA	TYICMMDFVP
251	MDDKRYRYAF	HNSCWVVGK	ADPISPPRIH	VHPDSPAVGS	NWMKQIVSFD
301	KLKLTNNQLD	ENGHIILNSM	HRYQPRFHLV	YLPPKNASLD	ENEHSSHFRF
351	FIFPETSFTA	VTAYQNQRVT	QLKISSNPFA	KGFRDDGTND	VTTGGGSSMS
401	SMSHESQARM	KQQQQQQQQQ	QQQQLQQQQQ	QQQQLKERTA	ATSNFGLSCS
451	ELAIEQQQQQ	QQQQGVLQLP	ATPSSSSTSG	NSPDLLGYQM	EQQLQQQHQQ
501	QQQQQHQSQQ	QHLHQQHQAN	QQQSLQQSQ	NHTQYGSYHH	AYQAQVQSHP
551	LTPHSSSSAS	PPATAAPGAS	AATAAVAAAA	AAAAAVAGGG	AGAGGATSAT
601	QVMSAANIYS	SIGQPYAQEQ	SNFGAIYHHN	AAAAAAHYH	HGHAHGHAS
651	HAHAHAHGPY	ASAYDKLKVS	RHAAAAAYGM	GATYPSFYGS	AAHQMMRPN
701	SYIDLVP				

Abbildung 7: Aminosäuresequenz von Org-1. Blau hervorgehoben ist die konservierte T-Domäne (70%). In rot sind die Org-1 eigenen Polyglutamin- und Polyalanintrakte zu sehen. Berücksichtigt wurden in dieser Darstellung nur Wiederholungen von mindestens fünf Aminosäuren. In violett sind die konservierten letzten Aminosäuren dargestellt.

Aminosäuresequenz des *Drosophila* Tbx1 (ORG-1)

1	MTHLMGPTEC	AGAMMTTTSM	QFLDTSLTDY	NCYGNDYWTS	PYMTGGLSPM
51	KQIEACIQTA	GKDRSSYKPL	EQIDAKLADI	ETHSTGSTGT	ANSNSSTSSI
101	SNPSCPDQSS	SSSSSSVSLP	TDYAGVHSEA	SMAPTAGGTA	VTTTSAGGVS
151	ASTASKKFKG	QHKKDNNSAE	NGTVKPNSHN	ISKGESEPVH	PSLAQAIIVVL
201	ETKALWDQFH	AQGTEMIITK	TGRRMFPTFQ	VRIGGLDPHA	TYICMMDFVP
251	MDDKRYRYAF	HNSCWVVGK	ADPISPPRIH	VHPDSPAVGS	NWMKQIVSFD
301	KLKLTNNQLD	ENGHIILNSM	HRYQPRFHLV	YLPPKNASLD	ENEHSSHFRF
351	FIFPETSFTA	VTAYQNQRVT	QLKISSNPFA	KGFRDDGTND	VTTGGGSSMS
401	SMSHESQARM	KQQQQQQQQQ	QQQQLQQQQQ	QQQQLKERTA	ATSNFGLSCS
451	ELAIEQQQQQ	QQQQGVLQLP	ATPSSSSTSG	NSPDLLGYQM	EQQLQQQHQQ
501	QQQQQHQSQQ	QHLHQQHQAN	QQQSLQQSQ	NHTQYGSYHH	AYQAQVQSHP
551	LTPHSSSSAS	PPATAAPGAS	AATAAVAAAA	AAAAAVAGGG	AGAGGATSAT
601	QVMSAANIYS	SIGQPYAQEQ	SNFGAIYHHN	AAAAAAHYH	HGHAHGHAS
651	HAHAHAHGPY	ASAYDKLKVS	RHAAAAAYGM	GATYPSFYGS	AAHQMMRPN
701	SYIDLVP				

Abbildung 8: Aminosäuresequenz von Org-1. Blau ist, wie in Abbildung darüber die zu 70% konservierte T-Domäne angezeigt. Im Gegensatz zu obiger Abbildung sind hier aber alle Glutamine und Alanine berücksichtigt, was die Polymertrakte aber dennoch deutlich zu Tage treten lässt.

I-B.1 Polyglutamin Trakte und deren Expansion

Beim Menschen ist eine Reihe von Krankheiten bekannt, die auf Expansionen in für Glutamin kodierenden Genbereichen basieren. Beispiele dafür sind Huntington's Disease, Kennedy's disease oder einige Formen von spinocerebellar Ataxien (Cummings and Zoghbi, 2000). Krankheitsbilder treten zumeist ab einer Länge von mehr als 37 Glutaminen auf (Schaffar et al., 2004). Die expandierten Polyglutaminstränge bilden dabei fibrilläre Strukturen (Ross et al., 1998). Sie können auch mit den normalen Glutamin-reichen Trakten anderer endogener Proteine koaggregieren (Gatchel and Zoghbi, 2005). Da glutaminreiche Trakte vor allem auch bei Transkriptionsfaktoren vorkommen, wie beispielsweise dem TATA Bindepotein, wird der Verlust dieser koaggregierenden Proteine neben der Toxizität der Aggregate selbst als ein pathogener Mechanismus diskutiert ((Wytttenbach, 2004); (Herbst and Wanker, 2006)).

Als Entstehungsmechanismus der Expansionen wird eine durch die für Glutamin kodierenden CAG Tripletwiederholung verursachte Ausbildung von Sekundärstrukturen während der Replikation und daraus resultierendes „Slippage“ der Polymerase diskutiert (Pearson et al., 2005).

Viele der bekannten, nicht pathogenen Glutamin-reichen Trakte sind Bestandteil konservierter Aktivierungs- Domänen von Transkriptionsfaktoren ((Callewaert et al., 2003); (Ambra et al., 2004)). Bei *Drosophila* gibt es etwa 30 Gene mit einer Glutaminregion von 20 und mehr Aminosäuren. 22 der 30 gehören zu bekannten Transkriptionsfaktoren (Bettencourt et al., 2007). Auch das T-Box Protein Org-1 von *Drosophila melanogaster* besitzt eine glutaminreiche Region in seiner C-Domäne. Modifikationen in seiner Länge und die Deletion sollen weiteren Aufschluss über die Funktion solcher Trakte geben.

I-B.2 Polyalanin Trakte und deren Expansion

Neben Polyglutamin (poly-Q) Trakten existieren auch andere Aminosäuren in homopolymerer Form und spielen eine Rolle bei menschlichen Erbkrankheiten (Karlin et al., 2002). Besonders für Polyalanin (poly-A) Trakte wurde ein Zusammenhang zwischen Traktelongation und klinischen Syndromen gezeigt, wengleich die Mechanismen, die dazu führen, noch weitgehend unbekannt sind. Ein Beispiel dafür ist Synpolydactylie (SPD), ein dominant vererbtes Syndrom, dass unter anderem Verwachsungen der Finger sowie überzählige Finger erzeugt. Zurückgeführt werden konnte es auf eine 7-14 Aminosäuren umfassende Expansion einer 15 Alanine umfassenden N-terminalen Domäne des HOXD13

Gens ((Muragaki et al., 1996); (Goodman, 2002)). Die Schwere des Phänotyps korreliert mit der Zahl an zusätzlichen Alaninen (Goodman et al., 1997). Weitere Beispiele für durch Polyalanin Expansion bedingte Krankheiten sind Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD; (Brais et al., 1998)), Cleidocranial dysplasia (CCD; (Mundlos et al., 1997)) und verschiedene Formen von X-gekoppelter mentaler Retardation ((Bienvenu et al., 2002); (Stromme et al., 2002); (Partington et al., 1988)).

In der Vergangenheit wurden Alanin-reiche Regionen in Transkriptionsfaktoren mit Platzhalter-Funktion in Zusammenhang gebracht, die dafür sorgt, dass andere Domänen richtig positioniert sind. (Karlin et al., 2002). Aber auch transkriptions-reprimierende Funktionen wurden ihnen zugeschrieben. Allerdings, selbst wenn Alanin-reiche Regionen in Repressorelementen gefunden wurden, gibt es bislang keine Evidenz, dass sie alleine zur Repression ausreichend sind ((Han and Manley, 1993); (Hanna-Rose and Hansen, 1996)).

Im Gegensatz zu Polyglutamin Expansionen scheinen Polyalanin Expansionen meiotisch und somatisch stabil zu sein. Während normale Glutamin-Homopolymertrakte bis zu 40 Aminosäuren umfassen können, sind es bei poly-A Trakten meist weniger als 20 Aminosäuren. Während pathogene expandierte Q-Homopolymertrakte sehr lang sein können, sind sie bei Alanin in der Regel nicht größer als 30 Aminosäuren.

Während man die Entstehung von polyQ Expansionen durch „strand slippage“ und der Ausbildung von einzelsträngigen Sekundärstrukturen während der Replikation erklärt (Sinden et al., 2002), geht man bei der Entstehung der Polyalanin Expansionen von ungleichem Crossing over aus (Warren, 1997).

Um die Funktion von Polyglutamin und Polyalanin Trakten in Transkriptionsfaktoren besser verstehen zu können, wurde in dieser Arbeit damit begonnen, das *Drosophila* T-Box Protein Org-1 zu modifizieren. Org-1 besitzt sowohl eine Glutamin-reiche, als auch eine Alanin-reiche Region. In verschiedenen Derivaten sollten diese Regionen entweder durch verschieden lange Homopolymere ersetzt oder vollständig deletiert werden.

1-C Decapentaplegic (Dpp)

Das *Drosophila* Gen *decapentaplegic* (*dpp*) kodiert für ein Protein, das der TGF- β (Transforming Growth Factor beta) Großfamilie angehört und ortholog zu BMP2 und BMP4 der Vertebraten ist (Padgett et al., 1993). Die Proteine dieser Genfamilie sind sowohl in Vertebraten, als auch in Invertebraten an einer Reihe von basalen Entwicklungsprozessen beteiligt, wie beispielsweise Zellproliferation, Zellspezifikation oder Zelltod. Zusammen mit den Produkten der *Drosophila* Gene *glass bottom boat* (*gbb*) und *screw* (*scw*) wird Dpp der BMP Unterfamilie (Bone Morphogenic Proteins) zugeordnet.

Da der zuerst beobachtete Mutanten-Phänotyp 15 epidermale Defekte erkennen ließ, bekam das 1987 von Padgett identifizierte Gen den griechischen Namen *decapentaplegic* (Spencer et al., 1982). Lokalisiert wurde das Gen an der zytologischen Position 22F1-22F3. Das 588 Aminosäuren umfassende Primärprodukt wird durch Endoproteolyse auf eine Größe von 132 Aminosäuren reduziert. Die entfernte, sogenannte Prodomäne ist für die korrekte Faltung des funktionellen Liganden mitverantwortlich (Wharton et al., 1996). Bei *Drosophila* ist DPP während der Embryonalentwicklung an einer Reihe wichtiger Prozesse beteiligt. So dient der DPP Gradient bei der embryonalen Musterbildung der Positionsbestimmung entlang der dorso-ventralen Achse ((Irish and Gelbart, 1987); (Wharton et al., 1993); (Ray et al., 1991)) und ist an der Tracheenentwicklung ((Vincent et al., 1997); (Wappner et al., 1997)) und der Determinierung von mesodermalem Gewebe zu somatischem oder visceralem Gewebe beteiligt ((Panganiban et al., 1990); (Hursh et al., 1993)).

In späteren Entwicklungsstadien ist Dpp an der anterior-posterioren Musterbildung der Flügel- und Beinimaginalscheiben beteiligt ((Campbell et al., 1993); (Nellen et al., 1996); (Morimura et al., 1996)). Dpp wird dabei in einem schmalen Streifen anteriorer Zellen entlang der A/P-Kompartementgrenze der Flügelimaginalscheibe exprimiert ((Basler and Struhl, 1994)). Auch in der Entwicklung der optischen Loben (Kaphingst and Kunes, 1994), sowie der Bildung der morphogenetischen Furche in der Augenentwicklung ist Dpp von Bedeutung (Heberlein et al., 1993). Bei der Oogenese und der Flügelvenenentwicklung in der Puppe spielt Dpp ebenfalls eine wichtige Rolle ((Twombly et al., 1996); (Yu et al., 1996)).

Der DPP-Signaltransduktionsweg funktioniert, wie auch für andere Mitglieder der BMP Familie gezeigt wurde, über einen Rezeptorkomplex aus zwei Typl (*tkv*) und zwei Typll (*put*) Serin/Threonin-Kinasen (Übersicht: (Massague, 1998), (ten Dijke et al., 1996)). Dabei bindet der dimere Ligand an den Rezeptorkomplex. Der Typll Rezeptor phosphoryliert dann den

Typ1 Rezeptor an der GS-Box, der so aktiviert wird und wiederum das Signalprotein (Mad) phosphoryliert. Dieses interagiert mit weiteren Partnern (Medea) und kann dann in den Nukleus einwandern. Dort findet anschließend durch Protein-DNA Interaktion, zusammen mit weiteren Kofaktoren, zellspezifische Genregulation statt.

Da Dpp als Morphogen ausgehend von einer diskreten Quelle weniger Zellen einen Gradienten über eine Vielzahl von Zellen (etwa 30) aufbaut, stellt sich die Frage nach dem Transport- oder Diffusionsmechanismus. Zunächst ging man von Diffusion des freien Liganden aus, was aber durch Experimente als nicht ausreichend eingestuft wurde ((Teleman and Cohen, 2000); (Entchev et al., 2000)). Die Geschwindigkeit, mit der der Gradient aufgebaut wird, lässt auch auf Endocytose-vermittelte Mechanismen schließen. Des Weiteren wurde eine tragende Rolle der Extrazellulären Matrix bei dem Transportprozess von DPP diskutiert. Dabei spielt unter Umständen ein Bereich geladener Aminosäuren im N-Terminus des Liganden eine wichtige Rolle (Roth, 2003). Um darüber weiteren Aufschluss in vivo zu erhalten, sollten in dieser Arbeit modifizierte Dpp-Konstrukte hergestellt werden. In einem davon wurde die Domäne dupliziert, in einem weiteren deletiert. Als in vivo Marker wurde Green fluorescent protein (GFP) in das Konstrukt eingefügt. Abbildung 9 zeigt ein Schema des zu konstruierenden Fusionsproteins und seiner Domänen.

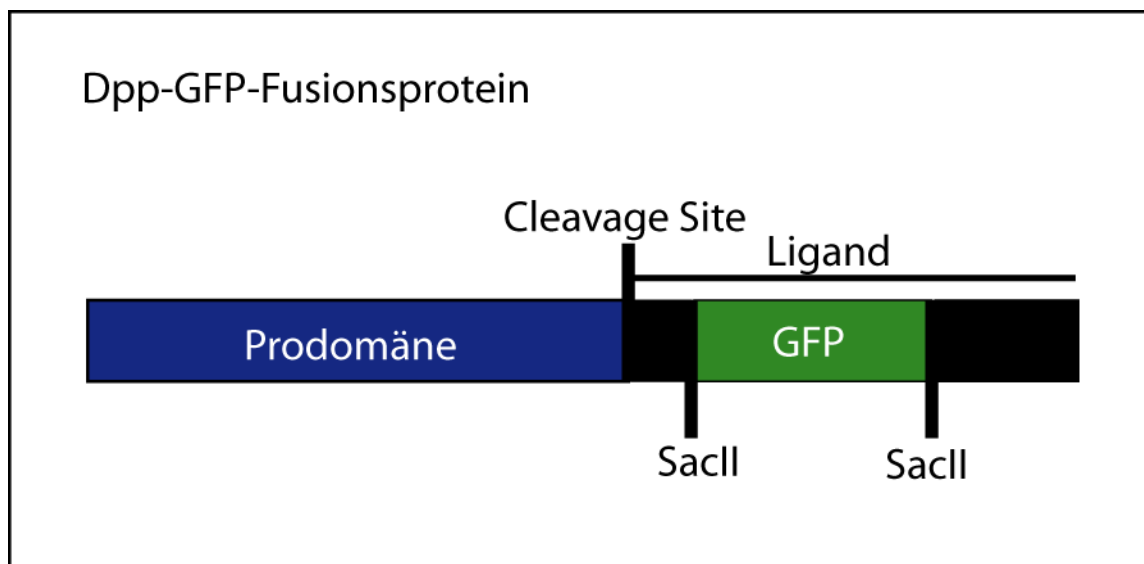


Abbildung 9: Schematische Darstellung des fertigen Dpp-GFP-Fusionsproteins. Die in blau eingezeichnete Domäne wird in vivo abgespalten und dient wohl nur der richtigen Strukturgebung des Liganden, der hier schwarz eingezeichnet ist. Mittels künstlich eingefügten SacII Schnittstellen wurde die für GFP kodierende Sequenz kurz hinter der Cleavage Site eingefügt.

I-D Sammlungen von *Drosophila* Deletionslinien

Für viele wissenschaftliche Experimente an *Drosophila*, beispielsweise der Funktionsanalyse und Kartierung von Genomregionen, ist es von Vorteil, Fliegenlinien zur Hand zu haben, die an bekannter Stelle im Genom Defizienzen aufweisen. Angefangen von der ersten Deletionsisolation 1914, beschrieben 1916 von Bridges (Bridges, 1916), wurden inzwischen bereits mehrere Tausend Defizienzlinien von verschiedenen Arbeitsgruppen erzeugt. Daraus wurde eine Stammsammlung erstellt (Bloomington *Drosophila* Stock Center, BDSC; <http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/df-dp/dfkit.htm>), deren Ziel es war, ortsdefinierte Defizienzen so zu organisieren, dass diese möglichst das gesamte Genom von *Drosophila melanogaster* abdecken und der wissenschaftlichen Öffentlichkeit nach Bedarf zur Verfügung stehen.

So stehen dort heute etwa 270 Linien bereit, die ca. 92% des euchromatischen Genoms von *Drosophila* mit unterschiedlichen Deletionen umfassen (BDSC; <http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/df-dp/dfkit.htm>). So hilfreich diese Sammlung auch ist, so hat sie doch einige Nachteile, die die Entwicklung einer neuen Generation von Defizienzensammlung nötig erscheinen ließen. Einerseits besitzt die BDSC-Sammlung einen heterogenen genetischen Hintergrund, der sich aus ihrer Entstehungsgeschichte ableitet. Inzwischen zeigten Untersuchungen, dass der genetische Hintergrund einen starken Einfluss auf Genexpression haben kann (z.B. (Jin et al., 2001)). Dies limitiert unter Umständen die Aussagekraft, der mit diesen Linien gewonnenen Erkenntnisse. Ein weiterer Nachteil ergibt sich aus der ungenauen Positionsbestimmung der Defizienzen im Genom. Während heute die Bruchpunkte durch molekulare Techniken basenpaargenau analysiert werden können, besitzt die früher benutzte zytologische und genetische Methodik mit 50-100kb eine wesentlich gröbere Auflösung.

Um nun in diesen Punkten verbesserte Defizienzen zur Verfügung zu haben, wurde in zwei unabhängigen Projekten, genannt Exelixis und DROSDel, versucht, neue, das Genom umfassende Sammlungen aufzubauen ((Parks et al., 2004), (Thibault et al., 2004), (Ryder et al., 2004), (Ryder et al., 2007)). In beiden Ansätzen machte man sich durch Flippase induzierte Rekombination zwischen zwei mit Hilfe verschiedener transposabler Elemente eingebauter FRTs zu Nutze (FRT = flippase recombination target). Dieses Verfahren erlaubt die Deletion von genomischem Material zwischen zwei, durch die FRTs basengenau definierten, Orten.

Um das zweite Problem zu beheben und die Homogenität des genetischen Hintergrundes zu garantieren, wurden isogenisierte Transposon-tragende und Balancer-tragende Fliegenstämme hergestellt und benutzt. Wenngleich auch langfristig über die Generationen Divergenz zwischen den Linien entstehen wird, so können doch mittelfristig Hintergrundeffekte bei Experimenten mit diesen Fliegenstämmen minimiert werden.

Während die Exelixis-Sammlung bisher 519 Deletionen von durchschnittlich 140 kb Größe bei einer Abdeckung von bisher 56% des Euchromatins beinhaltet (Parks et al., 2004), wurden in der DROSDEL-Sammlung 665 Deletionen mit einer Durchschnittsgröße von 386 kb und einer Abdeckung von 77% des euchromatischen Genoms erstellt (Ryder et al., 2007). Die gewählte mittlere Größe stellt dabei einen Kompromiss zwischen Auflösung und Gesamtzahl der benötigten Linien, die das gesamte *Drosophila*-Genom beinhalten, dar. Auch nach oben ist eine Grenze gesetzt, da von Ashburner gezeigt wurde, dass mehr als 1Mbp Sequenzverlust von *Drosophila* meist auch den Verlust der Lebensfähigkeit zur Folge hat (Ashburner and Bergman, 2005).

Da aufgrund von Überlebens- oder Balancierungsproblemen einiger Stämme deren Haltung in Stockcentern nicht möglich ist, wurde ein DROSDEL „Core-kit“ von derzeit 209 Linien erstellt, der eine Abdeckung von 60% des Euchromatins erzielt. Durch die öffentliche Verfügbarkeit der verschiedenen P-Elementlinien können außerdem weitere Deletionen nach Wunsch hergestellt werden.

Während die Exelixis-Linien wegen ihrer Größe eine feinere Auflösung einer bestimmten genomischen Region zulassen, sind die DROSDEL-Linien für Genom-umfassende Fragestellungen geeigneter, da durch ihre Größe ein geringerer Arbeitsaufwand bei gleichzeitig akzeptabler Auflösung nötig ist.

Das DROSDEL Projekt wurde von einem Konsortium europäischer Laboratorien durchgeführt. Die Herstellung der Deletionslinien wurde dabei nach (Teil)chromosomarmen aufgeteilt. In dieser Arbeit wurde die distale Hälfte des Chromosomenarms 3R zwischen den zytologischen Positionen 89 und 100E bearbeitet.

I-E Ziel dieser Arbeit

Die Arbeit ist in vier große Teile gegliedert.

Der Abschnitt A behandelt Aspekte der Regulation von *omb* und der Funktion des Omb Proteins. Dieser Teil befasst sich zunächst mit der Bedeutung von *cis*-Elementen für die *omb* Regulation. Durch Elimination der *upstream regulatory region* (URR) in der 5' Region der Transkriptionseinheit, sollten deren regulatorische Funktionen durch Charakterisierung des resultierenden Phänotyps festgestellt werden. Des Weiteren sollten potentielle Protein-Nullmutanten von Omb molekular charakterisiert werden, bei denen neben einem Exon auch ein später entdeckter alternativer Transkriptionsstartpunkt durch P-Element Mobilisation eliminiert sein könnte. Außerdem sollte das in der 3' Region inserierte, hochmobile transposable Element in Qd[For] molekular charakterisiert werden. Ein kleines Nebenprojekt befasst sich mit der molekularen Charakterisierung von In(1)ombH31, der ursprünglich zuerst entdeckten *omb*-Mutante, die bisher nur durch ihre chromosomalen Bruchpunkte definiert ist. Zuletzt wurden verschiedene Punktmutationen in die T-Domäne von Omb eingefügt, um deren Bindeeigenschaften zu untersuchen.

In Abschnitt B wurden Dpp-GFP Fusionskonstrukte hergestellt, mit deren Hilfe der Mechanismus der zur Ausbildung des über viele Zellen reichenden Gradienten des Morphogens Dpp in *Drosophila*-Flügelimaginalscheiben untersucht werden kann. Damit soll auch zum Verständnis der Regulation von *omb* beigetragen werden, das in der Flügelimaginalscheibe unter Dpp-Kontrolle steht.

In Teil C sollten verschiedene Derivate des Omb-verwandten Proteins Org-1 hergestellt werden. Mit ihrer Hilfe soll künftig der Einfluss von Polyalanin und Polyglutamin Trakten, und deren Expansionen über die normale Länge hinaus, auf die Funktion des Proteins *in vitro*, in Zellkultur und in transgenen Tieren untersucht werden.

Der letzte Teil dieser Arbeit (D) handelt von der Mitarbeit bei der Erstellung eines vollständigen und isogenen *Drosophila* Deletions-Linien-Kits. Eine der wichtigen Einsatzmöglichkeiten solch eines Deletions-Linien-Kits sind genetische Modifikator-Screens. In diesen wird systematisch der Einfluss eines veränderten genetischen Hintergrundes (d.h. der Deletionen) auf einen Phänotyp untersucht. Es ist daher von entscheidender Bedeutung, dass die Deletionen der einzige Unterschied im genetischen Hintergrund zwischen den verschiedenen Linien sind. Der DROSDEL Kit wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um genetische Modifikatoren der hypomorphen *omb* Mutante *bifid* zu isolieren. Das Ziel dieses

Screens ist die genetische Identifizierung von Omb-kontrollierten Genen (G. Pflugfelder, persönliche Mitteilung).

II. Material & Methoden

II-1. Verwendetes Material II-1.1 Fliegenstämme

Omb URR-Deletions- Linien

Diese 33 Linien kommen aus der Stammsammlung von G. Pflugfelder

Omb[P6] Linien

Diese Linien entstammen der Stammsammlung von G. Pflugfelder

Quadroon[FOR] Linie

Diese Linie stammt aus der Stammsammlung von G. Pflugfelder

Omb URR Enhancer reporter Linien

Diese Fliegen wurden von Ian Duncan bezogen

W[1118]

Die Linie stammt aus dem Stockcenter Bloomington (BDSC)

In(1)ombH31 - Linie

Die Linie wurde von G. Pflugfelder zur Verfügung gestellt.

DrosDel CoreKit Linien

Alle isogenisierten Ausgangsstämme wurden über das Konsortium zur Verfügung gestellt. Die Kreuzungsschemata hierzu sind in der entsprechenden Literatur zu finden (Ryder et al., 2004).

II-1.2 Laborgeräte

Eine detaillierte Liste der verwendeten Geräte ist im Folgenden aufgeführt.

Kleingeräte wie Thermoblöcke, Waagen, Vortex, Schüttler, etc. stammen von der Firma Hartenstein Laborversand Würzburg.

Verbrauchsmaterial wie beispielsweise Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Glaswaren wurden von Sarstedt, Hartenstein und Eppendorf geliefert.

PCR-Geräte

RoboCycler® Gradient 40	Stratagene®
T Gradient	Biometra
Mastercycler Gradient	Eppendorf

Elektrophorese

Sub Cell GT	Bio-Rad
Elektro 4	Hybaid
Vertikale Gelelektrophorese	Biometra
Gel Jet Imager	INTAS

Pipetten

Pipetman 200-1000µl	Gilson
Pipetman 20-200µl	Gilson
Pipetman 2-20µl	Gilson
Research 0,5 – 10µl	Eppendorf

Zentrifugen

Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge Sigma 3K20	Brown
Zentrifuge Rotina 35	Hettich
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

Sonstige Laborgeräte

UV Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene
Probe count	Inotech
Autoradiographie Cassetten	Dr. Goos suprema
Vacuum Blotter	Appligene
Mini Oven MGII	Hybaid
Hybridisation Oven	Hybaid
Wasserbad	Medigen W12
Schüttelinkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific
Mikrowellenofen	Clatronic

Optische Geräte

Binokular S6E	Leica
Mikroskop Axioplan2	Zeiss

II-1.3 Chemikalien und sonstiges Verbrauchsmaterial

Alle gängigen Laborchemikalien wurden von den Firmen AppliChem und Roth bezogen. Sonstiges Verbrauchsmaterial und andere Laborgegenstände, soweit nicht extra erwähnt, wurden über die Firmen Hartenstein, Sarstedt, Eppendorf, Roth und VWR bezogen.

II-1.4 Medien und Lösungen

DNA Isolation:

Chloroform/Isopentanol Lösung	24:1 (Chloroform:Isopentanol)
Homogenisierungspuffer A	100mM NaCl; 100mM Tris (pH 8,0); 50mM EDTA; 0,5% SDS
Kaliumacetat-Lösung	8M Kaliumacetat
Natriumacetat-Lösung	3M Natriumacetat (pH 7.0)
TE	10mM Tris (pH 8,0); 0,2mM EDTA
G2-Puffer (nach QIAGEN genomic DNA Handbook 08/2001); Anmerkung: Alle anderen QIAGEN-Puffer wurden gekauft	In 600ml dest. Wasser: 76,42g guanidine HCl; 11,17g Na ₂ EDTA*2H ₂ O; 3,63g Tris-base; 250ml 20% Tween 20 ; 50ml 10% Triton X- 100; pH 8,0; auf 1l auffüllen.
LiCl / KAc Lösung	1 : 2,5 (5M KAc-Lösung : 6M LiCl-Lösung)

Gel-Elektrophorese:

5 x Stop-Puffer (auch Gel-Ladepuffer)	15% Ficoll 400; 5% SDS; 0,05% Bromphenolblau; 0,05% Xylencyanol FF
TBE (Laufpuffer)	0,5M Tris; 0,5M Borsäure; 25mM EDTA
Färbelösung	8-10 Tropfen wässriger Ethidiumbromid-lösung (1mg/ml) pro 500ml Wasser (deion.)

Southern Blot:

Depurinierungs-Puffer	0,25 N HCl
Denaturierungs-Puffer	1,5M NaCl; 0,5 N NaOH
Neutralisierungs-Puffer	1M Tris-HCl; 3M NaCl; (pH 7,5-8,0)
Transfer-Puffer (20 x SSC)	1 Liter: 175,3g NaCl; 88,2g NaCitrat; (pH 7,0)

DNA-Markierungs-Reaktion

EDTA-Lösung	0,2M EDTA
PCA-Lösung	3,5% PCA; 100mM NaPPi
HCl-Lösung zum Waschen	0,25 N HCl

Hybridisieren:

Hybridisierungspuffer	500ml: 250ml Formamid (deion.); 25ml 100 x Denhardt's Solution; 125ml 20 x SSPE; 2,5ml 20% SDS; 50ml sssDNA (10mg/ml); 50g Dextransulfat
Waschpuffer	0,2 x SSC / 0,1% SDS
20x SSPE	1l: 31,2g NaH ₂ PO ₄ ; 174g NaCl; 7,4g EDTA (pH 7,4)
100 x Denhardt's Solution	100ml: 2g Ficoll 400; 2g Polyvinylpyrrolidone; 2g BSA Typ V
sssDNA	Heringsperma DNA; beschallt und durch Hitze denaturiert; 10mg/ml Endkonzentration
<u>X-Gal Färbung</u>	
Fixierungslösung	0,75% Glutaraldehyd (Merck) in 0,1M NaCacodylatpuffer pH 7,3
PBS Lösung (10x)	1liter: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ ; pH 7.4
PBT Lösung	PBS; 0,3% Triton X100
Färbelösung	1,5ml K ₄ [FeII(CN) ₆]; 1,5ml K ₃ [FeIII(CN) ₆]; 5ml 10x PBS; 42ml destilliertes Wasser; 50µl 1M MgCl ₂
X-Gal Färbelösung	Färbelösung 10min bei 37°C mit $\frac{1}{30}$ Vol 5% (X-Gal in DMF) inkubieren
<u>Injektion von DNA in <i>Drosophila</i> Embryonen</u>	
Dechorionisierung:	6% Natriumhypochloritlösung
Injektionspuffer:	0,1 M Phosphatpuffer pH 6.8, 5 mM KCl
Öle	3S und 10S Öl (Votalev)

Radioaktivität

Redivue™ 32P dCTP 18,5 MBeq Amersham Biosciences

II-1.5 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (NEB), Fermentas und Invitrogen bezogen.

Restriktionsendonukleasen:

Soweit nicht anders angegeben wurden die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Puffer für die Reaktionen benutzt. Doppelverdau wurden mit dem dafür von der entsprechenden Firma vorgeschlagenen Puffer gleichzeitig oder, wenn nicht möglich, sequenziell verdaut.

BamH1; Hin6I; HindIII; Scal; PvuII; Sall;	Fermentas
Bsh1236I; KpnI	
EcoRI; Sau3AI; NdeI, DraIII, NheI, PstI; XbaI	New England Biolabs
AgeI; SacII; NotI; StuI, BssHII, BsrGI, StuI,	
BssHII; NdeI; MluI; BstEII; DpnI; MaeII	
BglI	Invitrogen

Weitere Enzyme:

Soweit nicht anders angegeben wurden die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Puffer für die Reaktionen benutzt.

Taq DNA Polymerase	Eppendorf, Peqlab
Pfu Turbo Polymerase	Stratagene
Pfu Polymerase	Fermentas
T4 DNA Ligase	Invitrogen; Fermentas
RNase A; Proteinase K	AppliChem
Shrimp alkaline Phosphatase	Fermentas
Klenow Enzym	Fermentas
Terminale Deoxynukleotid Transferase (TdT)	NEB
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	Fermentas
T3 RNA Polymerase	Roche

II-1.6 Kits

DNA Reinigung:	QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)
DNA Extraktion	QIAquick Gel Extraction; Kit QIAexII (QIAGEN)
DNA Markierung	RediPrimell (Amersham)
LongRangePCR	Expand Long range PCR System (Roche)
SiteDirectedMutagenesis	QuickChange SiteDirectedMutagenesis Kit (Stratagene)
Midi- und Maxi Plasmid Präparation	Midi- und Maxipräparations Kit (QIAGEN)
Mini Plasmid Präparation	Fast Plasmid Mini Kit (Eppendorf)
RNA Markierung	Dig RNA Labelling Kit (Roche)

II-1.7 Sonstige Materialien:

Nytran-Plus Membran für Southern Blot	Schleicher & Schuell
Röntgenfilme X-ray RETINA XBA 100NIF	Fotochemische Werke Berlin
Röntgen Entwicklerkonzentrat Nr. 00011	Adefo
Röntgen Fixierkonzentrat Nr. 00064	Adefo

II-1.8 Benutzte Vektoren:

pDrive PCR cloning vector (Qiagen)
 pAc5.1/V5-HIS-A (Invitrogen)
 p2XeGFP (Clontech)
 pKS (Stratagene)
 pcDNA3-Dpp-myc (von M. Roth erhalten)
 pcDNA3-Dpp-del (von M. Roth erhalten)
 pcDNA3-Dpp-dup (von M. Roth erhalten)
 pUAST (Brand and Perrimon, 1993)
 pCPLZ (Wharton, 1992)
 pX27-pomb7 (von K. Basler erhalten)
 pX27-pomb23 (von K. Basler erhalten)
 pX27-pomb19 (von K. Basler erhalten)
 pBAT7071 (Grimm, 1993)
 pKS[TCF1mut4A] (Hofmeyer, 2001)

Nährmedien

LB-Medium	1% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 1% Pepton
SOC Medium	2% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ , 20mM Glukose
Ablage-Platten	1liter: 33g Agar-Agar, handelsüblicher Apfelsaft; erhitzen (Mikrowelle) und in Petrischalen gießen

II-1.9 Primer und andere Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG produziert. Eine detaillierte Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, deren Sequenz und Verwendung findet sich im Anhang.

II-1.10 Software und Datenbanken

Sequenzanalyse: 4Peaks; Chromas lite

Office-Anwendungen: MS-Office:mac 2004, MS-Office 2007

Graphikbearbeitung: Adobe Illustrator CS2

Bildbearbeitung: Adobe Photoshop 7.0

Sequenzabgleich (Alignments): NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)

Sequenzformatierung: Readseq (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/readseq.cgi>)

Proteinsequenztools: ExpASy (<http://expasy.org/tools/dna.html>)

Sonstige Sequenztools: Genepalette, Vector NTI (Invitrogen)

Restriktionsschnittstellen: NEB Cutter2 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

Primersynthese: Oligo 6.0 Carbon

Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu/>

Interactive Fly: <http://www.sdbonline.org/fly/>

Literaturrecherche: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

II-2. Verwendete Methoden

Nicht näher beschriebene Methoden wurden nach Sambrook et al. ausgeführt (Sambrook et al., 1989).

II-2.1 Histologische Methoden

II-2.1.1 Präparation der Imaginalscheiben aus L3 Larven

Die Expression von Omb in den Imaginalscheiben von *Drosophila melanogaster* L3-Larven ist in dieser Arbeit besonders im Hinblick auf die Funktion der so genannten „upstream regulatory region (URR)“ auf die Expression dieses Gens während der Entwicklung interessant. Zu diesem Zweck wurden die Bein-, Antennen/Augen- Halteren- und Flügelscheiben aus L3-Larven präpariert. Dazu wurde die Wanderlarve etwa in der Mitte mit einer scharfen Pinzette auseinander gerissen. Der hintere Abschnitt wurde verworfen, der Vordere anschließend mit zwei feinen Pinzetten invertiert. Die so umgestülpten Larventeile konnten dann von Fettgewebe und Tracheenresten befreit werden, um dann, wie unten beschrieben, gefärbt zu werden. Zuletzt wurden die einzelnen Scheiben mit einer sehr feinen Nadel einzeln von verbliebenem Gewebe abgetrennt und auf einen Objektträger transferiert.

II-2.1.2 X-GAL Färbungen

Die präparierten Imaginalscheiben wurden mitsamt dem noch daran befindlichen Gewebe in ein Reaktionsgefäß mit 500µl Fixierungslösung gegeben. Darin wurde das Gewebe für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf erfolgt dreimaliges Waschen für je 5min in 200µl PBS bei Raumtemperatur. Die alte Lösung wurde dabei vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Nach dem dritten Waschgang wurden 300µl X-Gal Färbelösung zugesetzt und das Gewebe für 90min oder auch über Nacht (je nach Erfahrung mit der Färbeintensität) im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Durch wiederholtes Waschen nach dieser Zeit in PBS wurde die Färbereaktion gestoppt und die Imaginalscheiben von den verbliebenen Geweberesten befreit und auf einen Objektträger in einem Tropfen PBS gegeben. Nach Auflegen des Deckgläschens wurden die Ränder mit Nagellack versiegelt und die Scheiben unter dem Mikroskop ausgewertet.

II-2.1.3 Injektion von P-Elementvektoren in Drosophila-Embryonen

Mit diesem Verfahren wurden P-Element Konstrukte in die Keimbahn von Drosophila Embryonen gebracht. Zu diesem Zweck steht nur ein kurzes Zeitfenster in der Embryonalentwicklung zur Verfügung, weshalb die Zeiten genau eingehalten werden mussten. Zur Injektion wurden *white* Fliegen verwendet, da das P-Element als Marker ein funktionelles *white* Gen besitzt und so der Erfolg am Ende überprüft werden kann. Die Fliegen werden zur Ablage für 30min bei 25°C auf Apfelsaft-Agar Platten gesetzt. Nach dieser Zeit wurden die Embryonen mit einem feinen Pinsel in ein Sammelnetz überführt und für zwei Minuten in Chlorbleichlauge chemisch dechorionisiert. Unter fließendem Wasser wurden die Embryonen schließlich gründlich gespült und auf einem Agarblock (aus einer Apfelsaft-Ablageplatte) unter einem Binokular so aufgereiht, dass je 20 bis 40 Embryonen in der gleichen anterior-posterioren Orientierung zu liegen kamen. Ein mit einem Klebstoff versehenes Deckgläschen wurde benutzt, um die aufgereihten Embryonen vom Agarblock auf einen Objektträger zu übertragen. Nach einer Trockenzeit von 12min bis 16min in einem Exsikkator wurden die Embryonen mit einem Tropfen 10S Öl (VOLTalev) überschichtet und auf dem Injektionsmikroskop platziert. Der zu injizierende Vektor wurde in einer Konzentration von 1µg/µl zusammen mit einem Helferplasmid (0,3µg/µl) und Injektionspuffer in eine ausgezogene Kapillare (Puller: Sutter P97) gefüllt. Diese wurde an den mit Druckluft betriebenen Injektor angeschlossen und am Glasrand des Deckgläschens angeschliffen. Sobald Flüssigkeit austrat, wurde die Kapillare auf den posterioren Teil der Embryonen ausgerichtet. Ein kleiner Tropfen der Injektionslösung wurde in jeden Embryo an der Stelle injiziert, an der später die Polkörper entstehen. Bereits zu weit entwickelte Embryonen wurden mit der Kapillare zerstört, so dass die sich entwickelnden Tiere putative Konstrukt-Träger waren. Zur Entwicklung nach der Injektion wurden die Embryonen auf ihrem Deckgläschen in eine feuchte Kammer transferiert und mit 3S Öl überschichtet. Eine zweitägige Inkubation bei 18°C folgte. Daraufhin wurden die noch lebenden Larven mit einer feinen Pinzette abgesammelt und in ein Futterglas überführt. Nach Entwicklung zum adulten Tier wurden die Fliegen einzeln mit *white*⁻ Tieren gekreuzt. Die erfolgreich injizierten Nachkommen der F1 Generation tragen dann aufgrund des im Konstrukt enthaltenen funktionellen *white* Gens rote Augen und sind als solche zu erkennen. Mehrere erfolgreiche Linien ein und desselben Konstrukts sollten etabliert werden, da je nach Insertionsort des P-Elementes im Genom Positionseffekte nicht auszuschließen sind.

Aufgrund von anhaltenden technischen Problemen der laboreigenen Apparatur wurden einige Konstrukte an die Firma „Rainbow Transgenic Flies“ (USA) gesandt und dort erfolgreich injiziert.

II-2.1.4 In situ Hybridisierung

Mittels in vitro Transkription wurde von einem geeigneten, linearisierten DNA Fragment durch T3 oder T7 RNA-Polymerase (je nach Orientierung) unter Anwesenheit markierter Nukleotide (DIG-Labeling Kit) die antisense RNA des Fragmentes erstellt. Das sense-Produkt wurde zur Kontrolle ebenfalls generiert. Alle Vorgaben richteten sich nach dem Kit-Handbuch (Roche).

Imaginalscheiben wurden wie ebenfalls in diesem Kapitel beschrieben aus L3 Larven präpariert und nach Protokoll (DIG Labelling Handbook, Roche) fixiert und mit der RNA Sonde inkubiert. Das einzelsträngige RNA antisense Produkt hybridisiert im Gewebe mit dem dazu komplementären Gentranskript. Die DIG markierten Nukleotide der Sonde lassen sich mit einem Antikörper (AP gekoppelt) detektieren. Durch Färbereaktion mit BCIP/NBT kann so die Markierte Nukleinsäure sichtbar gemacht werden. Das dem Expressionsmuster des Zielgens entsprechende Färbemuster wurde dann unter dem Mikroskop ausgewertet.

II-2.2 Molekulare Methoden

II-2.2.1 Restriktionsverdau

Standard Restriktionsverdau

Wenn nicht anders angegeben, wurde jeder Restriktionsansatz in 20µl Gesamtvolumen durchgeführt.

Für alle in dieser Arbeit angesetzten Restriktionsverdau gilt folgender Standardansatz, soweit im entsprechenden Kapitel nichts anderes beschrieben wird.

Für genomische DNA

16µl	genomische DNA (aus 50 Fliegen oder L3-Larven präpariert)
2,5µl	Puffer (laut Hersteller des Enzyms)
1,5µl	Restriktionsenzym

Wenn ein Zusatzstoff wie beispielsweise BSA laut Herstellerprotokoll zuzugeben war, wurde eine 10x Lösung der Substanz hergestellt und die entsprechende Menge auf Kosten der Menge an genomischer DNA eingesetzt.

Plasmid DNA

Der Ansatz entsprach dem für genomische DNA, außer dass folgende Mengen an Plasmid DNA im 20µl bis 50µl Ansatz verdaut wurden: Präparativ: 1µg bis 5µg Plasmid

Analytisch: 100ng bis 200ng Plasmid

In analytischen Verdau wurden etwa 0,1 – 0,2 U Enzym eingesetzt.

II-2.2.2 Dephosphorylierung und Phosphorylierung

Phosphorylierung:

Um künstlich hergestellte Oligos Ligieren zu können, war es nötig, deren 5' Enden zu phosphorylieren. Die Phosphorylierungsreaktion wurde jeweils am einzelsträngigen Oligo durchgeführt. Der Einfachheit halber wurde die Phosphorylierungsreaktion bereits in ATP haltigem Ligasepuffer (Fermentas) angesetzt, der für T4 PNK ebenfalls geeignet ist. Folgender Ansatz wurde verwendet und für 20min im 37°C Wasserbad inkubiert:

10µl	oligo (100µM)
2,5µl	T4 Ligase Buffer (10x)
6,5µl	destilliertes Wasser
1µl	T4 Polynucleotid Kinase (PNK)

Dephosphorylierung:

Um Vektorselbstligate bei Koligationsreaktionen zu verhindern, wurde der mit nur einem Enzym linearisierte Vektor in der Regel zuerst an seinen 5'Enden dephosphoryliert. Der folgende Ansatz wurde in dieser Arbeit, wenn nicht anders beschrieben, verwendet. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 15min bis 20min. Die Phosphatase wurde anschließend hitzedeaktiviert. Es wurde ausschließlich Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) verwendet.

Zur Restriktionsreaktion wurde nach Verdau 1µl SAP zugegeben, der Ansatz kurz abzentrifugiert und anschließend nochmals für 15min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Hitzeinaktivierung der SAP und, wenn möglich des Restriktionsenzymes, erfolgte darauf bei mindestens 65°C für 20min.

II-2.2.3 Ligationsreaktion

Alle hier durchgeführten Ligationsreaktionen wurden bei 4°C bis 18°C über Nacht ausgeführt, und wenn nicht anders beschrieben in einem Volumen von 20µl bis 50µl (Koligation) und 50µl bis 100µl (Selbstligation) wie folgt angesetzt:

Standard Ligationsansatz:

50ng bis 250ng Plasmid
1X T4 Ligase Puffer (Invitrogen)
1µl bis 3µl T4 DNA Ligase (Invitrogen)
Auffüllen mit destilliertem Wasser auf Reaktionsvolumen

Für Inverse PCR:

DNA aus Restriktionsverdau	20µl
ddest. Wasser	58µl
T4- DNA-Ligase Puffer (5x) (Invitrogen)	20µl
T4 DNA-Ligase (Invitrogen)	2µl

Diese Reaktion wurde über Nacht bei 4°C bis 18°C ausgeführt.

II-2.2.4 Transformation in chemokompetente Bakterienzellen

Alle Transformationen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe chemokompetenter Zellen *E.coli* DH5alpha (Invitrogen) mit einer Kompetenz von 10^6 (subcloning efficiency) bis 10^8 (library efficiency) durchgeführt. Zur Retransformation zur Neige gehender eigener Plasmide wurden selbst hergestellte Zellen (siehe nächstes Kapitel), von meist geringerer Kompetenz, benutzt. Folgendes Standardprotokoll wurde ausgeführt (nach Produkt-Protokoll von Invitrogen):

Ein 50µl Aliquot mit Zellen wurde auf Eis aufgetaut und maximal $\frac{1}{10}$ des Gesamtvolumens an Ligationsreaktion hinzugegeben. Meist genügten 1µl bis 2µl. Die Lösung Suspension wurde dann für 45min auf Eis inkubiert, bevor der Hitzeschock im 42°C Wasserbad für exakt 45s gegeben wurde. Die Zellen wurden anschließend für zwei weitere Minuten auf Eis inkubiert und dann sofort mit auf Raumtemperatur vorgewärmten SOC Medium auf 1ml Volumen aufgefüllt. Eine weitere Inkubationsphase folgte bei 37°C unter starkem Schütteln. Am Ende wurden je drei LB-Platten mit 100µl, 300µl und 600µl der Bakteriensuspension ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

II-2.2.5 Herstellen chemokompetenter Bakterien

Die Prozedur folgt einem Protokoll von D. Hanahan (Hanahan, 1985). Im folgenden Text findet sich eine kurze Zusammenfassung.

Auf einer antibiotikafreien LB Platte wurden Bakterien des Stammes *E. coli* DH5alpha aus einer Gefrierkultur ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie mit einem sterilen Werkzeug gepickt und eine Vorkultur mit 2ml Volumen SOB Medium über Nacht angesetzt. Danach wurden 500µl der Vorkultur in eine 100ml SOB-Hauptkultur in einem 1-Liter Kolben. Diese Kultur wurde bei 37°C solange inkubiert, bis eine optische Dichte OD_{600} von 0,6 bei stetigem Kontrollieren festgestellt werden konnte. Danach wurde das Wachstum gestoppt, indem die Suspension auf zwei 50ml Falcon Röhrchen verteilt für 60min auf Eis inkubiert wurde. Bei einem Zentrifugationsschritt bei 750g für 15min bei 4°C wurden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden in 33ml FB Puffer durch sehr langsames Schütteln resuspendiert. Die Suspension wurde für weitere 60min auf Eis inkubiert. Nochmals wurden die Bakterien wie oben beschrieben vorsichtig pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden dann wiederum in 8ml FB puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden letztlich in 50µl Aliquots abgefüllt und nach Schockfrieren in -80°C kaltem Ethanol bei -80°C weggefroren.

II-2.2.6 Annealing von Oligonukleotiden

Für manche Experimente dieser Arbeit war es nötig mit Hilfe zweier synthetischer einzelsträngiger Oligonukleotide eine bestimmte Sequenz in ein Konstrukt zu ligieren. Da die Oligonukleotide auf Grund der Synthesemethode kein 5' Phosphat besitzen, das zur Ligation an andere DNA-Stücke unerlässlich ist, war zunächst eine Phosphorylierungsreaktion, wie oben beschrieben, nötig. Danach konnte die Zusammenlagerung der komplementären Einzelstränge stattfinden. Durch Erhitzen auf 100°C wurden Komplexbildungen untereinander aufgelöst, während die anschließende langsame Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur in einem Wasserbad die vollständige Ausbildung der komplementären Einzelstränge zu Doppelsträngen gewährleistete.

II-2.2.7 Gelelektrophorese

Agarosegele

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8%, 1% oder 2% TBE-Agarosegele hergestellt. Das Lösungsvolumen für ein kleines Gel mit acht oder 12 Spuren (HYBAID) war 80ml. Für ein großes Gel mit 15, 20 oder 25 Spuren (BIORAD) war es 200ml. In dieser Arbeit wurde lediglich TBE als Elektrophoresepuffer verwendet. Die Laufzeit betrug in der Regel zwei Stunden bei 90V bis 100V oder über Nacht bei 25V-30V. Die Färbung mit Ethidiumbromid erfolgte nachher im Färbebad (8 bis 10 Tropfen einer 0,5M Stammlösung in 500ml Wasser) für 30 bis 40 Minuten. Die Gele wurden auf einem Gel-Imaging System (INTAS) photographiert und ausgewertet. Als DNA Marker diente der auch zur Quantifizierung geeignete MassRuler (10kb bis 100bp) der Firma Fermentas.

Acrylamidgele

Für sehr kleine DNA Fragmente wurden neben 2% Agarosegelen auch Acrylamidgele benutzt. Je nach Fragmentgröße wurden 8% bis 12% Acrylamidgele genutzt. Die Zusammensetzung und die Elektrophorese entsprach dem Protokoll aus dem Laborhandbuch ((Sambrook et al., 1989)).

II-2.2.8 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation erfolgte in der Regel mit kommerziell erhältlichen Kits. Für die Minipräparation wurde der FastPlasmid Mini Kit von Eppendorf benutzt, für größere Maßstäbe (Midi oder Maxi) die entsprechenden Kits der Firma Qiagen.

Bei einer sehr großen Anzahl von zu untersuchenden Kolonien wurde ohne Kit im Minimaßstab vorgegangen. Dazu wurden 1,5ml der Kultur 20 sec bei Maximalgeschwindigkeit abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 100µl GTE Puffer resuspendiert. Die alkalische Lyse folgte daraufhin durch Zugabe von 200µl alkalischer SDS Lösung für 5min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Suspension durch Zugabe von 150µl saurer KAc-Lösung neutralisiert und für weitere 5min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation wird die DNA-haltige wässrige Lösung vom Rest getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eine Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung folgte, wie im entsprechenden Kapitel beschrieben.

II-2.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde zur Amplifikation definierter DNA-Bereiche eingesetzt. Anhand der Sequenz des gewünschten DNA-Bereiches wurden zwei einander entgegen gerichtete Oligonukleotid Primer synthetisiert, die an den Enden des zu amplifizierenden DNA-Stückes binden. Nach der Hitzedenaturierung der DNA bei 94°C erfolgt das Anlagern der Primer an den entsprechenden DNA-Einzelstrang, das sogenannte Annealing. Anschließend wird mit Hilfe eines hitzestabilen Enzyms, der Taq Polymerase, und der in der Reaktionslösung vorhandenen freien Nukleotide (dNTPs) der Komplementärstrang erzeugt. Nach erneuter Denaturierung liegt nun die doppelte Menge an Matrizensträngen vor. Diese Vorgänge werden in bis zu 35 Zyklen wiederholt wobei jedesmal die im vorherigen Zyklus neusynthetisierten DNA-Stücke selbst als Matrize dienen, was letztlich zur exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes führt. Für besonders genaue Amplifikationen wurde statt der Taq Polymerase, die statistisch weniger Fehler produzierende, Pfu-Polymerase verwendet, die über einen molekularen Fehlerkorrekturmechanismus verfügt. Für die Vervielfältigung besonders langer oder schwieriger (GC reicher) Sequenzen war ein Mix verschiedener Polymerasen (Long range PCR Kit) am besten geeignet.

II-2.2.9.1 Standard PCR

Alle PCR Reaktionen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit folgendem Standard-PCR-Reaktionsansatz durchgeführt:

5,0 µl	Taq Puffer mit 15mM MgCl ₂ (Eppendorf)
5,0 µl	dNTPs
2,5 µl	Forward Primer (20 uM)
2,5 µl	Revers Primer (20 uM)
2,0 µl	genomische DNA (1-10ng Plasmid)
0,3 µl	Taq DNA-Polymerase

Standard PCR-Programm für Eppendorf und Biometra Gerät. Für den Stratagene Robocycler galt das gleiche Programm, nur dass Denaturierung und Annealingzeiten verdoppelt wurden:

94°C	Denaturierung	5min	} 30 Zyklen
94°C	Denaturierung	30sec	
60°C	Annealing	30sec	
72°C	Elongation	2min	
72°C	Final Extension	7min	
4°C	Hold on cold block	∞	

II-2.2.9.2 Long Range PCR

Alle Long range PCR Reaktionen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit folgendem Standard-PCR-Reaktionsansatz durchgeführt (Komponenten aus Kit):

5,0 µl	Puffer 1 (10x ROCHE)
1,75 µl	dNTPs (10mM; 350µM Endkonzentration)
x µl	Forward Primer (300nM Endkonzentration)
x µl	Revers Primer (300nM Endkonzentration)
2,0 µl	genomische DNA (bis zu 500ng)
0,75 µl	Polymerase Mix
x µl	auf 50µl mit dest.Wasser auffüllen

Standard PCR-Programm für Eppendorf MasterCycler T Gradient:

93°C	Denaturierung	2min	} 10 Zyklen
93°C	Denaturierung	10sec	
50-65°C	Annealing	30sec	
68°C	Elongation	8min	
93°C	Denaturierung	15sec	} 20 Zyklen
50-65°C	Annealing	30sec	
68°C	Elongation	8 min +20s/cycle	
68°C	Final Extension	7min	
4°C	Hold on cold block	∞	

Alle PCR Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel überprüft und, wenn nötig gereinigt (PCR Purification Kit).

II-2.2.9.3 Kolonie-PCR zum Überprüfen einer Vielzahl von *E.coli* Klonen

Diese Methode wurde angewandt, wenn nach der Transformation eines Konstrukts positive Klone nur mit geringer Häufigkeit erwartet wurden und eine andere Selektionsmethode nach Zellen, die das Konstrukt enthalten, wie etwa Blau-Weiß Selektion, aus technischen Gründen nicht möglich war. Eine PCR Reaktion wurde, wie oben im Standard PCR Protokoll beschrieben, durchgeführt. Statt Template-DNA wurden jedoch sorgfältig mit einem sterilen Zahnstocher gepickte Einzelklone zugegeben. Diese Kolonien wurden außerdem einzeln und nummeriert auf einer neuen Platte kultiviert. Meist wurde pro PCR-Reaktion ein Pool von zehn Kolonien pro Reaktion in einem ersten Durchgang getestet. Bei Erfolg innerhalb eines Pools wurde dann ein zweiter PCR Ansatz mit den zehn entsprechenden Bakterienkolonien von der neuen Platte durchgeführt, um eine einzelne positive Kolonie identifizieren und kultivieren zu können.

II-2.2.9.4 Inverse PCR zum Bestimmen des Insertionsortes von P-Elementen

Um den genauen Insertionsort eines P-Elementes im Genom bestimmen zu können, ist die inverse PCR ein geeignetes Mittel. Dazu erfolgte zunächst die Isolierung und der Verdau der genomischen DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym. Dessen Schnittstelle sollte im P-Element möglichst nahe der invertierten Enden liegen. Am besten geeignet ist ein Enzym mit einer Erkennungssequenz von vier bis fünf Basenpaaren, das zu relativ kleinen Fragmenten führt. Der Verdau wird nach Hitzeinaktivierung der Endonuklease und Reinigung der Reaktion durch Phenolextraktion oder durch das Protokoll des QIAquick PCR purification kit ligiert. Dadurch entsteht eine Vielzahl ringförmiger DNA-Fragmente, von denen eines auch das P-Element Endfragment enthält. Wird nun eine PCR Reaktion mit zwei einander entgegengesetzt gerichteten Primern ausgeführt, von denen der erste nahe am invertierten Ende des P-Elementes liegt und nach außen gerichtet ist, während der zweite nahe der P-Element internen Restriktionsschnittstelle liegt und ebenfalls nach außen gerichtet ist, entsteht durch den bei der Ligationsreaktion erfolgten Ringschluss ein Fragment, das auch die das P-Element flankierende genomische Sequenz bis zur nächstgelegenen Schnittstelle enthält. Wird dieses PCR Produkt nun sequenziert, lässt sich, nach einem Abgleich der Sequenz mit der Genomdatenbank der Insertionsort basengenau erkennen.

II-2.2.10 Universal Fast Walking (UFW)

Die Technik wurde wie in der Veröffentlichung beschrieben angewandt. (Myrick and Gelbart, 2002)

II-2.2.11 Sequenzierung

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden von den Firmen SeqLab (Göttingen) oder Genterprise (Mainz) durchgeführt. Dazu wurden lediglich ausreichende Mengen an Plasmid (etwa 350ng) zusammen mit 10-20pmol Primer in einem 200µl Reaktionsgefäß an die genannten Firmen versandt.

II-2.2.12 DNA-Präparation aus adulten Fliegen oder Larven

Die Isolierung der genomischen DNA aus den vorher abgesammelten und bei -80°C eingefrorenen Fliegen, ca. 50 bis 100 Stück pro Ansatz, erfolgte durch Homogenisierung der Tiere mit Hilfe eines Glashomogenisators oder im Reaktionsgefäß mit einem motorbetriebenen Stößel in 500µl Homogenisierungspuffer A.

Das Homogenisat wurde bei 68°C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe von 8M Kaliumacetat und einer weiteren 30minütigen Inkubationszeit bei 0°C wurden Feststoffreste abzentrifugiert und die Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dort wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

Bei 37°C erfolgte dann für 10 Minuten ein RNase A Verdau. Anschließend wurde die Lösung durch Phenol-Chloroformextraktion aufgereinigt und die DNA aus der wässrigen Lösung wiederum mit Ethanol gefällt.

Letztlich wurde die so gewonnene genomische DNA in 50µl TE-Puffer gelöst.

II-2.2.13 Phenol-Chloroform Extraktion

Zum zu reinigenden Ansatz wurde $\frac{1}{10}$ des Reaktionsvolumens an 3M NaAcetat gegeben und dieser anschließend in ein PhaseLock Gefäß (Eppendorf) überführt. Dazu pipettiert wurden 0,5ml Phenol und 0,5ml Chloroform/Isoamylalkoholgemisch (24:1). Das Reaktionsgefäß wurde dann auf dem Vortex kurz geschüttelt und für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Daraufhin trennte sich die organische von der wässrigen Phase, zwischen die sich das Gel der PhaseLock (Eppendorf) Gefäße setzte. So war es ein

Leichtes, die obere wässrige und DNA haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß zu überführen. Nach Wiederholung der letzten Schritte erfolgte eine Ethanol-Fällung der DNA

II-2.2.14 Ethanol Fällung

Um DNA aus wässriger Lösung zu fällen, wurden in Gegenwart von 0,3 M NaAcetat 2,5 Volumina reines Ethanol zugegeben. Die Suspension wurde für bis zu 30min bei -20°C inkubiert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit 15 bis 20min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer feinen Pipette abgenommen und verworfen, während der DNA-haltige Niederschlag mit 0,5ml 70% Ethanol gewaschen wurde. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand wiederum verworfen und das Pellet in einer geeigneten Menge TE- oder Tris-Puffer auf einem Schüttler gelöst.

II-2.2.15 Isolierung mit QIAGEN genomic Tip 100G

Diese Methode wurde benutzt, um DNA besonders hoher Qualität und Reinheit zu erhalten. Die Homogenisierung erfolgte bei dieser Methode unter Kühlung mittels flüssigem Stickstoff in einem Mörser. Etwa 100 bis 200 Tiere wurden so pulverisiert und in 9,5ml G2-Puffer, der mit 19µl RNase A(100mg/ml) und 0,5ml Proteinase K Lösung (20mg/ml) versetzt war, gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 50°C im Wasserbad wurde der Ansatz zentrifugiert und der Überstand auf eine mit Puffer QBT equilibrierte QIAGEN genomic tip 100G Säule aufgetragen. Nach einem durch Gravitation getriebenen Durchfluss wurde die nun in der Säule gebundene DNA mit Puffer QC zweimal gewaschen. Darauf erfolgte die Eluierung der DNA aus der Säule in Puffer QF, der auf 50°C vorgewärmt war. Mit Isopropanol wurde letztlich die DNA gefällt, abzentrifugiert und in 300µl TE Puffer gelöst.

II-2.2.16 Isolierung der DNA aus einzelnen Larven oder Fliegen

Einzelne Larve oder Fliege wurde gesammelt und bei -80°C eingefroren. Die Homogenisierung erfolgte im Mikrohomogenisator (Kontes) unter Zugabe von 200µl Puffer A. Danach wurden weitere 200µl Puffer A hinzugegeben und nochmals mit dem Homogenisator bearbeitet, bis nur noch sehr kleine Kutikulafragmente sichtbar waren. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 65°C wurden 800µl LiCl/Kac Lösung dazugegeben und das Homogenisat für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde die DNA aus dem Überstand mit 600µl Isopropanol gefällt und in 50µl TE-Puffer gelöst.

II-2.2.17 Zielgerichtete Erzeugung von (Punkt)Mutationen in Plasmiden

Benutzt wurde hierzu ein Kit der Firma Stratagene (siehe Materialenteil). Es wurden zwei, zu der subklonierten Zielsequenz komplementäre Oligonukleotide erstellt, die die gewünschte Nukleotidänderung tragen. Eine PCR Reaktion produziert Plasmide, die die mutierte Sequenz tragen. Vor der Transformation in bakteriellen Zellen muss die ursprüngliche Template-DNA entfernt werden. Dabei macht man sich die Eigenschaft des Restriktionsenzym DpnI, das nur methylierte DNA schneidet, zu Nutze. Während das Template, welches einst aus Bakterienzellen isoliert wurde, an der DpnI Schnittstelle Dam-methyliert ist, besitzt das durch PCR amplifizierte Produkt keine Methylgruppe an der DpnI Erkennungssequenz und kann deshalb nicht geschnitten werden. Auf diese Weise erfolgt nur eine Linearisierung des Originalplasmides. Bei der folgenden Transformation des Reaktionsansatzes, nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym, wird nur mehr das zirkuläre, und damit mutierte Plasmid vervielfältigt. Die neue Sequenz wurde, wenn möglich, so gewählt, dass sie nicht nur für andere Aminosäuren kodiert, sondern gleichzeitig eine neue einzigartige Schnittstelle im Plasmid erzeugt. Auf diese Weise konnte nach der Plasmidpräparation der Erfolg des Experimentes einfach per Restriktionsverdau mit dem jetzt neu schneidenden Enzym überprüft werden. War dies nicht möglich, war eine Sequenzierung des (zufällig gewählten) Klons unumgänglich.

II-2.2.18 Anhängen von A-Überhängen an PCR-Produkte (A-Tailing)

Um mit Pfu-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte mittels A/T Ligation in einen Vektor zu inserieren, mussten diese erst mit Einzel-A-Überhängen versehen werden. Dazu wurde das gereinigte PCR Produkt (Qiaquick PCR purification kit) unter Zugabe von Taq Puffer, dATPs und Taq Polymerase für etwa 15min bei 68°C in einem Thermoblock inkubiert. Die Konzentrationen sind wie bei der Standard PCR Reaktion beschrieben verwendet worden.

II-2.2.19 Herstellen eines linearen Vektors mit T-Überhängen (T-Tailing)

Das Herstellen eines eigenen linearen T-Überhang Vektors erfolgte ebenfalls durch Inkubation des blunt ended Vektors mit Taq Polymerase unter ausschließlicher Anwesenheit von dTTP. Taq Polymerase hat die Eigenschaft, wenngleich auch im geringeren Maße, auch andere Einzelüberhänge zu generieren, wenn kein dATP zur Verfügung steht. (Marchunk et al., 1990). Die Reaktionsbedingungen waren wie für A-Tailing beschrieben, außer, dass nur dTTP zugegeben wurde. Diese Methode erwies sich allerdings als nicht produktiv.

Eine zweite, alternativ benutzte Möglichkeit, war eine Reaktion mit TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase), einem Enzym das in Anwesenheit von dTTP Nukleotide an das 3' Ende eines DNA-Stranges anhängt. Um zu gewährleisten, dass nur ein Nukleotid angehängt wird wurde ddTTP benutzt. Auch hierfür wurde das gereinigte und Verdautete Vektorfragment nach Angaben im Protokoll des Herstellers NEB behandelt.

II-2.2.20 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden für Southern Blots

Aus geeigneter Plasmid-DNA wurden die gewünschten Fragmente mittels Restriktionsverdau geschnitten, durch anschließende Gelelektrophorese identifiziert und aus dem Gel isoliert.

Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem Rediprime™II Kit von Amersham nach der „random prime“ Methode (Feinberg and Vogelstein, 1983). Dabei wurden 2 bis 25ng DNA in 45µl TE Puffer gelöst, bei 100°C denaturiert und kurz abgekühlt, bevor sie zu dem bereits fertigen Reaktionsmix (gepufferte Lösung von dATP, dGTP, dTTP, exonucleasefreiem Klenow-Enzym und random primers in getrockneter und stabilisierter Form) gegeben wurden. Nach der Zugabe von 5µl radioaktiven dCTP und einer Inkubation bei 37°C für 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 5µl 0,2M EDTA gestoppt.

Die Qualität des Einbaus der radioaktiven Nukleotide wurde getestet, indem 1µl des Reaktionsansatzes zu einer Lösung aus 950µl PCA und 50µl Träger-DNA (sss-DNA) gegeben wurde. Dieser Mix wurde dann auf ein Stück Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schüll, Nytran Plus) übertragen und mit Hilfe einer Wasserstrahl- oder Vakuumpumpe und 0,25N HCl-Lösung mehrfach gewaschen. Nachdem so die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide entfernt worden waren, konnte die Qualität des Einbaus durch ein Messgerät anhand des Zerfalls (Geiger-Müller-Zählrohr oder ProbeCount-Gerät) akustisch durch kurzzeitiges Halten der Probe vor den Monitor überprüft werden. Vor Zugabe der radioaktiv markierten Sonde wurde die per Southern Blot erzeugte Membran in einer Hybridisierungsröhre in 15ml

Hybridisierungspuffer bei 42°C in einem Hybridisierungssofen mit Rotor, für mindestens 1 Stunde oder auch über Nacht, vorhybridisiert. Darauf erfolgte die Zugabe der markierten Sonde in denselben Puffer und die Hybridisierung über Nacht bei 42°C im selben Ofen. Anschließend wurden die Membranen viermal je 20 Minuten bei 68°C in Waschpuffer gewaschen. Die ersten beiden Durchgänge wurden in den Hybridisierungsröhren im Ofen durchgeführt. Für die beiden weiteren Waschschrirte wurden die Membranen in einen größeren, verschließbaren Behälter überführt und dort unter Schütteln im Wasserbad, ebenfalls bei 68°C, gewaschen.

II-2.2.21 Southern Blots und Autoradiographie

Um die DNA aus dem Gel auf eine positiv geladene Membran zu übertragen, wurde die Southern Blot Technik angewandt. Auf einem Vakuum-Blotter, bei einem Unterdruck von 50-60 mbar, wurden die Gele nacheinander mit verschiedenen Lösungen überschichtet. Zuerst erfolgte für 20 Minuten die Depurinisierung um den Transfer größerer DNA Fragmente zu erleichtern. Darauf wurde die DNA durch NaOH 20 Minuten lang denaturiert und schließlich das System für 20 Minuten wieder neutralisiert. Darauf erfolgte der Transfer der denaturierten DNA aus dem Gel auf die darunter liegende Membran mit 20x SSC Puffer für 2 Stunden.

Nach dem Transfer wurde die DNA durch UV-Licht kovalent mit der Membran verbunden. Dies erfolgte mit einem UV-Crosslinker (Programm: AutoCrosslink).

Um Hintergrund bei der auf den Blot folgenden Hybridisierung zu verringern wurde die Membran anschließend in einer Mikrowelle für 10 Minuten in heißem Southern Blot Waschpuffer gekocht.

Um die hybridisierten radioaktiven Sonden sichtbar zu machen, wurden in Autoradiographie-Kassetten mit Verstärkerfolie die Röntgenfilme auf die hybridisierten Membranen aufgelegt und bei -80°C für einige Stunden bis zu mehreren Tagen exponiert. Die Dauer richtete sich dabei nach Erfahrungswerten mit der entsprechenden Sonde und der Qualität des Blots. Die exponierten Filme wurden per Hand in einem dreiteiligen Entwicklungstank bei Raumtemperatur für fünf Minuten im Entwicklerbad eingestellt. Nach einem kurzen Abwaschen der Entwicklerreste unter fließendem Wasser wurden die Filme dann ins Fixierbad für 5 bis 10 Minuten gegeben. Am Ende erfolgten ein weiterer Waschgang und das Trocknen bei Raumtemperatur für 20 Minuten.

III. Ergebnisse

III-A omb und Omb

III-A-1 Untersuchungen zur Regulation von omb:

III-A-1.1 Das omb upstream-deletion Projekt

Die bereits früher (Dorner, 2003) begonnene Charakterisierung von upstream deletion Kandidaten-Genen sollte hier abgeschlossen werden.

In der Linie omb[P2-P3w] ist die omb upstream Region von den beiden P-Insertionen omb[P2] (Sun et al., 1995) und omb[P3] (Calleja et al., 1996) flankiert (Abbildung 10)

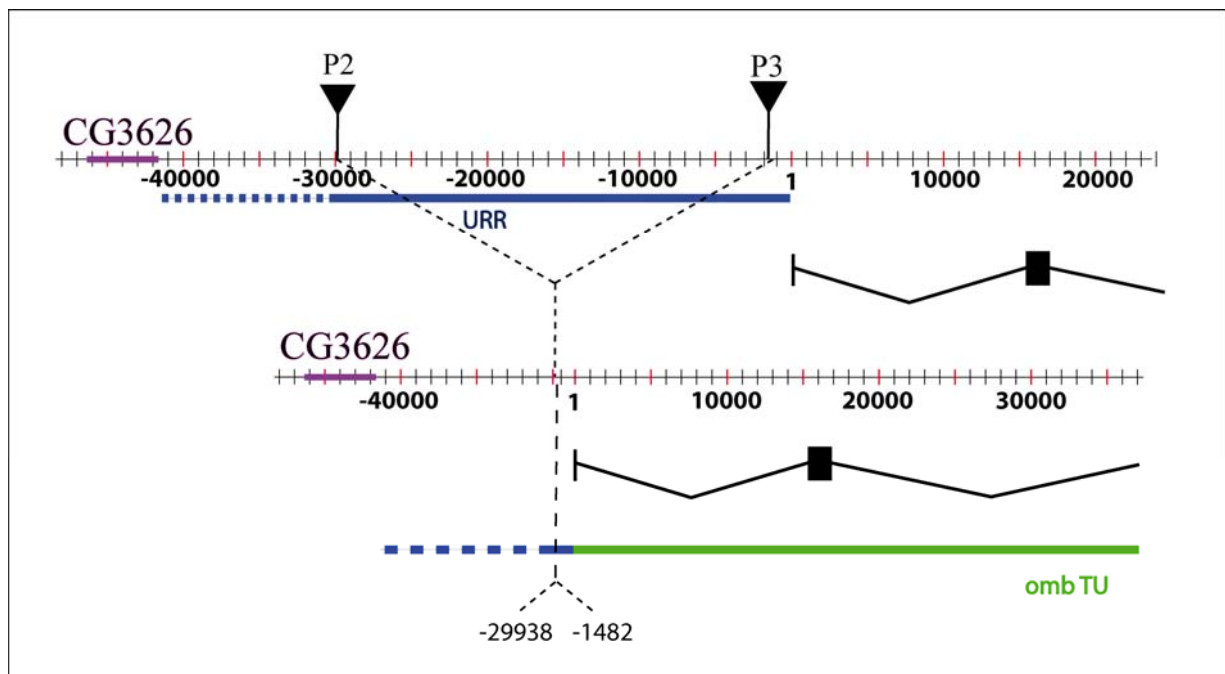


Abbildung 10: Die Abbildung zeigt eine schematische Übersicht über die genomische Region der omb URR. Die beiden Insertionen sind eingetragen. Der untere Teil zeigt die Region nach der erfolgreichen Mobilisierung der beiden P-Elemente.

Diese wurden durch Einkreuzen von Transposase mobilisiert, was zum Verlust der dazwischenliegenden genomischen Region führen kann (Cooley et al., 1990). Die entstandenen Nachkommen konnten an Hand verschiedener phänotypischer Marker, die auf den beiden P-Elementen (*white* und Gal4) lokalisiert sind, auf ihre Eignung hin vorselektiert werden. Da deren Verlust aber auch durch „lokale“ Ereignisse im P-Element zustande kommen kann, ohne dass der gesamte genomische Bereich zwischen den P-Elementen deletiert ist, war eine genaue molekulare Analyse nötig. Damit wurde bereits in

einer früheren Arbeit begonnen (Dorner, 2003). Auf Grund der großen Anzahl der zu untersuchenden Linien konnte die Analyse damals aber nicht basengenau ausgeführt werden. Zum Einen wurden die P-Element Enden per PCR an ihrem distalen und proximalen Ende mit geeigneten Primern (450+421, 447+421, 449+422, 448+452) auf ihre Präsenz hin untersucht. Dabei war immer ein Primer auf dem P-Ende und der zugehörige Partner auf dem flankierenden genomischen Part lokalisiert. Das Produkt erwarteter Größe kam nur bei Vorhandensein beider Primerbindestellen zustande. Zum Anderen wurde versucht, per Southern Blot-Analyse und an Hand einiger DNA-Sonden entlang des genomischen Bereiches (Phagenklone von G. Pflugfelder; Abbildung 11) sowie P-Element interner Sequenzen, die gewünschte Deletion nachzuweisen. Letztere Analyse wurde in dieser Arbeit durch eine weitere Sonde (GAL4 aus 3,0kb HindIII Fragment von pGawB, für das zu *omb* proximal gelegene P[3]-Ende) vervollständigt. Auch einige Blots, deren Ergebnisse zuvor nicht eindeutig zuzuordnen waren, wurden wiederholt. Letztlich wurden dadurch die früheren Ergebnisse bestätigt, so dass fünf Linien, nämlich A2, A7, A11, A17 und A33 für die Sequenzanalyse in Frage kamen (Abbildung 11). Dazu wurde zunächst, auch um Informationen über die Größe verbliebener P-Element Reste zu bekommen, eine „long range“ PCR (erfolgreiche PCR mit Primerpaar: 688+689) über den gesamten Bereich ausgeführt. Die PCR war für A2 (ca. 3kb), für A11 (ca. 11kb) und für A17 (ca. 8kb) erfolgreich. Die PCR-Produkte wurden dann in den Vektor pDrive (QIAGEN) subkloniert um genug Material für die Sequenzierung zu erhalten. Das 11kb Produkt von A11 konnte bislang nicht erfolgreich kloniert werden. Der Klon, der das Produkt A2 enthielt wurde vollständig sequenziert (Abbildung der Gesamtsequenz im Anhang VI.2; die original Einzel-Sequenzen finden sich ebenfalls im Anhang). Die Sequenzen sind im Anhang zu finden. Die Analyse der Sequenz zeigt, dass die genomische *omb* upstream-Region vollständig deletiert ist. Lediglich Sequenzreste des P-Element [P2] sind noch erkennbar, sowie zwei P-Elementenden, die durch ihre charakteristische Sequenz auffallen. Ob das zweite Ende ebenfalls von [P2] oder von [P3] abstammt ist schwer zu sagen, da beide Elemente die gleiche terminale Sequenz besitzen. Wichtig ist jedoch, dass die komplette genomische Region zwischen den Elementen deletiert wurde und die *omb* TU durch den unpräzisen Sprung des transposablen Elementes unbeschädigt blieb. Die Linie A2 wurde folglich als *omb*-URR-Deletionslinie etabliert und ihr Phänotyp in entwicklungsbiologischer Hinsicht untersucht.

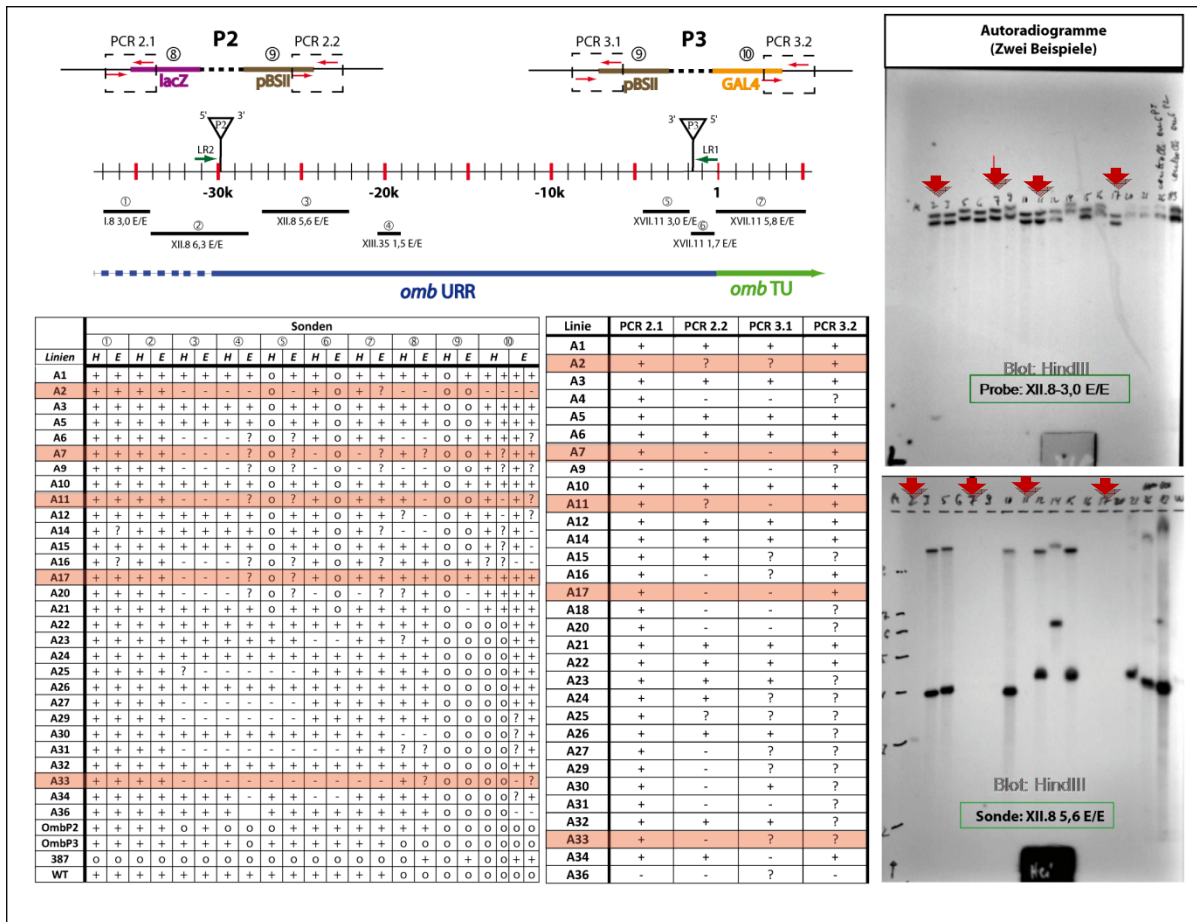


Abbildung 11: Übersicht über die vollständigen Ergebnisse der Charakterisierung der P[2]-P[3] Deletionslinien. In der schematischen Übersicht der genomischen Region sind alle PCR-Primer als Pfeile eingezeichnet. Alle Sonden sind als schwarze Linien mit ihrer Nummer zu sehen. In der Tabelle darunter finden sich die Resultate der Experimente. Da alle Blot-Experimente doppelt ausgeführt wurden, einmal mit HindIII verdauter DNA und einmal mit EcoRI verdauter DNA, gibt es für jede Hybridisierung zwei Spalten. H steht für HindIII, E für EcoRI. Ein Plus steht für einen positiven Befund (d. h. dass das Fragment noch mindestens teilweise vorhanden ist). Ein Minus steht für einen negativen Befund (d. h. dass das Fragment wahrscheinlich nicht mehr existiert). In manchen Fällen konnte aufgrund einer sehr schwachen Färbung des Röntgenfilms nicht mit absoluter Sicherheit gesagt werden, ob das Fragment noch existiert, oder ob man von Hintergrund auszugehen hat. Diese Fälle sind mit einem Fragezeichen markiert. Rot unterlegt sind die Linien, die aufgrund weniger positiver Befunde am geeignetsten schienen, per long range PCR näher zu betrachten. Rechts sind beispielhaft für alle Autoradiogramme zwei HindIII Blots mit den Sonden 1 und 3 zu sehen. Die Linien A2, A7, A11 und A17 sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Die Linie A33 ist nicht auf diesen beispielhaft gezeigten Blots aufgetragen. Anhand dieser Daten erfolgte die Auswertung. Als Kontrolle wurden die Linien Nr83 und Nr26, die jeweils die Insertion [P2] oder P[3] tragen benutzt.

Die Linie A2 ist in Weibchen semiletal; die Männchen haben eine mit FM7a/Y vergleichbare Überlebensrate. Trotz der reduzierten Vitalität der Weibchen sind die adulten Tiere bei 25°C äußerlich weitgehend wildtypisch. Die einzigen Defekte, die bislang festgestellt werden konnten, sind eine delta-förmige Verbreiterung des distalen Endes der Flügellongitudinalvene L3 mit einer ektopischen ventralen Borste in diesem Bereich sowie

eine leichte Reduktion der Flügelgröße. Der Phänotyp unterscheidet sich deutlich von dem *omb* Allel *bifid*, das zusätzlich eine proximale Fusion aller Flügelvenen aufweist (Shen et al., 2008).

Es wurde außerdem eine *omb* spezifische RNA Sonde mittels in vitro Transkription vom linearisiertem cDNA Klon pcell-52-7 (Pflugfelder, unveröffentlicht) hergestellt. Neben dem antisense-Produkt (durch XbaI Linearisierung und T3 RNA Polymerase Reaktion) wurde zur Kontrolle auch das sense-Produkt (durch XhoI Linearisierung und T7 RNA Polymerase Reaktion) hergestellt und benutzt.

Ziel war es, das *omb* Expressionsmuster in den Imaginalscheiben der L3-Larve der Deletionslinie A2 mit dem des wildtypischen Musters zu vergleichen. Die Linie A2 wurde dazu zunächst mit FM-GFP umbalanciert, so dass die balancierten Larven durch die Fluoreszenz kenntlich wurden. Die Imaginalscheiben von nicht-fluoreszenten L3-Larven wurden präpariert und mit der *omb* RNA-Sonde hybridisiert. Da diese Technik aber nicht zum Erfolg führte wurde anders verfahren.

Mittels Antikörperfärbung wurde untersucht, wie sich die Deletion eines großen Teiles der *omb* upstream Region, die auch einen Flügelhancer enthält, auf die Expression von Omb auswirkt. Mutante Tiere zeigen eine deutlich reduzierte Omb Expression im Bereich der larvalen Flügel *pouch* (der zukünftigen Flügelspreite) sowie im Bereich der ventralen Pleura (einer Körperwand-Anlage). Die Färbeintensität ist bei Weibchen auf etwa 50% des wildtypischen Wertes reduziert (Shen et al., 2008). Da die Hintergrundfärbung > 0 ist, sind die Farbintensitäten der Omb Konzentration nicht direkt proportional. Alle existierenden *omb* Nullallele können zumindest einen Teil des Omb Proteins noch herstellen, so dass sie nicht geeignet sind, die Hintergrundfärbung durch das polyklonale anti-Omb Serum zu quantifizieren. In diesem Zusammenhang sind die *omb*[P6] Deletionslinien von Bedeutung, da in ihnen möglicherweise kein Omb mehr synthetisiert werden kann (siehe entsprechendes Kapitel weiter unten).

Die entwicklungsbiologische Charakterisierung von Weibchen der *upstream-deletion* Mutante wurde von Dr. Jie Shen im Labor durchgeführt. Sie zeigte, dass Omb in der larvalen *wing pouch* exprimiert werden muss, um die Ausbildung einer anormalen apikalen Falte entlang der anterior-posterioren Kompartimentgrenze zu verhindern (Shen et al., 2008).

III-A-1.2 Enhancer-reporter Konstrukte

Mittels long-range PCR und geeigneter Primer wurden die in der Abbildung 12 rot umrahmten genomischen Fragmente hergestellt (Tabelle 1). Das etwa 12kb große Fragment *pomb25* wurde in drei überlappende Subfragmente *pomb25A*, *pomb25B* und *pomb25C* aufgeteilt. Diese sollten die noch nicht von Sivasankaran et al. (2000) untersuchten Bereiche der *omb* URR ergänzen. Desweiteren wurden noch PCR-Produkte über die Regionen *pomb27A*, *pomb27B*, *pomb19A*, *pomb19B* und *pomb19C*, sowie *pomb24* erstellt, um noch weitere Ergänzungen im Bereich der bereits beschriebenen Enhancer durchzuführen. Die *pomb25*, *pomb19* und *pomb24* Fragmente wurden in den PCR-Cloning Vektor pDrive (QIAGEN) zunächst subkloniert. Diese Subklone konnten erfolgreich erstellt werden. Die Fragmente *pomb27A* und *pomb27B* sollten wegen der Präsenz vieler Restriktionsschnittstellen direkt über A/T Ligation in pCPLZ kloniert werden. Der Vektor wurde dazu mit BamHI linearisiert und der Überhang mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Mit TdT Reaktion sollte unter Anwesenheit von ddTTP ein Einzel-T-Überhang am Vektor erzeugt werden. Das mit Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkt trug dadurch bereits einen A-Überhang. Diese Klonierung war nicht erfolgreich. Die Umklonierung der in pDrive subklonierten anderen Fragmente in den Enhancer-reporter Vektor pCPLZ wurde im Rahmen einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe fortgesetzt (Mayer, 2008).

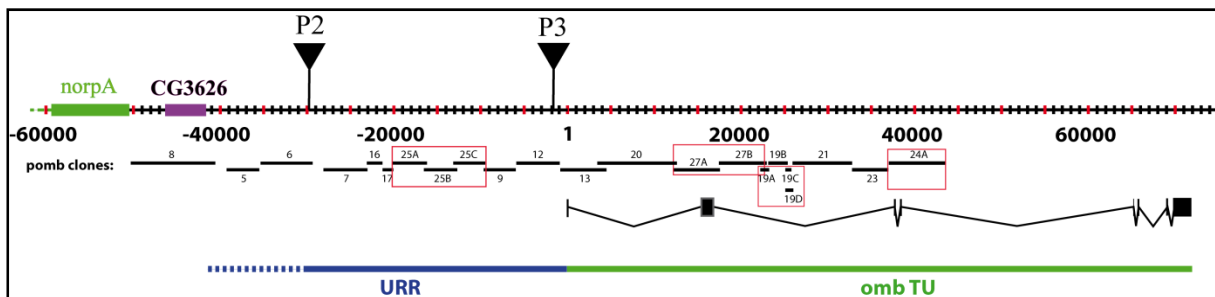


Abbildung 12: Die Abbildung zeigt die verschiedenen pomb-Fragmente und deren Position relativ zur *omb* URR. Die rot umrandeten Bereiche wurden in dieser Arbeit bearbeitet. Sie schließen noch vorhandene Lücken in der Gesamtanalyse von Sivasankaran et al. 2000 (vgl. Abbildung in Einleitung).

Fragment	Primer 1	Primer 2	Schnittstelle	Größe
pomb 25A	818	819	BamHI-Linker	4170bp
pomb 25B	820	821	BamHI-Linker	3961bp
pomb 25C	822	823	BamHI-Linker	3840bp
pomb 27A	832	833	A/T	5675bp
pomb 27B	834	835	A/T	5542bp
pomb 19A	824	825	BamHI-Linker	1074bp
pomb 19B	826	827	BamHI-Linker	2347bp
pomb 19C	828	829	BamHI-Linker	742bp
pomb 24A	830	831	EcoRI-Linker	6923bp

Tabelle1: Übersicht über die generierten PCR-pomb-Fragmente. Die verwendeten Primer, sowie die Fragmentgröße sind angegeben.

III-A-1.3 Charakterisierung einer Omb Nullmutante nach Mobilisierung von Omb[P6]

Bislang existierte noch keine vollständige Omb Protein-Nullmutante, da gezeigt werden konnte, dass ein alternativer Transkriptionsstartpunkt in Nähe des Exons II existiert (Abbildung 13; Scharf, 2002). Dadurch führt eine Deletion nur des primären Transkriptionsstartes nicht zu einer vollständigen Protein Nullmutante, selbst wenn das alternative Produkt das native Omb nicht in seiner Funktion ersetzt. Des weiteren sind alle bislang molekular analysierten Nullallele missense oder nonsense Mutationen bzw. chromosomale Aberrationen, in denen noch Teile des ursprünglichen Omb Proteins gebildet werden können, die durch das polyklonale Antiserum erkannt werden könnten (Poeck et al., 1993b). Für entwicklungsbiologische Untersuchungen, wäre eine Nullmutante, in der kein Omb protein mehr nachweisbar ist, von großem Nutzen. Durch Mobilisierung und unpräzisen Heraussprung des in der Nähe von Exon II inserierten P-Elementes[P6] sollte nun der alternative Transkriptionsstart und, wenn möglich Exon 2 eliminiert werden. Abbildung 13 zeigt eine Übersicht der Exon-Intron-Struktur von *omb* in dieser Region. Mit der Charakterisierung der Linien wurde bereits in der Vergangenheit (Dorner, 2003) begonnen. Diese Arbeit wurde hier fortgesetzt.

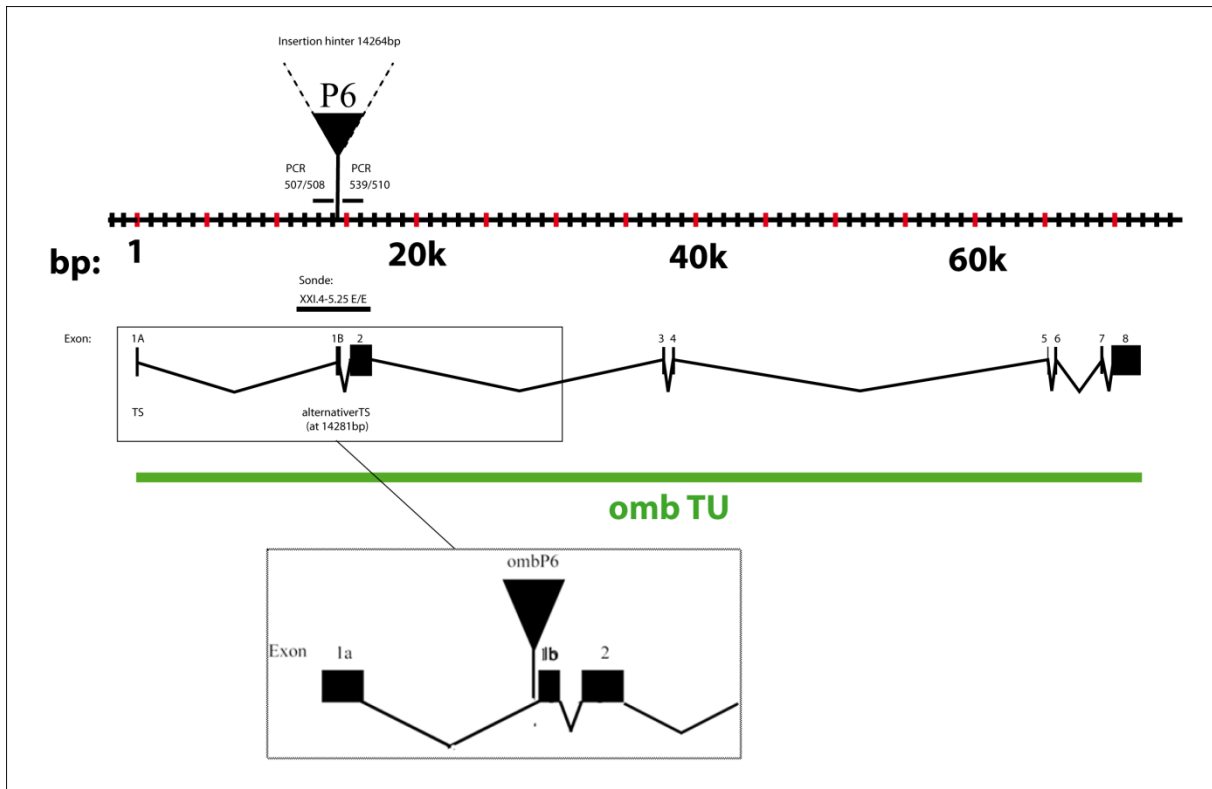


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt den Insertionsort des P-Elementes *ombP[6]*. Exon 1b bezeichnet den alternativen Startpunkt der Transkription nach S. Scharf (2002). Die verwendete Sonde und die im Text beschriebenen Primer sind eingetragen.

Die aus der Kreuzung der *P[6]* Linie mit *jump starter* Fliegen entstandenen weissäugigen Fliegen wurden über FM-GFP (green balancer) als Stämme etabliert. Für die PCR Experimente wurde DNA aus einzelnen (nicht-fluoreszenten) Embryonen oder Larven isoliert. Fluoreszierende Tiere tragen das Balancerchromosom und würden die PCR-Ergebnisse, die auf negativer Evidenz basieren, verfälschen. Die DNA wurde per PCR und durch Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde XXI.4-5.25 E/E im Bereich des *[P6]*-Insertionsorts auf die Deletion des P-Elementes hin untersucht. Abbildung 14 fasst die Ergebnisse zusammen. Wie aus der Abbildung 14 zu erkennen ist, wurden vier potentielle *Omb* Protein-Nullmutantenlinien gefunden. Die Linien 783, 784, 785 und 788 zeigen keine PCR Produkte, was auf die Deletion zumindest einer Primerbindestelle schließen lässt. Da in diesen Fällen auch die den Insertionsort umspannende long range PCR negativ verlief, wird dieses Ergebnis bestätigt. Betrachtet man die Southern-Blot Ergebnisse, so fällt auf, dass bei 783 und 784 nur die wildtypischen Banden des Balancer Chromosom auftraten. Die Sonde XXI.4-5.25 E/E umfasst den Insertionsort von *omb[P6]*. Ist die Insertion in diesem Bereich noch (teilweise) vorhanden, erwartet man ein anderes Bandenmuster. Eine Detailanalyse dieser vier Linien, in der das genaue Ausmaß der Deletionen bestimmt wird, steht noch aus.

Stamm	EcoRI Blot	Hind III Blot	PCR 507/508 distal zu [P6]	PCR 539/510 Proximal zu [P6]	PCR 507/510 über [P6] hinweg
504 omb[P6]/FM0	Kontrolle mit [P6] Insertion	Kontrolle mit [P6] Insertion	+	+	+
782	Nicht auf Blot verfügbar	Nicht auf Blot verfügbar	+	+	+
783	Normales Bandenmuster	Normales Bandenmuster	-	-	-
784	Normales Bandenmuster	Normales Bandenmuster	-	-	-
785	1 zusätzliche Bande	1 zusätzliche Bande	+	-	-
786	1 zusätzliche Bande	1 zusätzliche Bande	+	+	+
787	2 zusätzliche Banden	1 zusätzliche Bande	+	+	+
788	1 zusätzliche Bande	1 zusätzliche Bande	+	-	-
789	1 zusätzliche Bande	nicht eindeutig identifizierbar	-	+	+
790	1 zusätzliche Bande	1 zusätzliche Bande	-	+	+
791	Nicht auf Blot verfügbar	Nicht auf Blot verfügbar	+	+	+

Abbildung 14: Die Abbildung zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der PCR und Blot-Experimente. Potentielle Deletionsmutanten sind die Linien 783, 784, 785 und 788. Diese Linien zeigen kein PCR Produkt auf mindestens der den Insertionsort proximal flankierenden Seite. Die Southern Blots wurden mit DNA aus heterozygoten Fliegen hergestellt. Da manche Linien zum Zeitpunkt des Blotexperimentes nicht in ausreichender Menge vorhanden waren, fehlen in diesen Fällen die Blot-Daten. Die PCR Ergebnisse sprachen in diesen Fällen aber gegen eine Deletion, weswegen die Blots nicht nachgeholt wurden. Da die genomische Sonde XXI.4-5.25 E/E den Insertionsort von [P6] umfasst, zeugen zusätzliche Banden von Bruchpunkten. im Bereich der Sonde.

III-A-1.4 Molekulare Charakterisierung des transposablen Elementes Qd[For]

Bei der Insertion Qd[For] handelt es sich um ein hochmobiles Transposon, das downstream der Omb Transkriptionseinheit ins Genom inseriert ist. Dieses Element molekular näher zu charakterisieren, wurde bereits früher begonnen ((Bonengel, 1999), (Dorner, 2003)) und in dieser Arbeit fortgeführt. Der Insertionsort wurde dabei bereits auf ein 1,5kb großes genomisches Fragment eingegrenzt. Ein PCR basiertes Experiment brachte genauere Erkenntnis über den Insertionsort innerhalb dieser 1,5kb großen Region (Dorner, 2003). Mit zwei weiteren PCR Reaktionen mit den Primerpaaren 535/542 und 535/543 wurde eine weitere Eingrenzung des Insertionsortes erzielt. Für alle PCR Reaktionen wurde eine Wt-Kontrolle durchgeführt, um ein Versagen der PCR bei negativem Befund ausschließen zu können. Inverse PCR sollte jetzt schließlich Aufschluss geben über die Natur des Elementes, dessen Größe auf mindestens 23-40kb (anhand der Daten von Bonengel (Bonengel, 1999)) geschätzt werden kann. Dazu wurde Qd[For] DNA in zwei Ansätzen mit (1)Maell und (2)Bsh1236I verdaut und ligiert. Mit dem Primerpaar 529/626 (1) auf der linken Seite der Insertion und 531/535 (2) auf der rechten Seite wurde die inverse PCR durchgeführt. (1) ergab ein ca. 200bp Fragment, (2) ein etwa 900bp großes Fragment. Beide Produkte wurden sequenziert. Eine Übersicht dieser Experimente und der verwendeten Primer findet sich in Abbildung 15. Nach Abgleich der Sequenzdaten mit der Datenbank (NCBI) ergab sich die Erkenntnis, dass es sich bei der Insertion um ein Foldback Element (FB-Element) handelt. Deutlich sind in der Sequenz die charakteristischen Wiederholungen kurzer Abschnitte erkennbar. Da die inverse PCR nur einen kleinen Bereich des Elementendes zur Analyse zugänglich gemacht hatte, wurde versucht, anhand der neuen Sequenz eine weitere iPCR durchzuführen und sich so weiter ins Innere des Elementes zu tasten. Es wurde Sau3AI für den Verdau benutzt und mit den Primerpaaren 534/638 eine weitere inverse PCR ausgeführt. Sie war aber nicht erfolgreich. Aufgrund der hohen Repetitivität der Sequenz und der damit verbundenen mehrfachen Bindemöglichkeit der Oligos, war es nicht möglich sinnvoll weitere Primer in dem sequenzierten Bereichen zu generieren um mehr über die inserierte Sequenz zu erfahren.

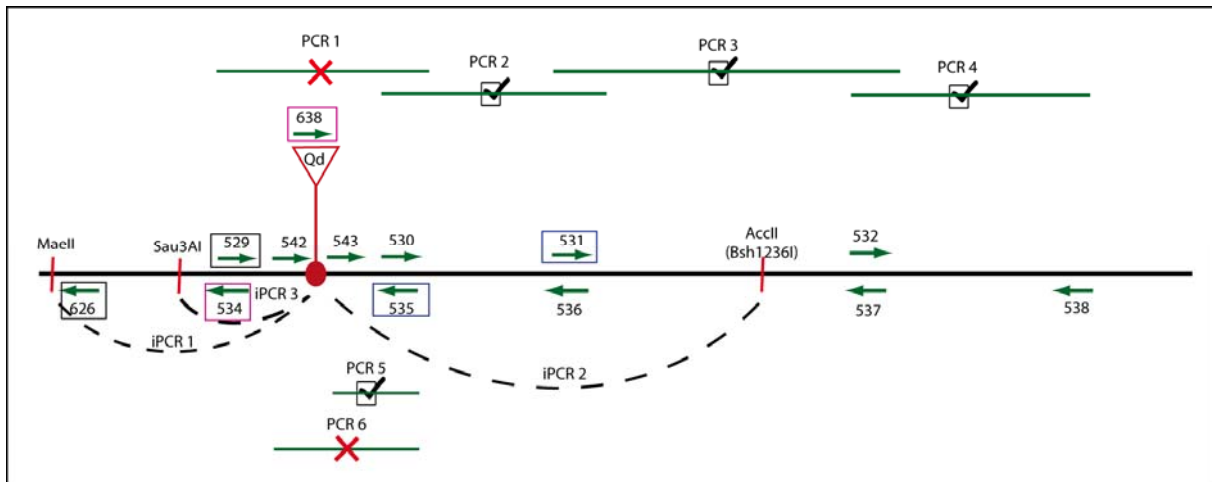


Abbildung 15: Schematische Übersicht über die bisher erläuterten Experimente und deren Ergebnisse. Alle Primer sind als grüne Pfeile in ihre Laufrichtung gezeichnet. Die PCR-Produkte sind als grüne Linien zu sehen und entweder mit Haken (wenn erfolgreich) oder mit Kreuz (wenn nicht erfolgreich) markiert. Zuerst fand eine grobe Kartierung mit den PCR Reaktionen 1-4 statt, dann eine Feinkartierung mit PCR 5 und 6. Der rote Punkt gibt den so vermuteten Insertionsort an. Basengenauen Aufschluss und Sequenzstruktur der Enden der Insertion Qd[For] wurde durch iPCR erhalten. Alle iPCR Primer sind zusätzlich mit einem Kasten in der Farbe ihrer Zusammengehörigkeit umfasst. Die Restriktionsstellen im genomischen Bereich sind durch rote Striche markiert, die den Namen des Enzyms tragen. Die zweite Schnittstelle liegt immer irgendwo in der Insertion.

Deshalb wurde eine neue Technik angewandt, um ein möglichst großes Stück der Fragmentsequenz zu isolieren. Universal Fast Walking (UFW), eine komplexe Methode, die 2002 von Myrick und Gelbart (Myrick and Gelbart, 2002) entwickelt wurde, um sehr große Fragmente zu amplifizieren, schien eine Lösung zu bieten. Trotz mehrfacher Wiederholung konnte die Methode in diesem Fall aber nicht erfolgreich angewandt werden. So wurde als letztes Mittel in Erwägung gezogen, eine Phagenbank zu erstellen. Dazu war es nötig, die Fragmente, die Qd[For] DNA enthalten aus dem genomischen Verdau zu isolieren, deren Größe zu bestimmen und sie in dafür geeignete Phagen zu klonieren. Dazu wurde Qd[For] DNA aus 200 Fliegen isoliert (Qiagen genomic tip 100 Säule) und mit einer Reihe von Restriktionsenzymen verdaut. Das Gel wurde per Southernblot auf eine Nytran-Membran übertragen. Dort erfolgte die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde XIII.46 11,5 Sal/Sal (G. Pflugfelder). Diese entspricht der genomischen WT Sequenz am Insertionsort. Durch das inserierte Material kommt es zu verändertem Bandenmuster, wenn Wt gegen Qd[For] Verdau verglichen wird. Das Ergebnis des Experimentes ist in Abbildung 16 zu sehen. Die in Qd[For] größeren Banden beim BclI, PstI und Sall Verdau sind im Bild hervorgehoben. Diese Fragmente enthalten Qd[For] Material und sollten anschließend isoliert werden.

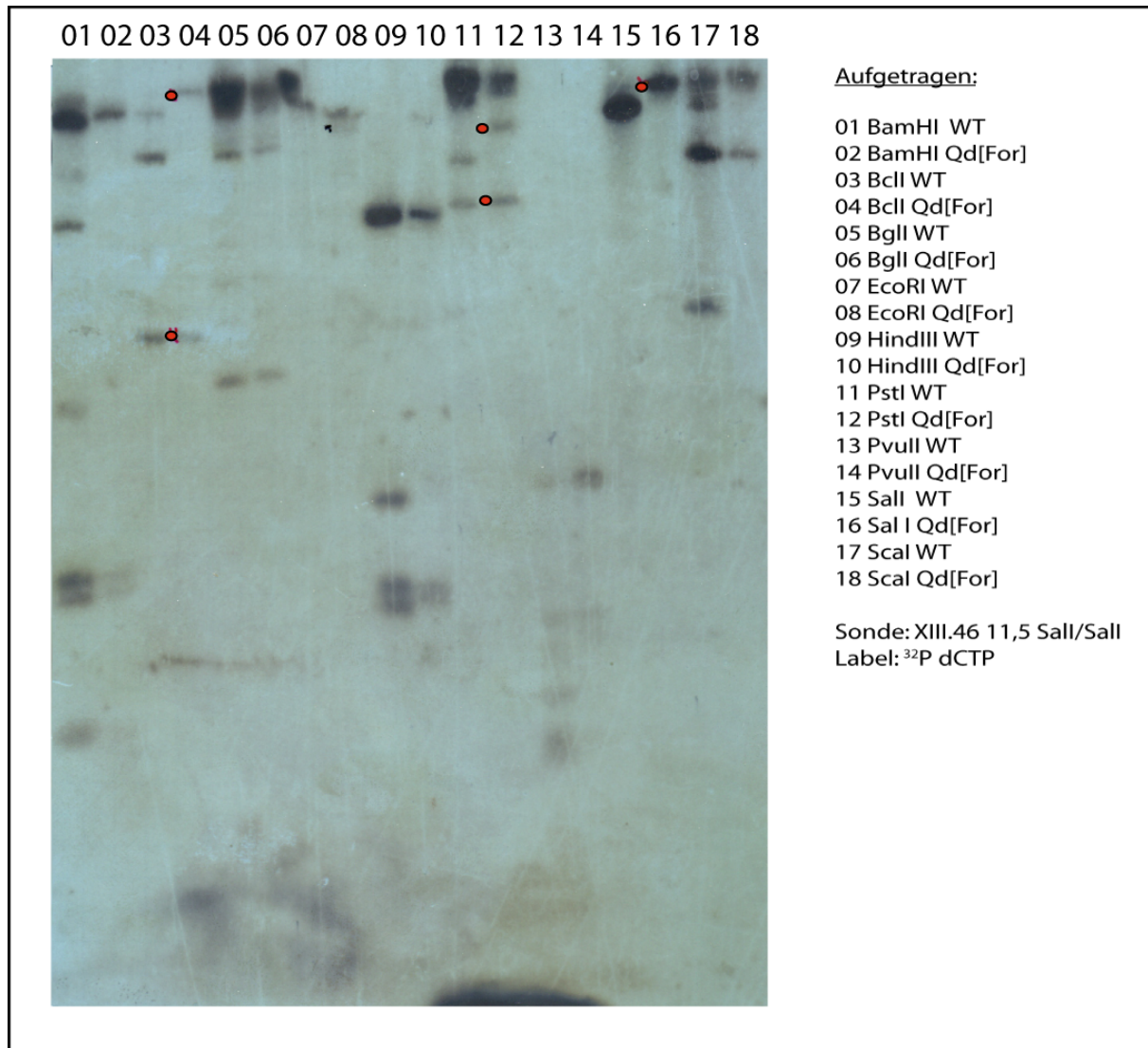


Abbildung 16: Autoradiogramm eines Southernblots, auf dem mit verschiedenen Enzymen verdaute genomische Qd und WT DNA nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde (XIII.46 11,5 Sall/Sall) gegeneinander verglichen werden um diejenigen Fragmente isolieren zu können, die einen Teil der Insertion tragen. In der ersten Spur jedes Paares ist immer die WT DNA aufgetragen, in der zweiten dann die entsprechende Qd DNA. Rot hervorgehoben sind die Spuren, bei denen eine Größenzunahme eines Fragmentes gegenüber der WT Kontrolle zu sehen ist. Diese Fragmente tragen Teile des mobilen Elementes und sollten isoliert werden.

Dazu wurde wie folgt verfahren. Die betreffenden genomischen Verdaus wurden wiederholt und doppelt auf ein 0,6%iges Agarosegel aufgetragen. Auf der linken Gelhälfte wurde eine analytische Menge an DNA aufgetragen, auf der rechten Seite der präparative Rest. Die mittlere Spur blieb frei. Nach der Elektrophorese wurde das Gel geteilt. Die analytische Hälfte wurde geblottet, während die präparative Hälfte aufbewahrt wurde. Nach Hybridisierung mit XIII.46 11,5 Sal/Sal und Autoradiographie, konnte man sehen, auf welcher Höhe die gewünschten Banden laufen. Das Autoradiogramm wurde dann zur

Positionsbestimmung auf der präparativen Hälfte des Gels herangezogen. Mit einem Skalpell wurden die so bestimmten Gelstücke ausgeschnitten und die DNA eluiert. Abbildung 17 zeigt den Ablauf des Experimentes.

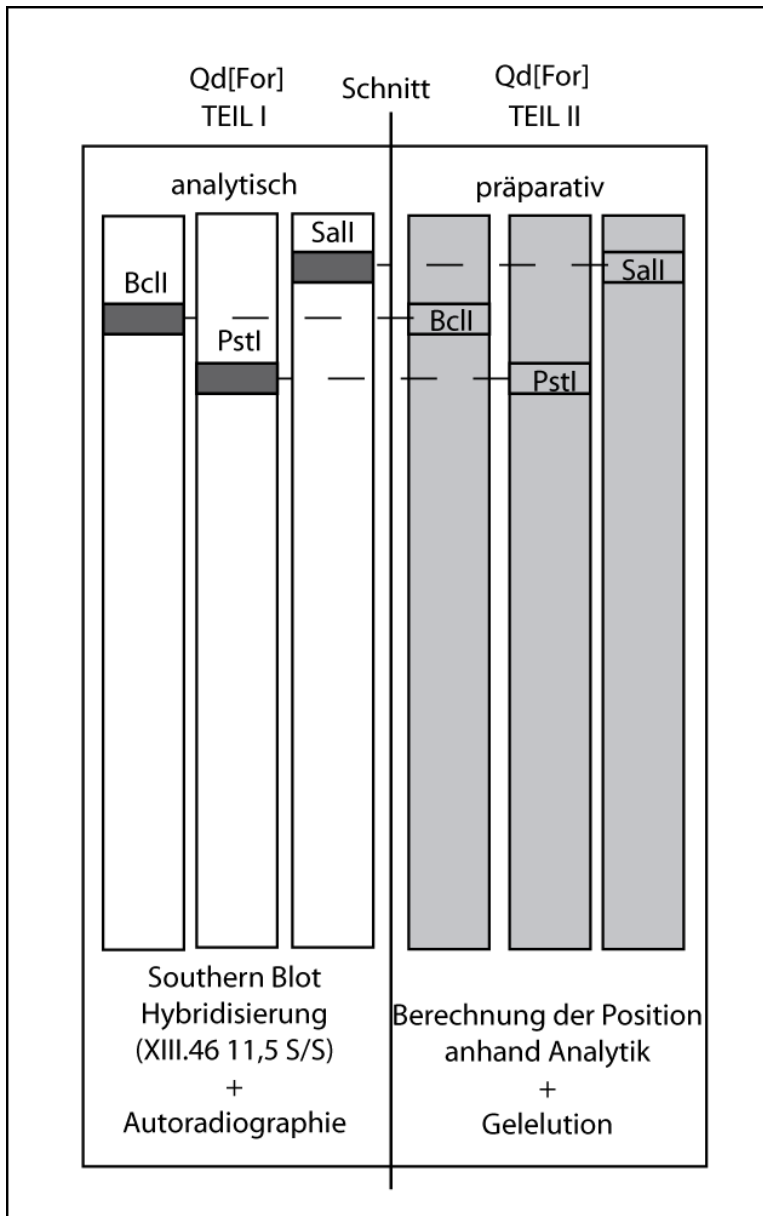


Abbildung 17: Die Graphik zeigt, wie das Experiment fortgeführt wurde. Das Gel wurde in der Mitte nach der Elektrophorese geteilt. Teil I des Gels, auf das analytische Mengen an Qd[For] DNA aufgetragen wurden, wurde anschließend geblottet und mit der Sonde XIII.46 11,5 Sal/Sal hybridisiert, um die Position der richtigen Fragmente aus dem genomischen Verdau erkennen zu können. Diese Daten wurden vom Autoradiogramm maßstabsgerecht auf Teil II des Gels, der den präparativen Verdau enthält, übertragen. Dort wurden an entsprechender Stelle Gelstücke ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA isoliert.

Auf Grund der Größe der Fragmente kam es dabei zu Problemen. Der Standardkit (Qiagen Gel extraction kit) eignete sich nicht für Fragmente dieser Größe und keine der weiteren, verwendeten Methoden führte zu akzeptablen Erfolg. Zuletzt wurde versucht mittels einer durch eine semipermeable Membran in Kompartimente unterteilten kleinen Elektrophoresekammer, die Fragmente aus den Gelstücken in einem Teil der Kammer zu fangen (BioTrap). Aber wie bei allen anderen Methoden (verschiedene Kits, Phenolextraktion) war auch dabei die erhaltene Konzentration an gereinigtem Material zu gering um die Phagenklonierung damit durchzuführen. Da keine Fliegen für einen noch größeren Präparationsmaßstab zur Verfügung standen, wurde das Projekt an dieser Stelle vorläufig eingestellt.

III-A-1.5 Molekulare Charakterisierung von In(1)ombH31

Da der distale Bruchpunkt des zuerst isolierten *omb* Allels In(1)ombH31 bislang nur durch eine vorläufige molekulare Kartierung bekannt war (Poeck, 1989), sollte in dieser Arbeit eine genauere molekulare Kartierung erfolgen, um den basengenauen Insertionsort kennenzulernen. Da durch die bereits vorhandenen Daten eine Eingrenzung auf eine bestimmte genomische Region erfolgen konnte, wurde eine Reihe von Primern synthetisiert, mit deren Hilfe PCR Reaktionen durchgeführt wurden. Der Forward-Primer (842), der außerhalb der Region mit der Bruchstelle liegt, wurde dazu mit mehreren Revers-Primern (843-846), die in Abständen hintereinander im relevanten Bereich liegen, kombiniert (Abbildung 18). Da durch die große Inversion des genomischen Bereiches die entsprechenden reversen Primer, die nach dem Inversionsort liegen, für PCR Reaktionen nicht mehr zur Verfügung stehen, kann ein Produkt nur vor dem Bruchpunkt zustande kommen. Als Kontrolle für das Funktionieren der PCR Reaktion per se wurde gleichzeitig Wildtyp-DNA verwendet. Die vier PCR Reaktionen mit den Primern 843-846 wurden ausgeführt. Auf der Kontroll-DNA wurden alle erwarteten PCR Produkte erhalten. Die beiden ersten PCR-Produkte wurden auch auf der H31 DNA erhalten, die beiden letzten nicht, was auf eine Insertion zwischen dem zweiten und dritten Primerpaar schließen lässt (Abbildungen 18, 20).

Anhand dieser Information konnten die Restriktionsenzyme *Sau3AI* und *Hin6I* für die nachfolgende inverse PCR als geeignet betrachtet werden. Begonnen wurde mit *Hin6I*-Verdau, da dessen Erkennungssequenz direkt benachbart dem nach den PCR Ergebnissen

vermuteten Inversionsstartes liegt. Nach Ligation des genomischen Verdaust sollte dann die inverse PCR mit den Primern 855 und 856 durchgeführt und Sequenzierung des Produktes mit Primer 856 basengenauen Aufschluss geben (Abbildung 19). Die inverse PCR wurde im Rahmen eines Praktikums zwar mehrfach durchgeführt, führte aber zu keinem Ergebnis.

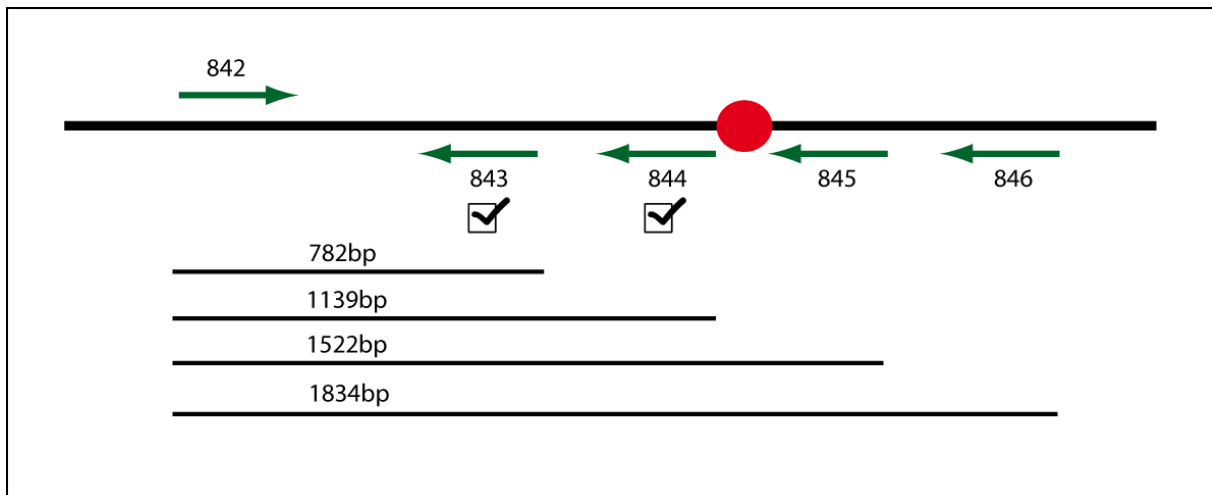


Abbildung 18: Schematische Übersicht über die molekulare Kartierung des Bruchpunktes der Inversion In(1)ombH31. Die grünen Pfeile stehen für die verwendeten Primer, der Haken unter dem entsprechenden reverse Primer zeigt den Erfolg auf H31 DNA an. Darunter sind die Größen aller PCR Produkte zu sehen, die auf WT-DNA erhalten wurden. Der rote Punkt markiert die etwa 380bp große Region, in der der Bruchpunkt liegen muss.

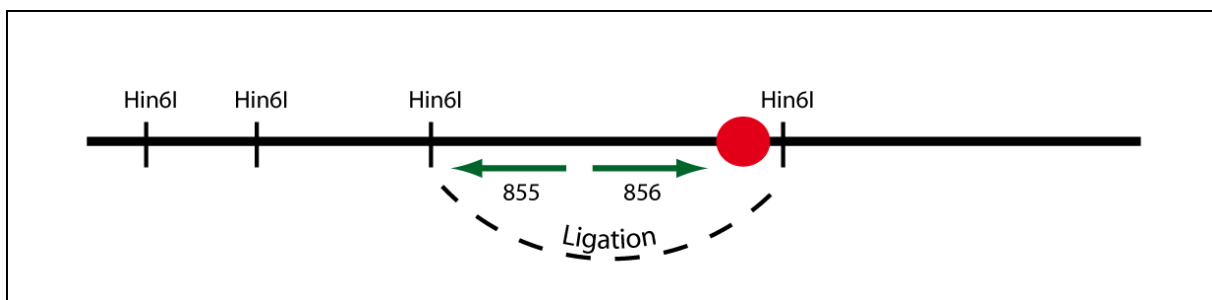


Abbildung 19: Schematische Übersicht über die inverse PCR, die basengenauen Aufschluss über den Inversionsstartpunkt H31 geben sollte. Die grünen Pfeile zeigen die Primer, von denen 856 auch zum Sequenzieren des iPCR-Produktes vorgesehen war. Die Restriktionsstellen des Enzyms Hin6I sind ebenfalls dargestellt. Eine Schnittstelle liegt demnach vor dem vermuteten Inversionsstart, die zweite irgendwo innerhalb der Inversion. Der rote Punkt stellt den Bruchpunkt dar.

III-A-2 Mutationen in Omb

III-A-2.1 Mutationen in der Omb T-Domäne: K431E, K431R und K431G

Ziel des Experimentes war es, die Aminosäure Lysin an Position 431 von Omb durch die Aminosäuren Glutaminsäure, Arginin und Glycin zu ersetzen. Lysin ist an dieser Stelle in Omb konserviert und liegt innerhalb einer Region, die beim menschlichen TBX3 Funktion für DNA Bindung hat (Muller and Herrmann, 1997). Wie auch schon in der Einleitung erwähnt, wurden in *C. elegans* TBX2 ähnliche Mutationen gefunden. Diese Mutanten zeigen Defekte in der olfaktorischen Adaption (Miyahara et al., 2004). Auch dort war Lysin gegen Arginin und Glutaminsäure ersetzt. Durch die gezielte Mutation der vergleichbaren Region des TBX3 homologen Omb in *Drosophila melanogaster* sollte die Voraussetzung geschaffen werden, um die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Eigenschaften des Proteins *in vitro* und *in vivo* bestimmen zu können.

Der dritte Austausch von Lysin zu Glycin diente dazu festzustellen, ob der Verlust von Lysin zum beobachteten Phänotyp führt, oder ob die Eigenschaften der substituierten Aminosäuren ausschlaggebend sind. Mittels „site directed mutagenesis“ wurden die Konstrukte im Vektor pBAT7071 hergestellt, der bereits die betreffende *omb* Sequenz trägt. Nach erfolgreicher Mutation sollten die mutagenen *omb* kodierenden Sequenzen in den P-Elementvektor pUAST umklontiert und injiziert werden. Alle Mutagenesen wurden erfolgreich durchgeführt, wie in den Abbildungen 22, bis 24 gezeigt ist. Die Originalsequenz ist im Anhang zu finden. Da bei der Injektionstechnik zu jener Zeit massive technische Schwierigkeiten auftraten, wurden die beiden nachfolgenden Schritte noch nicht ausgeführt.

Abgleich der Proteinsequenzen WT gegen Mutagenese:	
Omb(431E) : 1	KVTLEGKDLWEKFKHLGTEMVITKSGRQMFPQMKFRVSGLDAKAKYILLLDIVAADDYRY 60
	KVTLEGKDLWEKFKHLGTEMVITKSGRQMFPQMKFRVSGLDAKAKYILLLDIVAADDYRY
Omb : 329	KVTLEGKDLWEKFKHLGTEMVITKSGRQMFPQMKFRVSGLDAKAKYILLLDIVAADDYRY 388
Omb(431E) : 61	KFHNSRWMVAGKADPEMPKRMVIHPDSPTTGEQWMQKVVSFH E LKLTNNISDKHGFVSTT 120
	KFHNSRWMVAGKADPEMPKRMVIHPDSPTTGEQWMQKVVSFH+LKLTNNISDKHGFVSTT
Omb : 389	KFHNSRWMVAGKADPEMPKRMVIHPDSPTTGEQWMQKVVSFH K LKLTNNISDKHGFVSTT 448
Omb(431E) : 121	ILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRTYVFKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNNP 178
	ILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRTYVFKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNNP
Omb : 449	ILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRTYVFKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNNP 506

Abbildung 22: Die Abbildung zeigt den Abgleich der Proteinsequenz des mutierten Plasmides pBAT7071[omb431KtoE] gegen pBAT7071[WT]. Die erhaltene Mutation ist rot hervorgehoben. Die

Originalsequenz findet sich im Anhang. Die Übersetzung erfolgte durch ExPASy, das Alignment mit BLASTp.

Abgleich der Proteinsequenzen WT gegen Mutagenese:

```

Omb[K431G] : 168 SFHGLKLTNNISDKHGFVSTTILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRITYVFKETEFI 227
                SFH LKLTNNISDKHGFVSTTILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRITYVFKETEFI
Omb       : 428 SFHKLKLTNNISDKHGFVSTTILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRITYVFKETEFI 487

Omb[K431G] : 228 AVTAYQNEKITQLKIDNXPFAFGFRDTGA 256
                AVTAYQNEKITQLKIDN PFA G RDTGA
Omb       : 488 AVTAYQNEKITQLKIDNPNFAKGLRDTGA 516
    
```

Abbildung 23: Die Abbildung zeigt den Abgleich der Sequenz des mutierten Plasmides pBAT7071[omb431KtoG] gegen pBAT7071[WT]. Die erhaltene Mutation ist rot hervorgehoben. Die Originalsequenz findet sich im Anhang. Die Übersetzung erfolgte durch ExPASy, das Alignment mit BLASTp. Die Sequenzunterschiede am Ende der Mutantensequenz beruhen wahrscheinlich auf einer schlechten Lesbarkeit der DNA Sequenz in diesem Bereich (s. Anhang).

Abgleich der Proteinsequenzen WT gegen Mutagenese :

```

Omb[K431R] : 40  DDVVLASAVAHQLHPAMRPLRALQPEDDGVVDDPKVTLEGKDLWEKFHKLGTENVITKSG 99
                +DDVVLASAVAHQLHPAMRPLRALQPEDDGVVDDPKVTLEGKDLWEKFHKLGTENVITKSG
Omb       : 295 EDVVLASAVAHQLHPAMRPLRALQPEDDGVVDDPKVTLEGKDLWEKFHKLGTENVITKSG 354

Omb[K431R] : 100 RQMFPQMKFRVSGLDAAKAKYI LLLDIVAADDYRYKFHNSRWMVAGKADPEMPKRMYPHPD 159
                RQMFPQMKFRVSGLDAAKAKYI LLLDIVAADDYRYKFHNSRWMVAGKADPEMPKRMYPHPD
Omb       : 355 RQMFPQMKFRVSGLDAAKAKYI LLLDIVAADDYRYKFHNSRWMVAGKADPEMPKRMYPHPD 414

Omb[K431R] : 160 SPTTGEQWMQKVVSFHRLKLTNNISDKHGFVSTTILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYS 219
                SPTTGEQWMQKVVSFH+LKLTTNNISDKHGFVSTTILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYS
Omb       : 415 SPTTGEQWMQKVVSFHKLKLTNNISDKHGFVSTTILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYS 474

Omb[K431R] : 220 TFRTYVFKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNPNFAKGRDTGAG 262
                TFRTYVFKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNPNFAKG RDTGAG
Omb       : 475 TFRTYVFKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNPNFAKGLRDTGAG 517
    
```

Abbildung 24: Die Abbildung zeigt den Abgleich der Sequenz des mutierten Plasmides pBAT7071[omb431KtoR] gegen pBAT7071[WT]. Die erhaltene Mutation ist rot hervorgehoben. Die Originalsequenz findet sich im Anhang. Die Übersetzung erfolgte durch ExPASy, das Alignment mit BLASTp. Der Sequenzunterschied am Beginn der Mutantensequenz beruhen wahrscheinlich auf einer schlechten Lesbarkeit der DNA Sequenz in diesem Bereich (s. Anhang).

III-A-2.2 Mutagenese der potentiellen ATCUN Bindestelle: Omb[H454A]

Viele biologische und zellphysiologische Prozesse basieren auf der Bindung von Metallionen an Proteine, wie bereits einleitend erwähnt. Bei einem Cu(II) und Ni(II) bindenden Motiv, dem sogenannten ATCUN Motiv (Harford and Sarkar, 1995) konnte durch Strukturanalyse gezeigt werden, dass ein stets an dritter Stelle des Motivs gelegenes, konserviertes Histidin von besonderer Bedeutung für die Bindeeigenschaften ist. Ein solches Motiv wurde auch in TBX3 gefunden (Sankaramakrishnan et al., 2005). Da über dessen Funktion dort bislang nichts bekannt ist, sollten im TBX3 homologen Omb von *Drosophila melanogaster* Experimente durchgeführt werden. Dazu wurde das an Position 454 gelegene Histidin durch Punktmutation mit der Aminosäure Tyrosin ausgetauscht. Dafür wurde der Vektor pBAT7071 verwendet, der bereits omb Sequenz trägt. Nach erfolgreicher Mutation sollte das Konstrukt in pUAST umklontiert und in Fliegen injiziert werden. Die Mutagenese wurde erfolgreich durchgeführt, wie in Abbildung 25 gezeigt ist. Die Originalsequenz findet sich im Anhang. Die beiden nachfolgenden Schritte wurden auf Grund von massiven technischen Problemen bei der Injektion noch nicht durchgeführt.

A bgleich der Proteinsequenzen WT gegen Mutagenese

```

Omb[H454Y] : 183 GFVSTTILNSMYKYS-----RVSTWCEPMTSSCRTPRFARTSSKETEFI AVTAYQNEKX 236
                GFVSTTILNSM+KY          R + + S+ RT F      KETEFI AVTAYQNEK
Omb       : 443 GFVSTTILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRTYVF-----KETEFI AVTAYQNEKI 497

Omb[H454Y] : 237 TQFENRQSV CXXAFVILGAGXR 258
                TQ + +          GAG R
Omb       : 498 TQLKIDNNPF AKGLRDTGAGKR 519
    
```

Abbildung 25: Die Abbildung zeigt den Abgleich der Sequenz des mutierten Plasmides pBAT7071[omb454HtoY] gegen pBAT7071[WT]. Die erhaltene Mutation ist rot hervorgehoben. Die Originalsequenz findet sich im Anhang. Die Übersetzung erfolgte durch ExPASy, das Alignment mit BLASTp. Auf Grund der schlechten Qualität der DNA-Sequenz, war diese nur bereichsweise lesbar. Sie zeigt jedoch im relevanten Bereich die erfolgreiche Mutagenese.

III-A-2.3 Mutation in der DNA-Bindedomäne: Omb[A504V]

In einem EMS Mutagenese Screen auf Enhancer des *omb* hypomorphen Allels *bifid* wurden eine Reihe von neuen *omb* Letalallelen isoliert (Pflugfelder, unveröffentlicht). In I(1)*omb*[13] wurde von Sen (Sen, 2006) der Austausch A504V identifiziert. A504 liegt am hochkonservierten C-terminalen Ende der DNA-bindenden T-Domäne. Aus der Röntgenkristallstruktur-Analyse des homologen humanen TBX3-DNA Komplexes weiß man, dass Phenylalanine in enger Nachbarschaft zu A504 (F503 und F507) für die entscheidenden minor groove Kontakte verantwortlich sind (Coll et al., 2002)

Um den Einfluss auf die DNA-Bindefähigkeit der in I(1)*omb*13 gefundenen Mutation näher zu untersuchen, wurde eine Mutagenese durchgeführt. Dazu wurde der Vektor pBAT7071 verwendet, der bereits *omb* Sequenz trägt. Anschließend durchgeführte in vitro Transkription und Band Shift Assays sollten Aufschluss darüber geben. Die Mutagenese wurde erfolgreich ausgeführt, wie in Abbildung 26 gezeigt ist. Die Originalsequenz findet sich im Anhang. Von A. Sen wurde in *band shift* Experimenten gezeigt, dass die mutante T-Domäne nicht mehr zur spezifischen DNA-Bindung fähig ist. (Sen, 2006).

Abgleich der Proteinsequenzen WT gegen Mutagenese :	
Omb[A508V] : 73	KVTLEGKDLWEKFHKLGT <small>EMVITKSGRQMF</small> QMKFRVSGLD <small>AKAKYILL</small> LDIVAADDYRY 132
	KVTLEGKDLWEKFHKLGT <small>EMVITKSGRQMF</small> QMKFRVSGLD <small>AKAKYILL</small> LDIVAADDYRY
Omb : 329	KVTLEGKDLWEKFHKLGT <small>EMVITKSGRQMF</small> QMKFRVSGLD <small>AKAKYILL</small> LDIVAADDYRY 388
Omb[A508V] : 133	KFHNSRWMVAGKADPEMPKRM <small>YIHPDSPTTGEQ</small> WMQKVVSFHKLKL <small>TNNISDKHGFV</small> STT 192
	KFHNSRWMVAGKADPEMPKRM <small>YIHPDSPTTGEQ</small> WMQKVVSFHKLKL <small>TNNISDKHGFV</small> STT
Omb : 389	KFHNSRWMVAGKADPEMPKRM <small>YIHPDSPTTGEQ</small> WMQKVVSFHKLKL <small>TNNISDKHGFV</small> STT 448
Omb[A508V] : 193	ILNSMHKYQPRFHLV <small>RANDILKLPYSTFR</small> TYVFKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNNPFV 252
	ILNSMHKYQPRFHLV <small>RANDILKLPYSTFR</small> TYVFKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNNPF
Omb : 449	ILNSMHKYQPRFHLV <small>RANDILKLPYSTFR</small> TYVFKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNNPFA 508
Omb[A508V] : 253	KGFRDTGA 260
	KGFRDTGA
Omb : 509	KGFRDTGA 516

Abbildung 26: Die Abbildung zeigt den Abgleich der Sequenz des mutierten Plasmides pBAT7071[omb508AtoV] gegen pBAT7071[WT]. Die erhaltene Mutation ist rot hervorgehoben. Die Originalsequenz findet sich im Anhang. Die Übersetzung erfolgte durch ExpASY, das Alignment mit BLASTp.

III-B Konstruktion der Dpp-GFP Fusionskonstrukte

Das Ziel dieser Experimente war die Konstruktion dreier GFP-markierter Dpp-Varianten, im Folgenden Dpp-dup-GFP, Dpp-del-GFP und Dpp-myc-GFP genannt. Der Unterschied zwischen ihnen besteht in der Anzahl geladener Aminosäuren im N-Terminus des reifen Proteins. Im Konstrukt Dpp-dup-GFP wurde die Sequenz, die für das Cluster dieser Aminosäuren kodiert, dupliziert, in Dpp-del-GFP hingegen deletiert (Abbildung 27).

<i>D.mel.</i> expression	
DPP	MAPT-----SGGE-----GGGKGGRNKRQPRRPTRRKNHDDTC...
D-DEL	...DV-----SGGEGEQKLISEEDLGGG-----NHDDTC...
D-MYC	...DV-----SGGEGEQKLISEEDLGGGKGGRNKRQPRRPTRRKNHDDTC...
D-DUP	...DVSGKRQPRRPTRRKSGGEGEQKLISEEDLGGGKGGRNKRQPRRPTRRKNHDDTC...

Abbildung 27: Übersicht der Proteinsequenz der verschiedenen DPP-Konstrukte nach M. Roth (Roth, 2003). In blauer Farbe ist das myc-tag zu sehen. Grün markiert ist der in D-DEL eliminierte Bereich. Die rote Markierung zeigt die in D-DUP zusätzlich eingefügten geladenen Aminosäuren.

Dpp-myc-GFP ist, abgesehen von einem integrierten myc-tag unmodifiziert, da es als Kontrolle diente. Alle Ausgangskonstrukte waren auf Grund vorhergehender Experimente von Martin Roth (Roth, 2003) mit einem Myc-tag versehen und in den Vektor pcDNA3 ligiert. Der einfacheren Handhabung halber, wurde die für Dpp kodierende Sequenz in drei Fragmente unterteilt: Fragment 1a, das die Prodomäne und einen kleinen Teil des späteren Liganden beinhaltet, Fragment 1b, das das Cluster von geladenen Aminosäuren trägt und Fragment 2, das die den restlichen Liganden kodierende Sequenz umfasst. Um die GFP Sequenz an geeigneter Stelle einzufügen zu können, war die Insertion zweier neuer Restriktionsschnittstellen (SacII) zwischen den Fragmenten 1b und 2 nötig (Abbildungen. 28, 29). Diese Teilstücke wurden zunächst einzeln subkloniert und sequenziert, um ungewollte Punktmutationen durch die Amplifikation ausschließen zu können. Außerdem musste die für GFP kodierende Sequenz aus p2xEGFP ebenfalls über Linkerprimer mit den entsprechenden SacII-Schnittstellen versehen werden. Auch dieses Amplifikat wurde in pDrive subkloniert und sequenziert. Zwei Zielvektoren für die fertigen Fusionskonstrukte wurden gewählt: pUAST zur Injektion der Konstrukte in *Drosophila melanogaster* und pAc5.1/V5-HIS-A für Zellkulturexperimente. Die Klonierungsstrategie ist im folgenden Abschnitt näher erläutert.

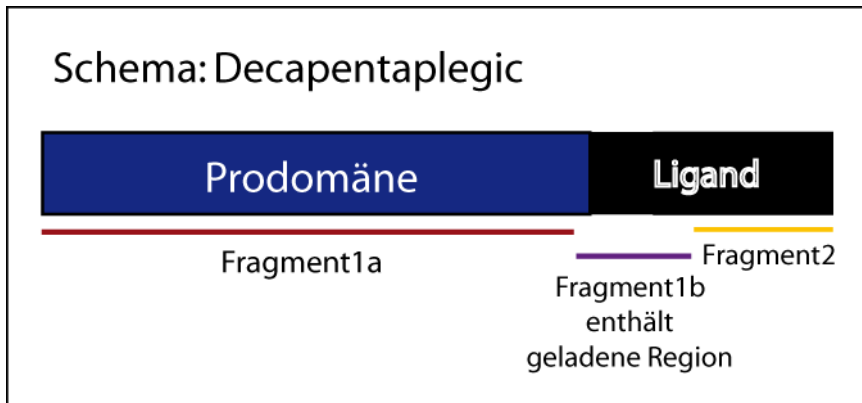


Abbildung 28: Schematische Darstellung des Proteins Decapentaplegic (Dpp). Die einzelnen PCR Fragmente, die zur Erstellung des Dpp-GFP-Fusionskonstruktes benutzt wurden sind farbig eingetragen. Fragment 1a und Fragment 2 sind bei allen drei Konstrukten gleich. Fragment 1b enthält die geladene Region, die deletiert (in Dpp-del) und dupliziert (in Dpp-dup) ist.

III-B-1Herstellen und Subklonieren der einzelnen Bestandteile

Das Konzept zur Erstellung der drei Gesamtkonstrukte sah, wie oben bereits erwähnt, eine Komposition von vier Teilstücken im Zielvektor vor. Dazu wurden Fragment 1a, das in allen Fusionsprotein-Varianten unverändert ist, per Restriktionsverdau mit den Endonukleasen EcoRI und AgeI direkt aus dem Ausgangsklon pcDNA3-Dpp-myc geschnitten. Das Fragment 1b, das die entsprechende Variation (WT-Situation, Deletion oder Duplikation des Clusters geladener Aminosäuren) trägt und in dessen Folge das GFP eingefügt werden sollte, wurde per PCR vom jeweiligen Ausgangsklon, pcDNA3 mit Dpp-myc, Dpp-dup oder Dpp-del, amplifiziert. Die Restriktionserkennungssequenz für SacII wurde dabei durch Linker-primer angefügt. Das dritte Fragment, Fragment 2 genannt, das dem C-terminalen Ende des Proteins entspricht und ebenfalls für alle Varianten gleich ist, wurde ebenfalls per linker-PCR amplifiziert. Fragment 2 erhielt so auf der 5' Seite eine Sac II und auf der 3' Seite eine Not I Schnittstelle. Die PCR Produkte wurden mit Taq DNA Polymerase amplifiziert, die Einzel-A-Überhänge generiert. So konnten sie anschließend in den Vektor pDrive, der U-Überhänge besitzt, subkloniert werden. Durch eine darauffolgende Sequenzierung wurde überprüft dass keine ungewollten Mutationen, beispielsweise durch Taq Amplifikationsfehler, eingeführt worden waren. Die für GFP kodierende Sequenz wurde aus dem Vektor p2xEGFP, ebenfalls durch Amplifikation mittels PCR, gewonnen. Auch hier fügten Linker-primer an beiden Enden der Sequenz eine SacII Erkennungssequenz an. Dieses Amplifikat wurde ebenfalls in pDrive subkloniert und sequenziert.

Eine Übersicht über diesen Teil der Klonierungsstrategie findet sich in Abbildung 29.

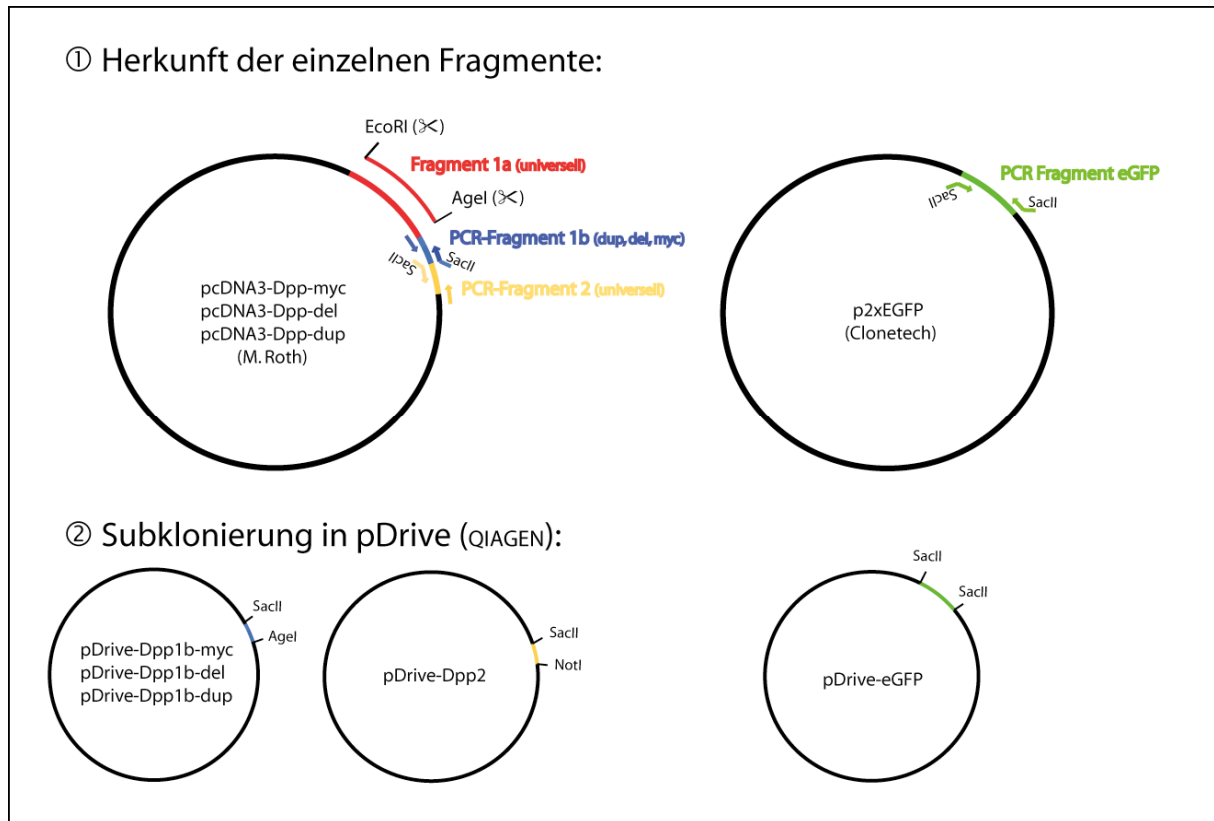


Abbildung 29: Teil 1 der Graphik gibt Aufschluss über die Herkunft der einzelnen Teilfragmente. So wurde das für alle Konstrukte identische Fragment 1a per Restriktionsverdau mit den Endonukleasen EcoRI und AgeI aus dem Konstrukt „pcDNA3 –Dpp-myc“ (M. Roth) geschnitten. Fragment 1b und Fragment 2 wurden mittels PCR amplifiziert. Der Einsatz von Linkerprimern, die SacII Erkennungssequenzen tragen, sollte letztlich die GFP-Insertion zwischen diesen Fragmenten ermöglichen. Fragment zwei, das ebenfalls in allen Zielkonstrukten identisch ist, wurde ebenfalls von „pcDNA3 –Dpp-myc“ amplifiziert. Fragment 1b, das die DPP-Variation trägt, wurde jeweils vom entsprechenden pcDNA3-Konstrukt (M. Roth) amplifiziert. Die GFP Sequenz wurde aus p2xEGFP (Clontech) amplifiziert.

Die so erhaltenen PCR Amplifikate der Fragmente 1b, 2 und GFP wurden letztlich in den A/T Klonierungsvektor pDrive (QIAGEN) zwischenkloniert. Diese Vektoren, die auch mit Hilfe der vektorinternen Primer M13forward(-20) und M13reverse sequenziert wurden, sind im zweiten Teil der Graphik aufgezeigt.

III-B-2 Mehr-Komponenten Ligation und Einfügen der GFP Sequenz

Die Fragmente Dpp1b (AgeI-SacII), Dpp2 (SacII-NotI) und GFP (SacII-SacII) wurden mit den entsprechenden Enzymen aus ihren pDrive-basierten Subklonen geschnitten; Fragment 1a (EcoRI-AgeI) wurde, wie oben bereits erwähnt, direkt aus dem pcDNA3.Dpp-myc Ausgangsklon gewonnen.

Da der Erfolg einer Ligation mit steigender Komponentenzahl unwahrscheinlicher wird und die GFP kodierende Sequenz außerdem ungerichtet über SacII ligiert werden sollte, wurde zunächst auf deren Insertion verzichtet. Die so durch Vier-Komponenten-Ligation in pAc5.1V5 HIS-A gewonnenen Konstrukte wurden dann mit SacII geöffnet und, in einer zweiten Ligationsreaktion, die für GFP kodierende Sequenz eingefügt. Durch Sequenzierung mit einem GFP internen und einem externen Primer über die Insertionsstelle wurde die korrekte Orientierung der Sequenz im Konstrukt bestimmt. Eine analoge Durchführung für pUAST wurde wegen dessen Größe nicht in Betracht gezogen. Stattdessen war eine Umklonierung über EcoRI und NotI vorgesehen, die im nächsten Abschnitt beschrieben ist. Abbildung 30 zeigt eine Übersicht der oben beschriebenen Schritte.

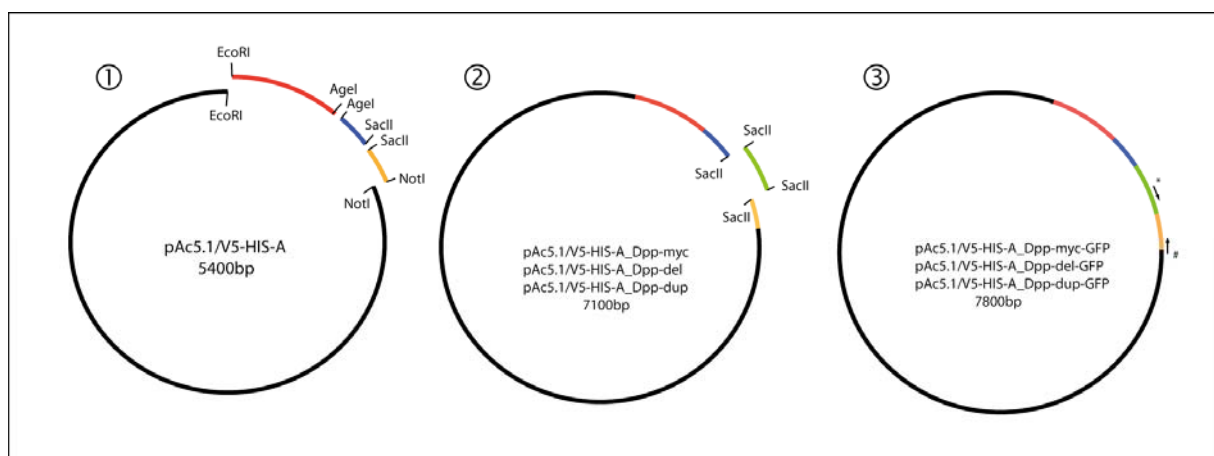


Abbildung 30: Vier-Komponenten-Ligation und GFP Insertion. Im ersten Schritt wurden die Fragmente 1a, 1b und 2 über EcoRI und NotI in den Vektor pAc5.1/V5-HIS-A einligiert. Nach einem Restriktionsverdau des Zwischenkonstruktes an der neu eingefügten und einzigartigen SacII Schnittstelle zwischen Fragment 1b und 2 kann das GFP Fragment durch ungerichtete Ligation eingefügt werden (Bild2). Bild 3 zeigt das fertige DPP-GFP-Fusionskonstrukt in pAc5.1/V5-HIS-A. Mit Hilfe der beiden als Pfeile eingezeichneten Primer war eine Überprüfung der Einbaurichtung durch PCR möglich.

III-B-3 Herstellen der Endkonstrukte

Die Ansequenzierung des fertigen Zellkulturkonstruktes an beiden Insertionsenden zeigte am Ende des Fragmentes 2 überraschenderweise eine Dpp-NotI-EcoRI-NotI Schnittstellenkonfiguration anstelle der erwarteten alleinigen NotI Sequenz. Bei der Exzision des Fragmentes aus seinem Subklon war wohl der NotI-Schnitt nicht in der dem Dpp-Fragment per Linker angehängten Schnittstelle geschehen, sondern nur in der kurz darauffolgenden pDrive-eigenen. Dadurch wurde eine ebenfalls pDrive-eigene EcoRI Schnittstelle, die dort das inserierte PCR-Produkt flankiert, mit ausgeschnitten und in pAc5.1 übertragen. An dem anderen Ende (Fragment 1a) wurde ebenfalls eine unerwartete Schnittstellenkonfiguration vorgefunden (EcoRI-NotI-Dpp). Fragment 1a wurde, wie oben geschildert per EcoRI Verdau aus dem Vektor pcDNA3-dpp-myc gewonnen und nicht zuvor sequenziert. Diese Abfolge der beiden zur gerichteten Umklonierung des Fusionskonstruktes in pUAST vorgesehenen Restriktionsschnittstellen machte die geplante Strategie unmöglich. Die einzig verbleibende Möglichkeit war somit ein Ausschneiden des Konstrukts mit EcoRI und dessen ungerichtete Klonierung in pUAST. Die bereits die drei verschiedenen Dpp-GFP Fusionskonstrukte tragende pAc5.1 Derivate wurden daher mit EcoRI verdaut, und ihrer Größe nach durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Schließlich wurden die gewünschten Fragmente aus dem Gel isoliert.

Der Injektionsvektor pUAST wurde ebenfalls mit EcoRI geöffnet und mit den verschiedenen Dpp-GFP-Fusionskonstrukt-Sequenzen ligiert. Die Orientierung der Insertion wurde über PCR mit den Primern 366 und 613, einem neben der MCS von pUAST liegenden Primer und dem SacII Linkerprimer, der auch zur Konstruktion des Fragmentes2 benutzt wurde, bestimmt. Nur die gewünschte Insertionsrichtung führt zu einem PCR Produkt, da im anderen Fall der Konstrukt-interne Primer nicht dem Vektor-eigenen Primer zugewandt ist. Vor der Injektion wurden die Konstrukte außerdem sequenziert. Die graphische Darstellung dieser Schritte findet sich in Abbildung 31. Eine detailliertere Gesamtübersicht der Konstruktionsstrategie findet sich im Anhang.

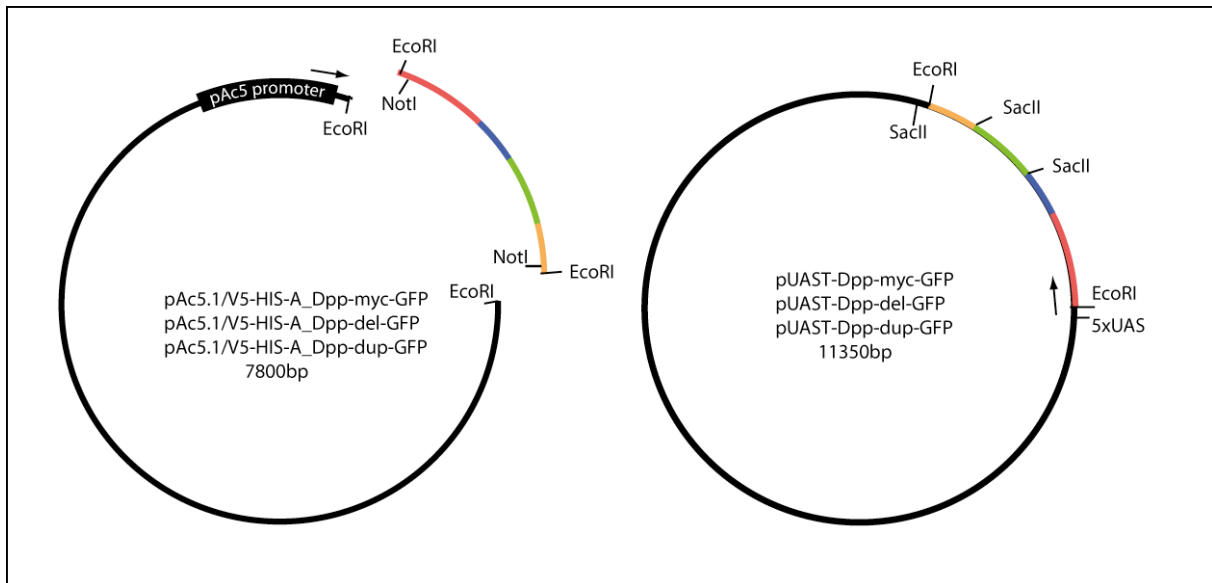


Abbildung 31: Übersicht über das Erstellen des pUAST Endkonstruktes. Das DPP-GFP-Fusionskonstrukt wurde mit EcoRI wieder aus dem Vektor pAc5.1/V5-HIS-A geschnitten und in den ebenfalls mit EcoRI geöffneten P-Element Vektor pUAST ligiert. Eine zuerst vorgesehene gerichtete EcoRI-NotI basierte Umklonierung konnte aufgrund der überraschenden Restriktionsschnittstellenkonfiguration nicht erfolgen. Die Einbaurichtung wurde durch PCR mit einem Fragment-externen und einem –internen Primer und Sequenzierung mit pUAST eigenen, die MCS flankierenden Primern überprüft. Der Pfeil zeigt jeweils in die korrekte Ableserichtung der Sequenz im Zielvektor.

III-C Polyalanin- und Polyglutaminexpansionen in Org-1

Wie schon einleitend erwähnt, war das Ziel dieses Projektes die Erstellung von Org-1 Varianten, die verschieden große Homopolymertrakte der Aminosäuren Glutamin und Alanin in den entsprechenden Bereichen der C-Domäne tragen. Etwa zehn verschiedene Glutaminhomopolymer- und sechs verschieden große Alaninhomopolymerkonstrukte, sowie Deletionskonstrukte beider Bereiche sollten generiert werden. Mit Hilfe dieser Konstrukte in Zellkulturversuchen und transgenen Fliegen sollen künftig neue Erkenntnisse über die regulatorische Funktion von Glutaminhomopolymeren und Alaninhomopolymeren gewonnen werden. Dies könnte auch Aufschluss geben über die Mechanismen der mit polyQ und polyA Expansionen verbundenen und bereits in der Einleitung erwähnten menschlichen Krankheiten.

Im Folgenden ist die gewählte Klonierungsstrategie ausführlich beschrieben. Das Projekt wurde im späteren Verlauf in einer Diplomarbeit (Gadomski, 2007) weitergeführt.

III-C-1 Erstellen eines für alle geplanten Konstrukte geeigneten Basisvektors

Da es aufgrund der Restriktionsschnittstellenkonfiguration der beiden Zielvektoren pAc5.1/V5-His-A (Invitrogen, für Zellkulturversuche), und pUAST (Brand et al., 1993), zur Injektion in *Drosophila melanogaster*, nicht möglich war, die benötigten Module direkt in diesen Vektoren zusammensetzen, wurde dazu ein geeigneter Zwischenvektor generiert.

Der Polylinker des etwa drei Kilobasen großen Standardvektors pBluescript KS⁻ wurde dazu modifiziert, indem er mit KpnI und XbaI geöffnet und, nach Dephosphorylierung mit Shrimp Alkaliner Phosphatase (SAP), durch Ligation mit einem 158bp großen Oligomerkonstrukt ersetzt wurde (Abbildung 33). Dessen Herstellung ist im nächsten Abschnitt näher erläutert. Dieses Oligomer trug neben den für den künftigen Einbau der modifizierten *org1* Fragmente nötigen Schnittstellen NheI und MluI, ein 3xFLAG tag zur späteren Visualisierung des Proteins mit Antikörper gefolgt von den letzten 13 Aminosäuren des Org1 C-Terminus, sowie ein Stoppcodon (Abbildung 32). Es wurde darauf geachtet, dass das offene Leseraster (ORF) des Endkonstruktes durch diese Modifikationen nicht verschoben wurde.

In diesem Vektor, nach dem neuen Insert pSK[KNM3xFLAGC13stopX] genannt (K = KpnI, N = NheI, M = MluI, X = XbaI), sollten, nach ihrer Modifikation, die einzelnen Fragmente des Org-1 C-Terminus zusammengesetzt werden, so dass nur noch der Transfer der fertigen

Varianten in die Zielvektoren pUAST und pAc5.1/V5-His A erfolgen musste. Nach der Transformation in *E. coli* DH5 α chemokompetenten Zellen konnten die Plasmide nach der Minipräparation durch Verdau mit NheI, einem Enzym, das nur im Konstrukt schneidet, analysiert werden. Ein positiver Klon von pSK[KNM3xFLAGC13stopX] wurde selektiert, kultiviert (Midi) und weiter verwendet.



Abbildung 32: Struktur des Oligomerkonstruktes zur Modifikation des pBluescript SK- Polylinkers. In grün sind die neuen Restriktionsschnittstellen markiert, die durch Spacer (schwarz) voneinander getrennt sind. In rot ist dann die Sequenz des 3xFLAG tags zu sehen. Der daran anschließende Org1 C-Terminus ist blau dargestellt, das Stoppcodon unterstrichen. Am Beginn und am Ende des Oligomers befinden sich ebenfalls Basenüberhänge, die eine erfolgreiche Restriktion am Rande ermöglichen.

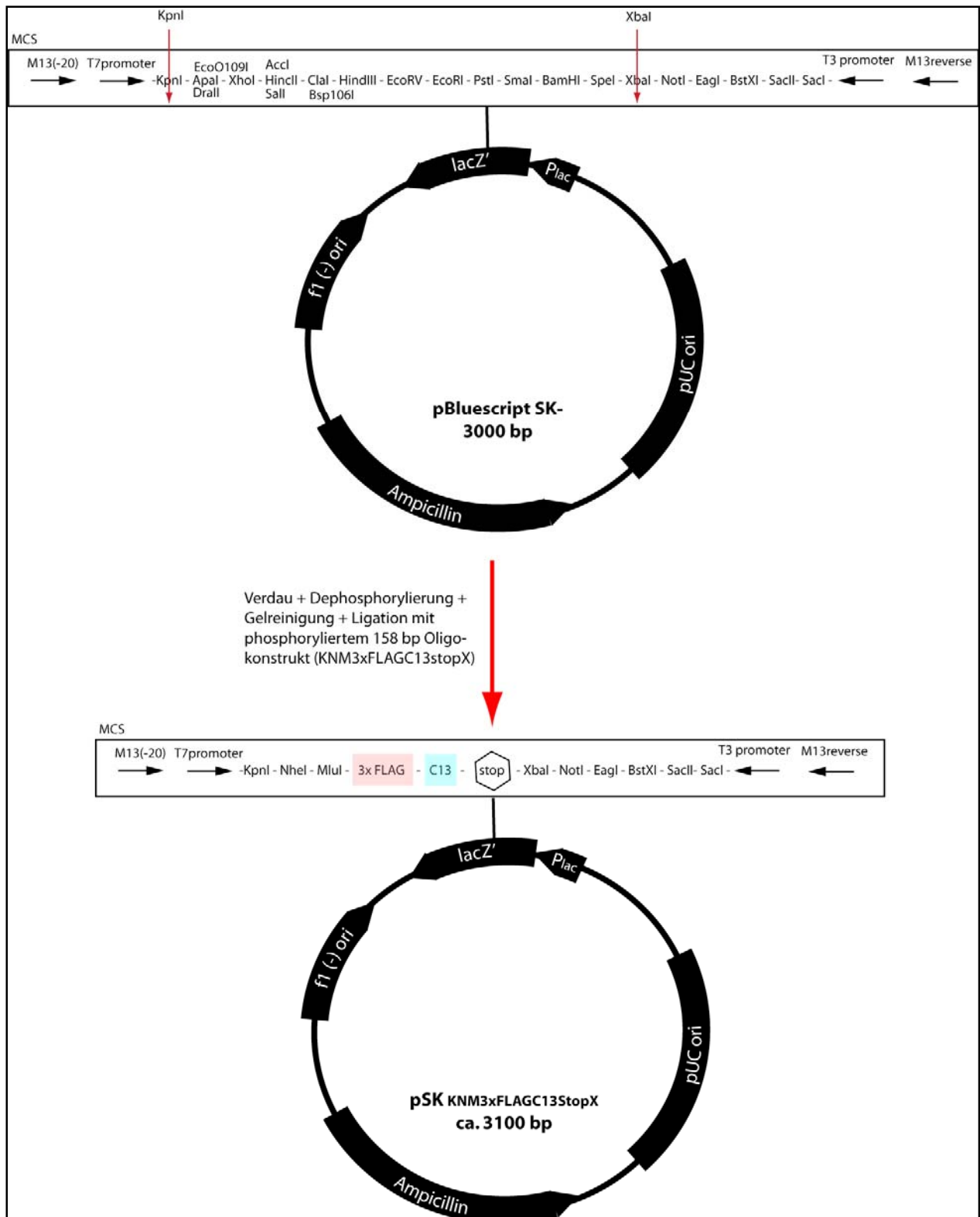


Abbildung 33: Detailliertes Schema zur Konstruktion von pSK[KNM3xFLAGC13stopX] aus pBluescript SK und einem 158 bp Oligomerkonstrukt.

III-C-2 Herstellen des 158bp Oligomerkonstruktes zur Insertion in pBluescript SK⁻

Das mit 158 Basenpaaren relativ große Oligomer wurde nicht in einem Stück hergestellt, sondern durch Annealing von vier kürzeren Einzelsträngen mit anschließender PCR. Zunächst wurden jeweils zwei teilweise komplementäre Oligomere zu zwei Teildoppelsträngen mit langen Überhängen zusammengelagert (Annealing), die dann mit Hilfe von Klenow-Enzym mit dNTPs zum vollständigen Doppelstrang aufgefüllt wurden. Da die Produkte dieser Reaktion an einem Ende über eine Strecke von 18 Basen komplementär zueinander sind, konnten sie sich nach erneutem Erhitzen und langsamen Abkühlen neben dem eigenen Partnerstrang auch mit dem des zweiten Oligomers zusammenlagern. Nach einem weiteren Auffüllen des neuen Teildoppelstranges durch Klenow-Fragment entstand das 158bp lange Oligomer. Da auf Grund der Konkurrenzreaktionen beim zweiten Annealing, nämlich der Wiederherstellung der beiden unabhängigen Ausgangsstränge, die Ausbeuteerwartung für das 158bp Konstrukt gering war, wurde das gewünschte Fragment durch eine PCR-Reaktion des Produktgemisches anhand der beiden endständigen Oligos 724 (1-49) und 727 (111-158) amplifiziert (Abbildung 34). Für diese abschließende Reaktion wurde Pfu-DNA-Polymerase benutzt, um Sequenzfehler des Produktes und damit verbundene zusätzliche Mutationen im Org1 Endprodukt zu verhindern.

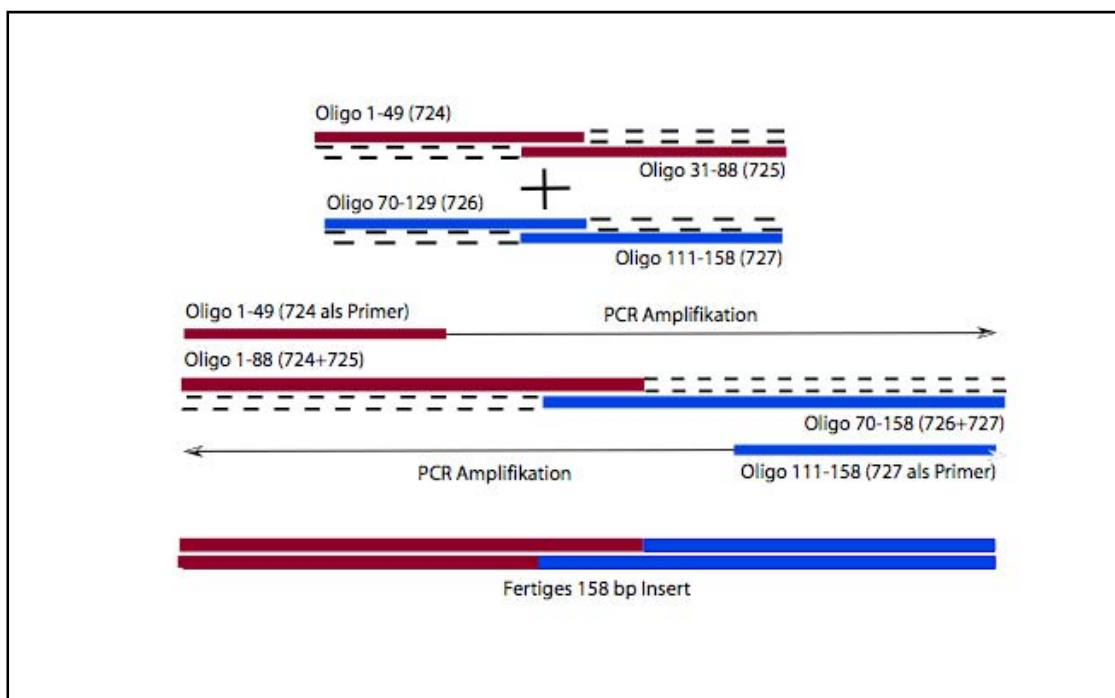


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Konstruktion des pBluescript SK⁻ Polylinker- inserts aus vier kürzeren Einzelsträngen. Gestrichelte Linien stellen die Aktivität des Klenow Enzymes dar. Die Pfeile stehen für die abschließende PCR-Reaktion.

III-C-3 Vorbereitung des Org1 C-terminalen glutaminreichen Traktes zum Austausch

Org-1 enthält sowohl einen alaninreichen, wie auch einen glutaminreichen Trakt in seinem C-Terminus (Abbildung in Einleitung). Beide sollten sowohl deletiert als auch durch die entsprechenden Homopolymertrakte unterschiedlicher Länge ersetzt werden.

Um den Austausch des Org-1-eigenen Polyglutamintraktes vornehmen zu können, wurde eine zusätzliche einzigartige Restriktionsschnittstelle (für NheI) an der betreffenden Stelle in die Org-1 Sequenz eingefügt.

Dazu wurde der C-Terminus in zwei Fragmenten per mutagener PCR mit den Oligopaaren 731/744 und 732/743 amplifiziert, wobei jeweils durch Punktmutation der Primersequenz an der entsprechenden Stelle die ursprüngliche Sequenz „gcacag“ in „gctagc“, die NheI Erkennungssequenz, umgewandelt wurde (Abbildung 35). Diese Modifikation führte zwar zu einem Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Serin, aber nicht zu einer Verschiebung des Leserasters.

Danach wurde der Vektor pSK[ORG1C] (M. Porsch), der den Org-1 C-Terminus bereits beinhaltet, mit den Enzymen KpnI und NdeI geöffnet, was zum Verlust der Originalsequenz führte. Anschließend konnten in einer 3-Komponentenligation die gereinigten und mit KpnI/NheI bzw. NheI/NdeI doppelt verdauten mutagenen PCR Fragmente mit dem geöffneten pSK[ORG1C] ligiert werden (Abbildung 36). Der Erfolg wurde nach Transformation und Plasmidpräparation per NheI Verdau, der nur die mutante Sequenz schneidet, überprüft. Die Fehlerlosigkeit der Sequenz nach der Amplifikation wurde außerdem durch Sequenzierung bestätigt. Der neue Vektor wurde pSK[ORG1C-KNheN] benannt.

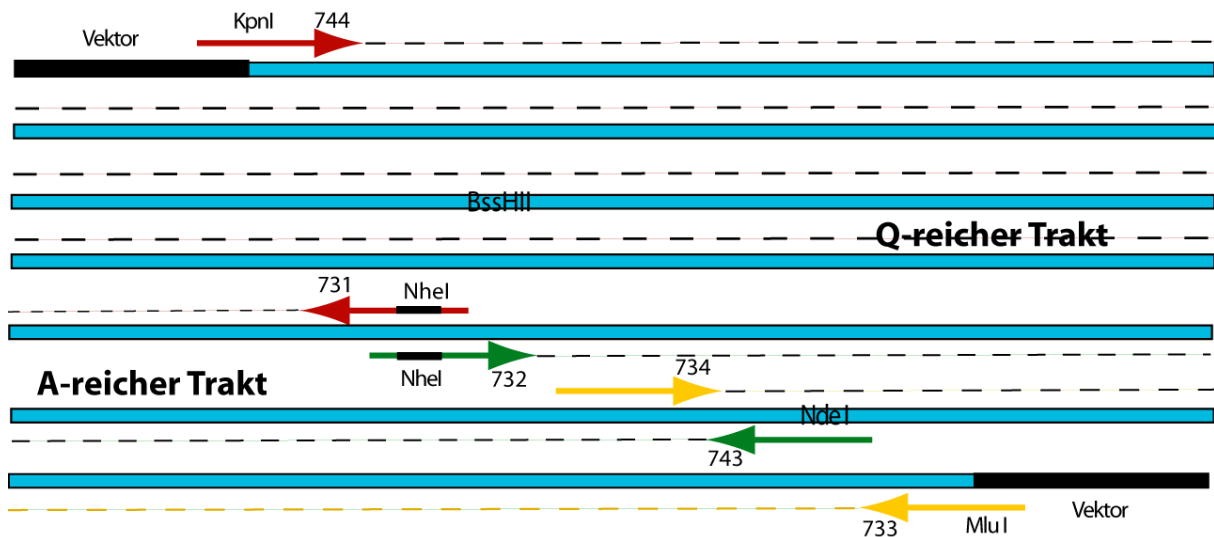


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Strategie zum "in frame" Einfügen der neuen Restriktionsschnittstelle NheI im Org1 C-Terminus. Der blaue Balken stellt die Org1 Sequenz dar (genaue Sequenz im Anhang), der schwarze die Vektorenden. Es werden zwei PCR Produkte amplifiziert (rote und grüne gestrichelte Linie), die jeweils an einem Ende die Originalsequenz zur NheI Sequenz mutieren. Über KpnI, NheI und NdeI ist schließlich die 3-Komponenten Ligation möglich. Des Weiteren ist in gelb die PCR, mit deren Amplifikat das Anhängen der MluI Site an das Ende des Org1 C-Terminus möglich ist (siehe nächster Schritt), dargestellt.

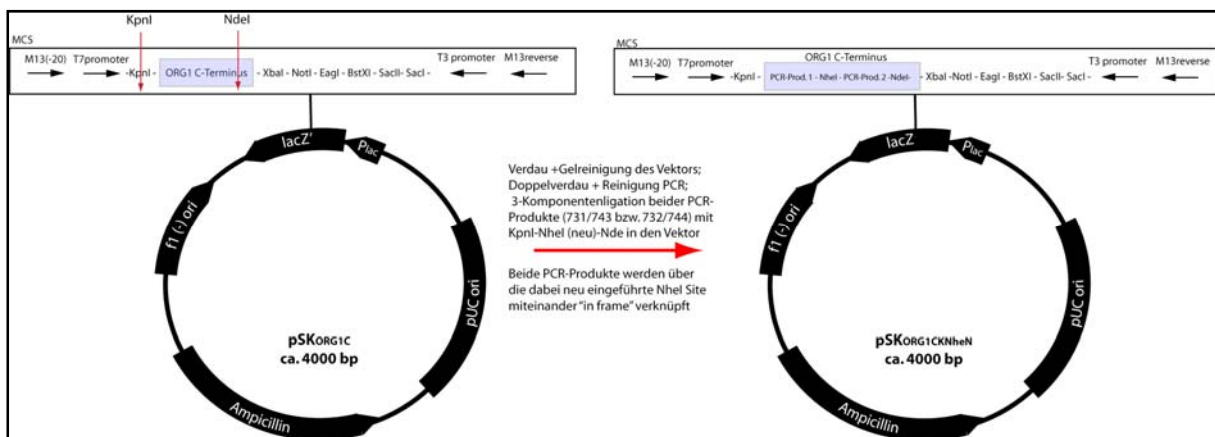


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Strategie zum Austausch der Org1-C-terminalen Originalsequenz gegen die mit der NheI Schnittstelle modifizierte Version im Originalvektor pSK[ORG1C] (M. Porsch). Der Name des neuen Vektors ist pSK[ORG1CKNheN].

III-C-4 Einführen einer MluI Schnittstelle in den C-Terminus zur späteren Manipulation des Alanin-reichen Traktes

Um gezielt den Alanin-reichen Bereich im C-Terminus von Org-1 deletieren bzw. ersetzen zu können, wurde am Ende der dafür kodierenden Sequenz eine MluI Schnittstelle eingebaut. Dazu wurde ebenfalls durch PCR mit Oligopaar 733/734 ein Produkt generiert, das auf der einen Seite über eine Org-1-interne NdeI Site verläuft und an das auf der anderen Seite per Linker die gewünschte MluI Schnittstelle angehängt wurde (Abbildung 36). Dieses PCR Produkt wurde zunächst in pDrive subkloniert, um große Mengen, eines durch Sequenzierung bestätigten, fehlerfreien Amplifikates zu erhalten. Dazu wurde das mit Pfu-DNA-Polymerase hergestellte PCR-Produkt durch Inkubation mit Taq-Polymerase unter Anwesenheit von dATP mit A-Überhängen versehen (A-Tailing), so dass das Amplifikat direkt an den U-Überhang des linearen PCR-Cloning Vektors pDrive ligiert werden konnte (Abbildung 37). Der Erfolg konnte per NdeI Verdau, der die pDrive Sequenz nicht schneidet, überprüft werden. Die anschließende Sequenzierung zeigte keine Sequenzfehler.

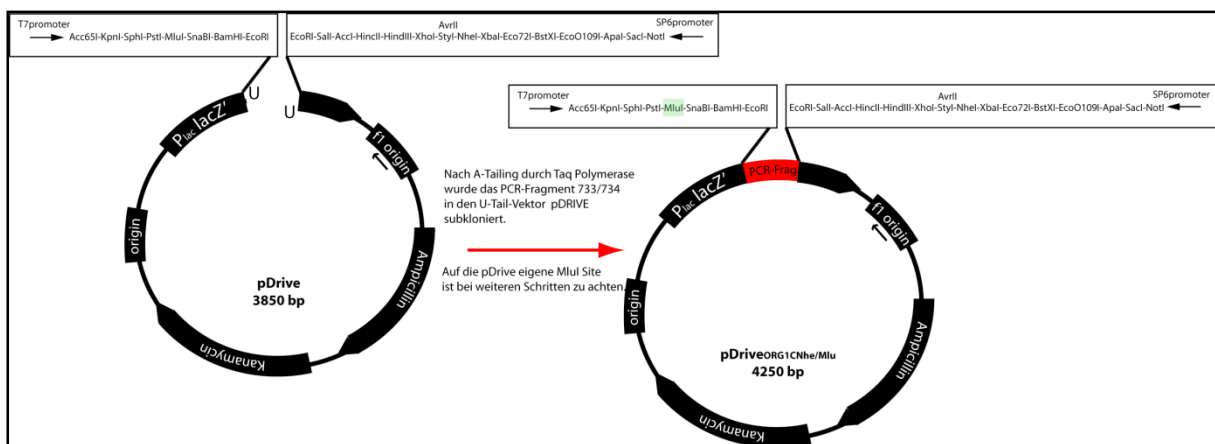


Abbildung 37: A/T Subklonieren des Org1-Nde-Mlu-C-Terminus Fragmentes in pDrive. Der Name des neuen Vektors ist pDrive[ORG1CNhe/Mlu]. Die pDrive eigene MluI Schnittstelle, ist grün hinterlegt.

Das NdeI-MluI-Fragment wurde nun per Doppelverdau mit beiden Enzymen ausgeschnitten und im folgenden Schritt zusammen mit dem durch NheI modifizierten Fragment des C-Terminus aus pSK[ORG1CKNheN] in einer 3-Komponentenligation über KpnI-NdeI-MluI in den Vektor pSK[KNM3xFLAGC13stopX] kloniert (Abbildung 38). Daraus entstand pSK[ORG1CKNheM3xFLAGC13stopX].

Da pDrive eine eigene MluI Site im Polylinker besitzt und das Produkt per Tailing in seiner Orientierung ungerichtet subkloniert wurde, erfolgte nach dem Herausschneiden mit NheI und MluI aus dem Subklon ein weitere Verdau mit EcoRI, der das Einbringen von pDrive-eigener Sequenz ins Endprodukt verhinderte.

Die 3-Komponentenligation war erfolgreich, was durch Verdau mit BssHII, das nur in der Sequenz des Org-1 C-Terminus schneidet, nachgewiesen werden konnte.

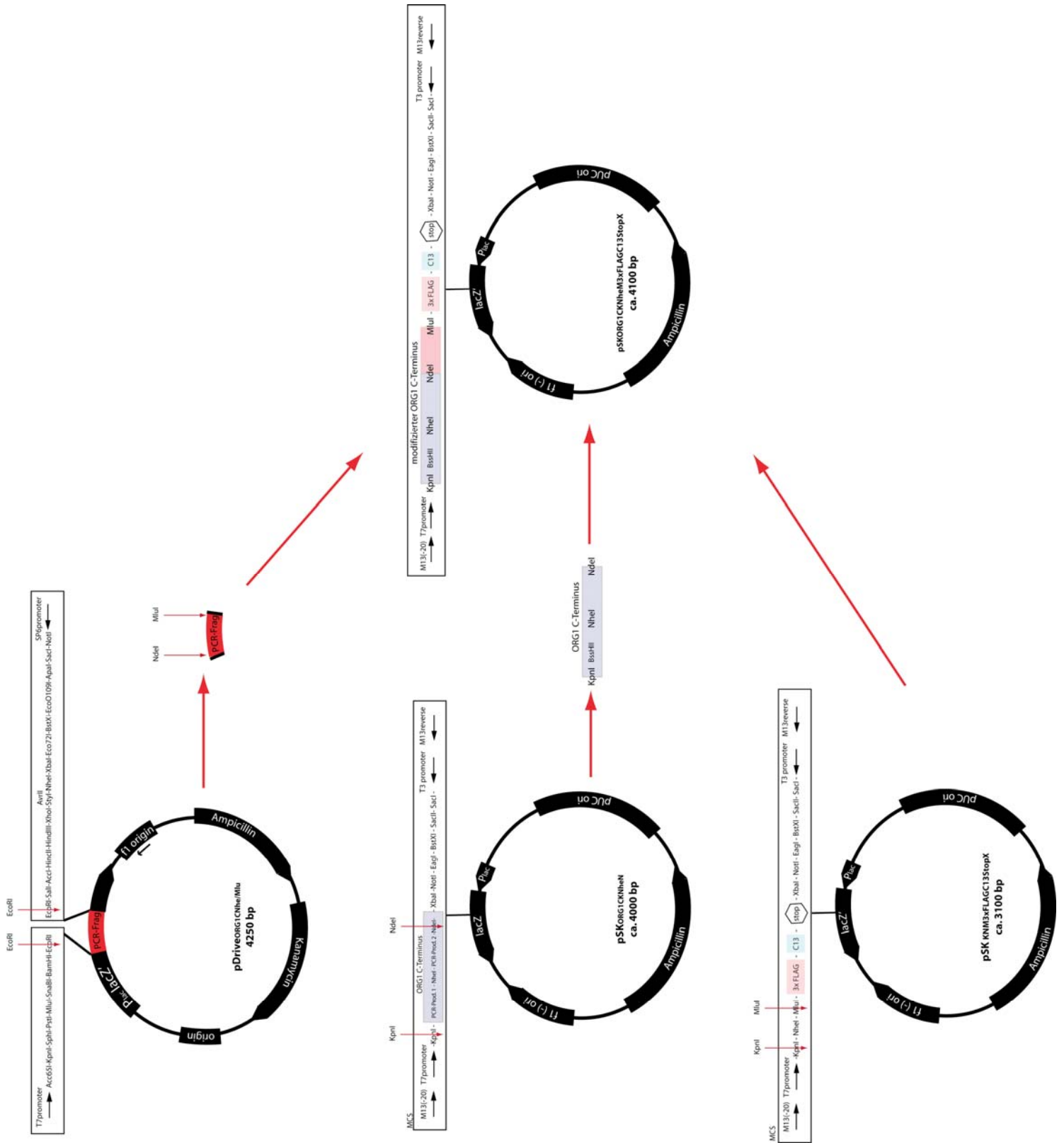


Abbildung 38 Zusammenbau des modifizierten ORG1 C-Terminus in pSK[KNM3xFLAGC13stopX]. Der neue Vektor heißt pSK[ORG1CKNmEM3xFLAGC13stopX]

III-C-5 Deletieren der ORG1- eigenen glutaminreichen Region

Um, wie geplant, die Glutaminhomopolymere in den Org1 C-Terminus einfügen zu können, musste erst die heteropolymere, Org1-eigene Sequenz, entfernt werden. Dazu wurde das vorher hergestellte Konstrukt pSK[ORG1CKNheM3xFLAGC13stopX] verwendet.

Nach dem Doppelverdau mit NheI und BssHII, der den ursprünglichen heteromeren glutaminreichen Trakt entfernte, wurde ein doppelsträngiges Oligomer durch Annealing der Einzelstränge 728 und 729, eingesetzt, das eine BstEII Erkennungssequenz einfügte (Abbildungen 39, 40), ohne zu Leserasterverschiebung zu führen. Über diese wiederum sollten letztlich die für Homoglutaminpolymertrakte verschiedener Länge kodierenden Sequenzen eingefügt werden.

Der Vektor pSK[ORG1CΔNhe/Mlu→BstEII3xFLAGC13stopX] für die Polyglutamininsertion konnte erfolgreich erstellt werden, wengleich er auf Grund eines später notwendig gewordenen Strategiewechsels nicht mehr zum Einsatz kam.



Abbildung 39: Dieses Oligo, das aus den Einzelsträngen 728 und 729 erstellt wurde besitzt Enden, die zu BssHII (rot) und NheI (blau) kompatibel sind. In grün ist die BstEII Schnittstelle markiert, die die spätere Einklonierung der Glutaminhomopolymer kodierenden Oligonukleotide ermöglicht.

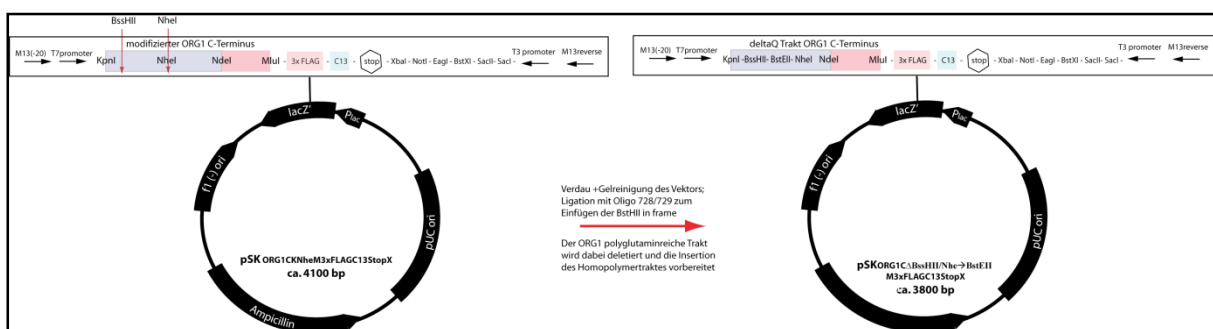


Abbildung 40: Herstellung des Vektors pSK[ORG1CΔBssHII/NheI→BstEII M3xFLAGC13stopX] In diesem Vektor wurde die glutaminreiche Org1 Region zwischen der sequenzeigenen BssHII und der artifizellen NheI Schnittstelle deletiert und durch ein Oligo (728/729) mit BstEII Erkennungssequenz ersetzt.

III-C-6 Deletieren der ORG1-eigenen alaninreichen Region

Ähnlich, wie für die glutaminreiche Region beschrieben, war für den Austausch des Org-1-eigenen heteromeren Alanin-reichen Traktes gegen einen homomeren die Deletion der Originalsequenz und das Einfügen eines Oligos mit geeigneter Schnittstelle nötig. Hierzu wurde pSK[ORG1CKNheM3xFLAGC13stopX] mit NheI und MluI geöffnet, was die dazwischenliegende, Org-1 eigene, Alanin-reiche Sequenz entfernte. Ein Oligomer wurde nach dem Annealing der beiden Einzelstränge 767 und 768 eingefügt, das eine DraIII Schnittstelle zwischen NheI und MluI trägt (Abbildungen 41, 42). Über diese DraIII Schnittstelle sollten später die Alaninhomopolymere eingefügt werden.



Abbildung 41: Dieses Oligo, das aus den Einzelsträngen 767 und 768 erstellt wurde, besitzt Enden, die zu NheI (rot) und MluI (blau) kompatibel sind. In grün ist die DraIII Schnittstelle markiert, die die spätere Einklonierung der Alaninhomopolymere ermöglicht.

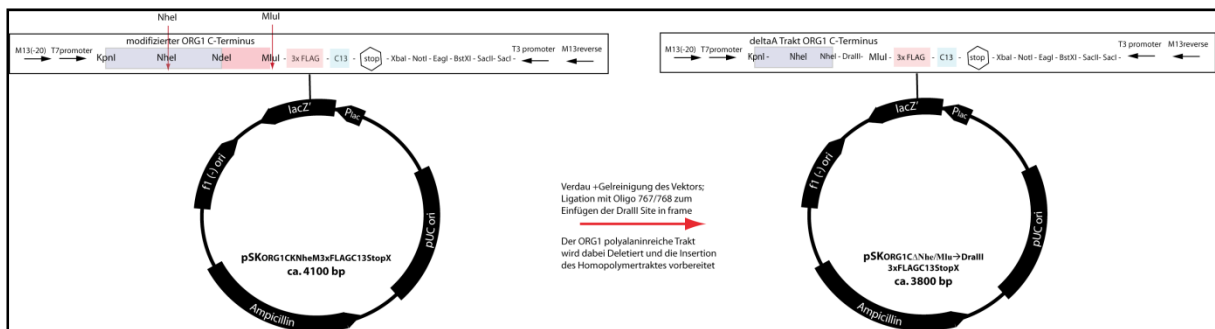


Abbildung 42: Herstellung des Vektors pSK[ORG1ΔNhe/Mlu→DraIII3xFLAGC13stopX] aus pSK[ORG1CKNheM3xFLAGC13stopX] durch Deletion der Alaninreichen Region und Insertion eines DraIII-Oligos (767/768).

III-C-7 Herstellen eines Zwischenvektors zur Subklonierung der für Glutaminhomopolymere kodierenden Oligomere

Die verschieden langen, für Glutaminhomopolymere kodierenden Oligos, die letztlich den Org-1-eigenen Glutamin-reichen Bereich im C-Terminus ersetzen sollten, wurden über Selbstpolymerisation eines einzigen kurzen Basisoligomers erzeugt, wie im nächsten Abschnitt ausführlich beschrieben wird. Das so erhaltene Gemisch verschiedener Polymere musste deswegen zunächst in einen Zwischenvektor subkloniert werden. Die Charakterisierung der aus diesem Experiment hervorgegangenen Klone sollte zu Plasmiden mit Polymeren verschiedener Länge führen.

Die für Glutaminhomopolymere kodierenden Oligonukleotide sollten über ihre kohäsiven Enden in eine DralIII Schnittstelle ligiert werden. DralIII bietet, neben der Asymmetrie, die für gerichtetes Klonieren in eine einzige Schnittstelle nötig ist, den Vorteil, dass die mittleren drei Basen der Erkennungssequenz degeneriert sind. Es konnte also ein beliebiges, Glutamin-kodierendes Triplet als Überhang gewählt werden.

Als Grundgerüst für den Polyglutaminakzeptorvektor wurde der Vektor pAC5.1/V5-His-A gewählt und per Doppelverdau mit KpnI und MluI geöffnet. Ein Oligomer, das durch Annealing der Einzelstränge 788 und 789 gewonnen wurde, wurde dazwischen eingebaut. Dieses trägt eine den Enden der Homopolymere entsprechende DralIII Sequenz, die außerdem so gewählt wurde, dass zwei BstEII Schnittstellen die DralIII Schnittstelle flankieren. Dies sollte die Umklonierung der selektierten Polymere, nach der Charakterisierung aus dem Subklon in den Zielvektor, mit Hilfe von BstEII möglich machen (Abbildungen 43, 44). Nach der Transformation wurde der Insertionserfolg durch Restriktionsverdau mit DralIII überprüft. Das Enzym schneidet den Originalvektor ohne Insertion nicht.

Zuvor waren bereits andere Strategien versucht worden, die sich im Verlauf als nicht praktikabel erwiesen. Der Vollständigkeit halber werden diese im Anhang in historischer Reihenfolge dargestellt.

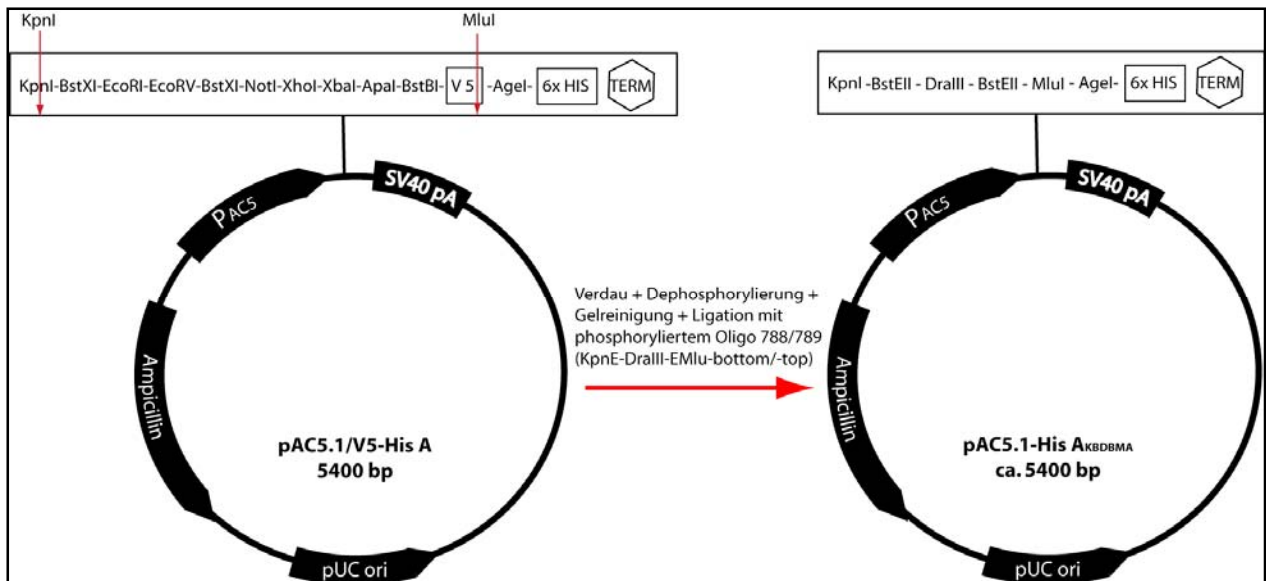


Abbildung 43: Herstellen des neuen Polyglutamin Zwischenvektors (geplant) aus pAc5.1/V5-HIS-A durch Einklonieren eines Oligomers (788/789) zwischen KpnI und MluI (pAc5.1/V5-HIS-A[KBDBM])



Abbildung 44: Sequenz des Oligos zur Insertion von Polyglutaminhomopolymeren. In rot ist die KpnI Sequenz, in blau die beiden BstEII Sequenzen, die die DraIII Schnittstelle (grün) umgeben. Die überschneidenden Basen sind gelb gekennzeichnet. In violett folgt die abschließende MluI Sequenz.

III-C-8a Herstellen eines Zwischenvektors zur Subklonierung der für Homopolyalanin kodierenden Oligomere

Für die Subklonierung der für Homopolyalanin kodierenden Oligos war pAc5.1/V5-His-A[ENKBNDMX] als Basisvektor vorgesehen, der ebenfalls durch Einbau eines doppelsträngigen Oligomers, das aus den Einzelsträngen 785 und 786 bestand, in den Polylinker zwischen NheI und MluI modifiziert wurde (in Abbildung 52 im nächsten Abschnitt beschrieben). Nach dem Annealing und der Phosphorylierung der Oligos durch T4 PNK, konnte das Fragment direkt in den durch NheI und MluI Doppelverdau geöffneten, dephosphorylierten Vektor pAc5.1/V5-HIS-A[ENKBNDMX] ligiert werden. Der neue Vektor wurde pAc5.1/V5-HIS-A[ENKBNDMX2] genannt.

Eine Überprüfung der Insertion dieses Fragmentes durch Restriktionsverdau war nicht möglich, da das Restriktionsmuster nicht verändert wurde, sondern lediglich drei Basen in der degenerierten DraIII Erkennungssequenz modifiziert wurden. Der neue Vektor

pAC5.1/V5-HisA[ENKBNDMX2] wurde durch Sequenzierung überprüft. Nach Linearisierung mit DralIII wurde das Homopolymergemisch einligiert (Abbildung 46). Die Asymmetrie der zur Klonierung gewählten Restriktionssequenz DralIII erzwingt eine gerichtete Ligation. Dadurch wurde verhindert, dass das Polymerfragment invertiert eingebaut wird und nach der Translation die falsche Aminosäuresequenz entsteht.

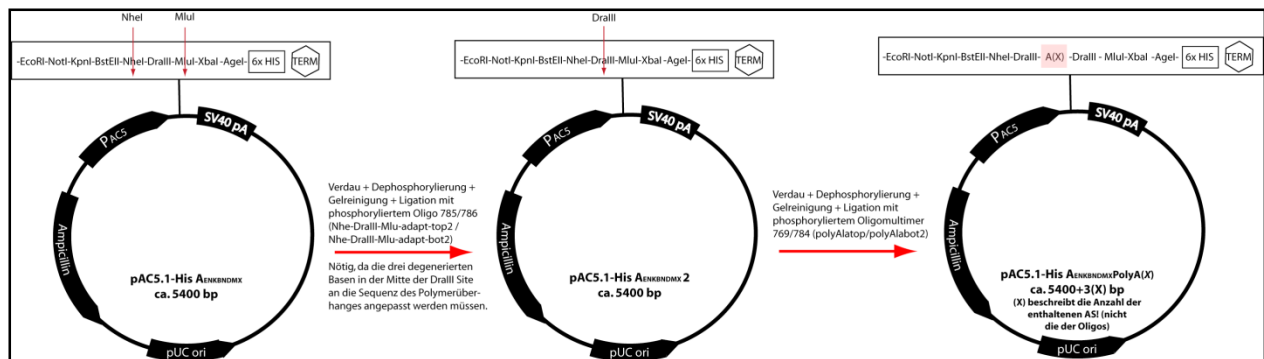


Abbildung 45: Schematische Übersicht über die komplette Strategie zur Subklonierung der Homopolyalanin kodierenden Oligomere.

III-C-8b Herstellen eines pAc5.1/V5-His-A Derivats zur Subklonierung der Homoalaninpolymere

Auch bei diesem Teil des Experiments, war vor der technisch bedingten Änderung der Klonierungsstrategie ein Konstrukt hergestellt worden (pAc5.1/V5-HIS-A[ENKBNDMX]), das aber durch oben beschriebene Modifikation weiterverwendet werden konnte.

Dazu war ein Oligomer, bestehend aus den Einzelsträngen 763 und 764 in pAc5.1/V5-HIS-A eingebaut worden. Neben der DralIII Schnittstelle für den späteren Einbau der Alaninpolymere trug dieses Oligomer noch alle weiteren Schnittstellen, die für die Konstruktion der vollständigen Org-1-Derivate nötig sind, da pAc5.1/V5-HIS-A, neben pUAST, letztlich auch einer der Zellkultur-Zielvektor ist. Zum Einbau wurde pAc5.1/V5-HIS-A mit KpnI und MluI per Doppelverdau geöffnet und dephosphoryliert. Das vorher aus den Einzelsträngen 763 und 764 durch Annealing hergestellte und phosphorylierte Oligomer wurde dann einligiert. Eine Selektion der Klone war nach der Transformation durch Verdau mit DralIII erfolgt. Da DralIII eine in der Mitte über drei Basen degenerierte Erkennungssequenz besitzt, waren die nach der Strategieänderung ebenfalls mit neuen Oligomeren erzeugten Alaninpolymerüberhänge (siehe nächsten Abschnitt) nicht mehr kompatibel zur DralIII Sequenz dieses Vektors. Der hier erhaltene Vektor pAC5.1/V5-

HisA[ENKBNDMX] diene dann aber als Basisvektor für die in 8.1 beschriebene und in Abbildung 45 gezeigte Herstellung von pAc5.1/V5-HIS-A[ENKBNDMX2].

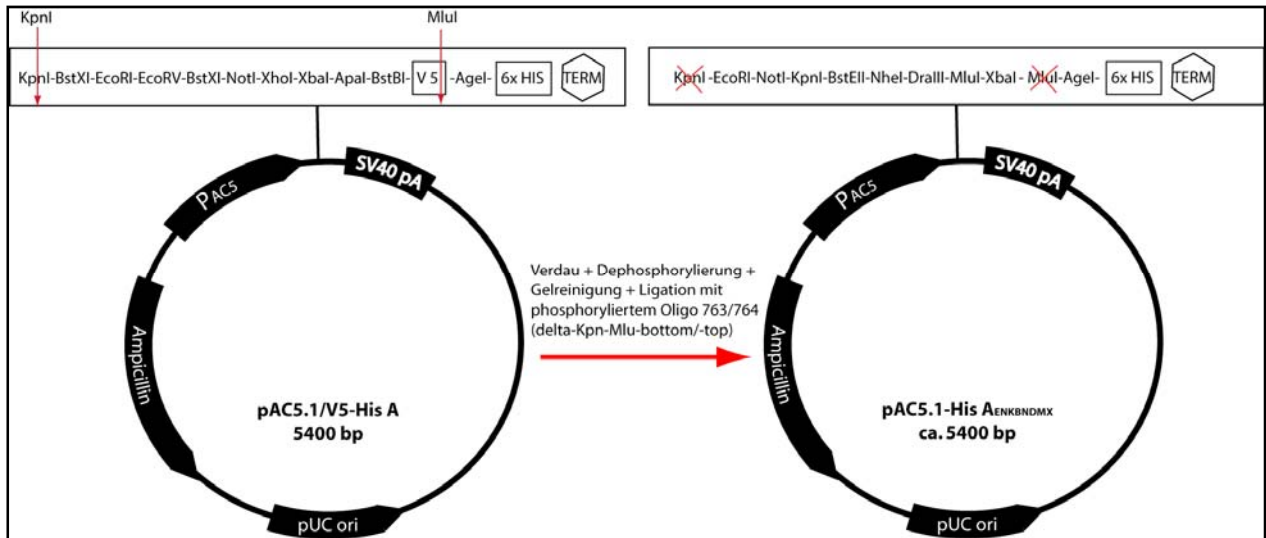


Abbildung 46: Schematische Darstellung über die Konstruktion des Vektors pAC5.1/V5-HisA[ENKBNDMX] zur Subklonierung der Polyalanintrakte. Neben dieser Aufgabe ist dies auch der Zielvektor für die Endkonstrukte (Zellkulturexperimente), was den umfangreichen neuen Polylinker erklärt.

III-C-9 Herstellen und Klonieren von Glutamin-Homopolymertrakten verschiedener Länge

Der nächste Schritt dieses Experimentes war, die Homopolymertrakte herzustellen, die die heteropolymeren Abschnitte der Glutamin-reichen Region im Org-1 C-Terminus ersetzen sollten.

Da Konstrukte mit unterschiedlich langen Homopolymertrakten benötigt wurden, um einen Einfluss der Glutaminhomomeranzahl auf die Funktion des Proteins untersuchen zu können, wurde ein Basisoligomer erstellt, das für sechs Glutamine kodiert und entsprechend 18 Basenpaare lang ist. Es enthielt eine willkürliche Abfolge der Basentriplets CAA und CAG, die für Glutamin kodieren. Das Oligomer besitzt nach dem Annealing an beiden Enden kohäsive Überhänge, die eine sukzessive und gerichtete Ligation mit weiteren Strängen seiner Art ermöglichen. Auf diese Weise war es möglich, Längen, die einem Vielfachen von sechs entsprechen, in einer einzigen Ligationsreaktion herzustellen (Abbildungen 47, 48). Nach der Phosphorylierung und der Ligation wurde ein Teil des Ansatzes auf ein Acrylamidgel (12%) zur Analyse aufgetragen. Der restliche Ansatz wurde auf einem 2%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden gewünschter Größe (in drei Kategorien: <100bp bis 200bp >200bp) per Phenolextraktion eluiert. Diese Technik wurde gewählt, weil gerade kleinere Produkte (unter 100bp) mit dem sonst verwendeten QIAquick Gel-Extraktion Kit (aus hochprozentigen Agarosegelen) nicht oder quantitativ nur unzureichend eluiert werden. Die so eluierten Polymere sollten daraufhin mittels ihrer kompatiblen Überhänge direkt in die BstEII-flankierte DrIII Schnittstelle des wie vorher beschrieben hergestellten Polyglutaminzwischenvektors pAc5.1/V5-HIS-A^{KBDBM} ligiert werden (Abbildung 49). Über einen BstEII Verdau der nach einer Transformation erhaltenen Plasmide sollte die erfolgreiche Insertion überprüft und die Größe des Polymers auf einem Acrylamidgel (12%) charakterisiert werden. Die Homopolymere verschiedener Größen wurden erfolgreich generiert. Die Einklonierung in den Akzeptorvektor konnte bis jetzt aber weder in dieser Arbeit, noch in der Folgearbeit (Gadomski, 2007) durchgeführt werden.

Auch dieser Abschnitt der Konstruktion war zunächst anders geplant gewesen. Der Vollständigkeit halber wird der ursprünglich gewählte Weg, wie schon zuvor geschehen, im Anhang beschrieben.

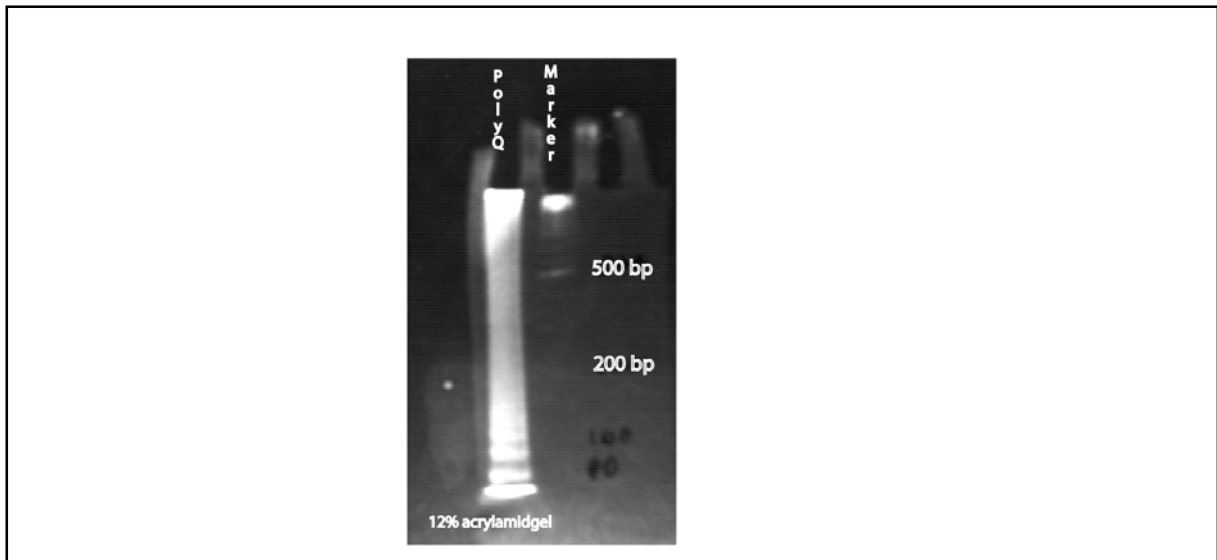


Abbildung 47: Polymerligate auf Analysegel. Im Fall von Glutaminpolymeren sind 3µl der Reaktion auf ein 12% Polyacrylamidgel geladen. Wie man anhand der leiterartigen Struktur sehen kann, sind verschiedenlange Multimere entstanden.

18mer zur Erstellung von DraIII kompatiblen Glutaminhomomeren

CAA CAG CAG CAA CAG CAA	oligo 459
GTT GTT GTC GTC GTT GTC	oligo 787

Abbildung 48: Sequenz eines Glutaminoligos. Die Sequenz kodiert für sechs Glutamine und ist mit ihren Überhängen (rot) sowohl mit einem Schwesteroligo als auch mit einer geöffneten DraIII Schnittstelle kompatibel.

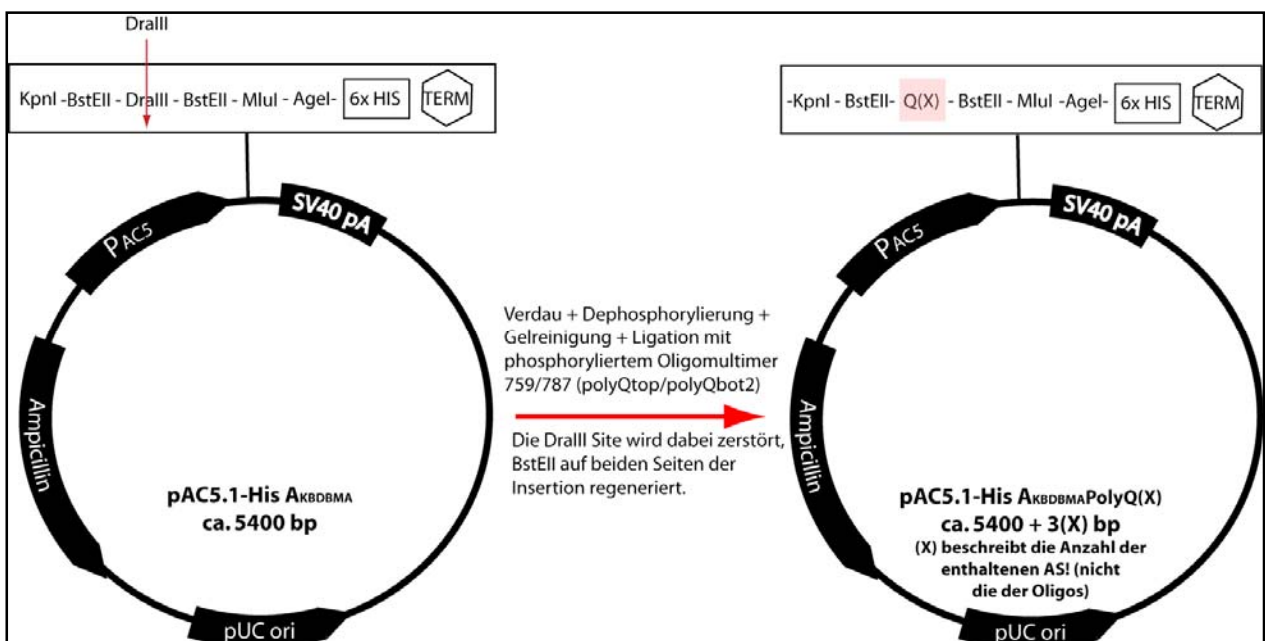


Abbildung 49: Einklonieren der Homoglutaminpolymertrakte in den Zwischenvektor. Dieser Schritt steht noch aus.

III-C-10 Herstellen von Alanin-Homopolymertrakten verschiedener Länge

Ähnlich wie eben für die Herstellung der Glutaminhomopolymere beschrieben, wurde für die Konstruktion der für Alaninhomopolymere kodierenden Oligos verfahren. Auch hierfür wurden durch Selbstligation eines Basisoligomers, das für je sechs Alanine kodiert, deshalb 18bp groß ist und dessen Sequenz aus einer Abfolge der für Alanin kodierenden Triplets GCT, GCC, GCA, GCG besteht, verschieden große polymere Fragmente hergestellt. Nach der Phosphorylierung und der Ligation wurde der Ansatz auf ein Agarosegel (2%) aufgetragen und die Banden per Phenolextraktion eluiert (Abbildungen 50, 51). Die Polymere sollten daraufhin durch ihre kompatiblen Überhänge direkt in die DralIII Schnittstelle des Zwischenvektors pAc5.1/V5-A[ENKBNDMX2] ligiert werden. Nach dem Öffnen des Vektors durch DralIII Verdau wurde das Polymer-Oligo in den dephosphorylierten Vektor eingesetzt. Durch Doppelverdau der präparierten Plasmide nach der Transformation mit den beiden die DralIII Schnittstelle flankierenden Enzymen NheI und MluI konnte der Erfolg auf einem 12% Polyacrylamidgel überprüft werden. Es wurden zwei positive Klone gefunden. Nach Sequenzierung mit dem Primer „pAcforward“ wurde ein inseriertes Monomer (A6) gefunden, das andere wurde als Trimer (A18) charakterisiert. Größere Fragmente wurden jedoch nicht erzeugt.

Wie schon für die Erzeugung der Glutaminpolymere beschrieben, wurde auch hier zunächst nach einer anderen Strategie verfahren, die im Anhang erläutert ist.

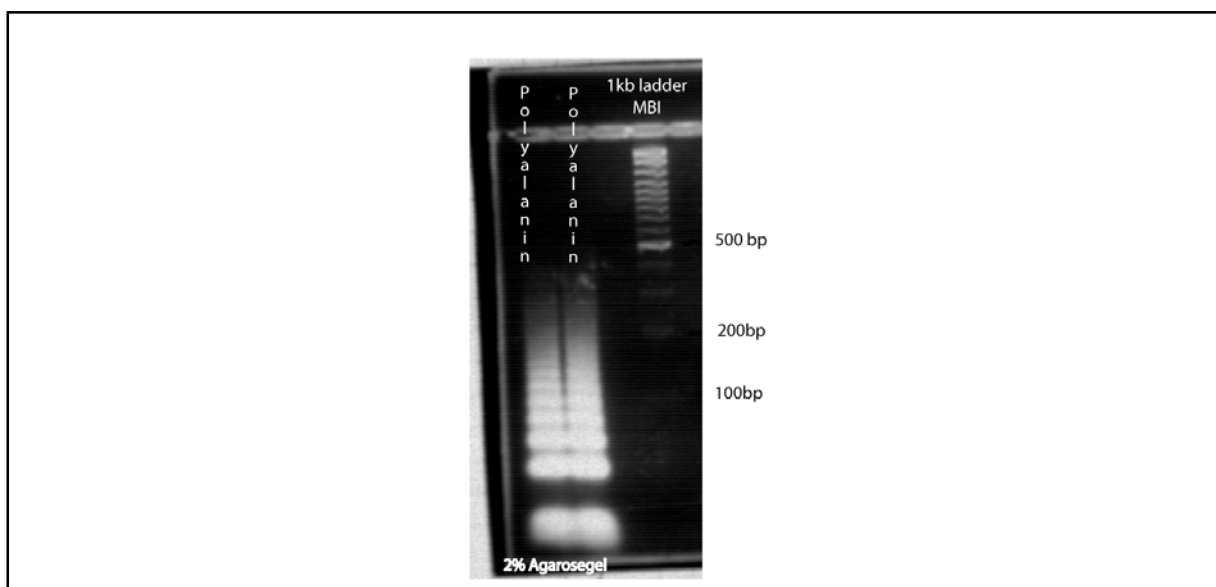


Abbildung 50: Im Fall von Alaninpolymeren ist die gesamte Ligrationsreaktion auf zwei Spuren verteilt auf einem 2% Agarosegel zu sehen (wegen Aufreinigung;). Wie man anhand der leiterartigen Struktur sehen kann, sind verschiedenlange Multimere entstanden.

18mer zur Erstellung eines direkt DraIII kompatiblen Polyalaninmultimeres:

GCA	GCA	GCT	GCT	GCA	GCA	oligo	769
CGT	CGT	CGT	CGA	CGA	CGT	oligo	784

Abbildung 51: Sequenz eines Alaninoligos. Die Sequenz kodiert für sechs Alanine und ist mit ihren Überhängen (rot) sowohl mit einem Schwesteroligo als auch mit einer geöffneten DraIII Schnittstelle kompatibel.

III-C-11 Zusammenfassung der Ergebnisse:

Es wurde bereits erfolgreich erstellt: der Basisvektor pSK[KNM3xFLAGC13stopX], der dem Zusammenbau aller hergestellten Teilmodule vor dem endgültigen Einbau in pUAST und pAc5.1/V5-HIS-A dient. Desweiteren wurde der Org-1 C-Terminus in pSK[ORG1C] durch Einfügen der Erkennungssequenzen für NheI und MluI modifiziert und subkloniert.

Der modifizierte Org-1 C-Terminus wurde komplett in den Basisvektor pSK[KNM3xFLAGC13stopX] eingefügt.

Auch die Deletion des Org-1-eigenen Glutamin-reichen Traktes und die Insertion einer BstEII Erkennungssequenz in pSK[ORG1CΔBssHII/NheM3xFLAGC13stopX] wurde bereits erfolgreich durchgeführt, wenngleich dieser Vektor nach dem Strategiewechsel nicht mehr von direktem Nutzen ist und in der Diplomarbeit von C. Gadomski (2007) durch ein anderes Konstrukt ersetzt wurde.

Durch Selbstligation eines Basisoligomers wurden bereits (A)_n und (Q)_n Fragmente erstellt. Der Zwischenvektor zur Subklonierung und Charakterisierung der (A)_n Konstrukte, pAC5.1/V5-HisA[ENKBNDMX2] wurde hergestellt.

Ein (A)₆ kodierendes Oligo-Monomer und (A)₁₈ kodierendes Trimer wurde in pAC5.1/V5-HisA[ENKBNDMX2] nach Ligation mit dem (A)_n Selbstligat identifiziert.

Für die letztlich benutzte Klonierungsstrategie nicht mehr von Bedeutung waren außerdem folgende bereits hergestellte und im Anhang beschriebene Vektorkonstrukte: Die (Q)_n Akzeptorvektoren PDRIVE[BBstEIIIN] und pAC5.1/V5-HisA[ENKBNDMX], sowie der Vektor pSK[ORG1CΔBssHII/Nhe→BstEII→StuIM3xFLAGC13stopX].

In einer Diplomarbeit (Gadomski, 2007) wurden dann ein pUAST[Org1-NTCdeltaA], pUAST[Org1-NTCdeltaQ], pUAST[Org1-NTCAMonomer] und pUAST[Org1-NTCADimer] Konstrukt hergestellt und im Falle von pUAST[Org1-NTCdeltaA] bereits in Fliegen injiziert.

Die beiden folgenden Abbildungen 52 und 53 zeigen einen graphischen Überblick über die oben beschriebene komplexe Strategie zur Herstellung der Org-1 polyAlanin- und polyGlutaminkonstrukte, wie sie in dieser Arbeit nach Umstellung der ursprünglichen Planung begonnen und in Gadomski (2007) weitergeführt wurde.

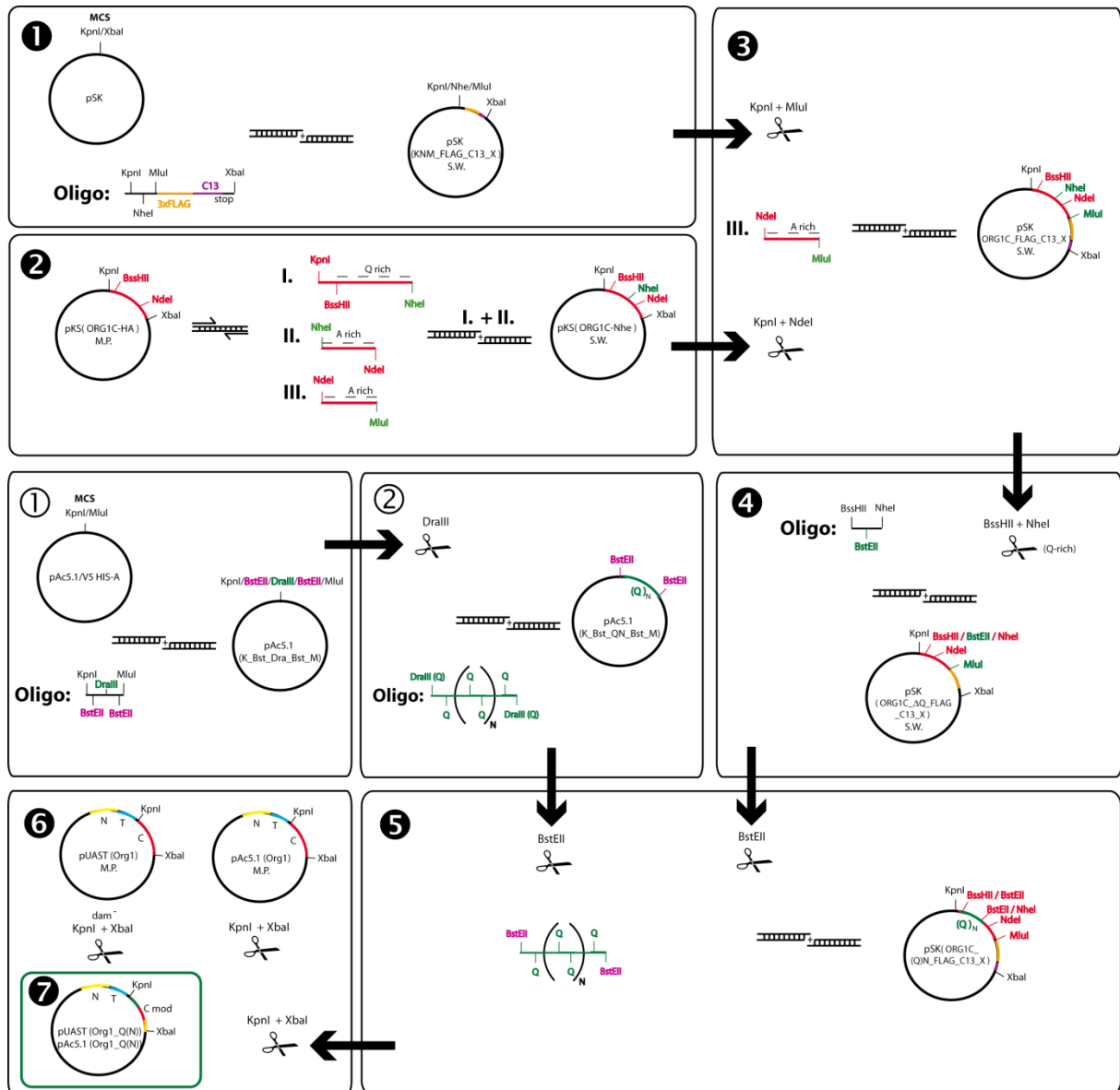


Abbildung 52: Schematische Gesamtübersicht über die im Text beschriebenen und noch geplanten Schritte zur Konstruktion der Homoglutaminpolymere in Org-1. Die schwarzen Ziffern beschreiben den Weg des eigentlichen Org-1 Konstruktes. Die weißen Ziffern beschreiben die Erstellung der Polymere in einem geeigneten Zwischenvektor. Im schritt 5 werden diese daraus in den Org-1 C-Terminus eingefügt. Die Legende zu den Symbolen ist aus Abbildung 53 zu entnehmen.

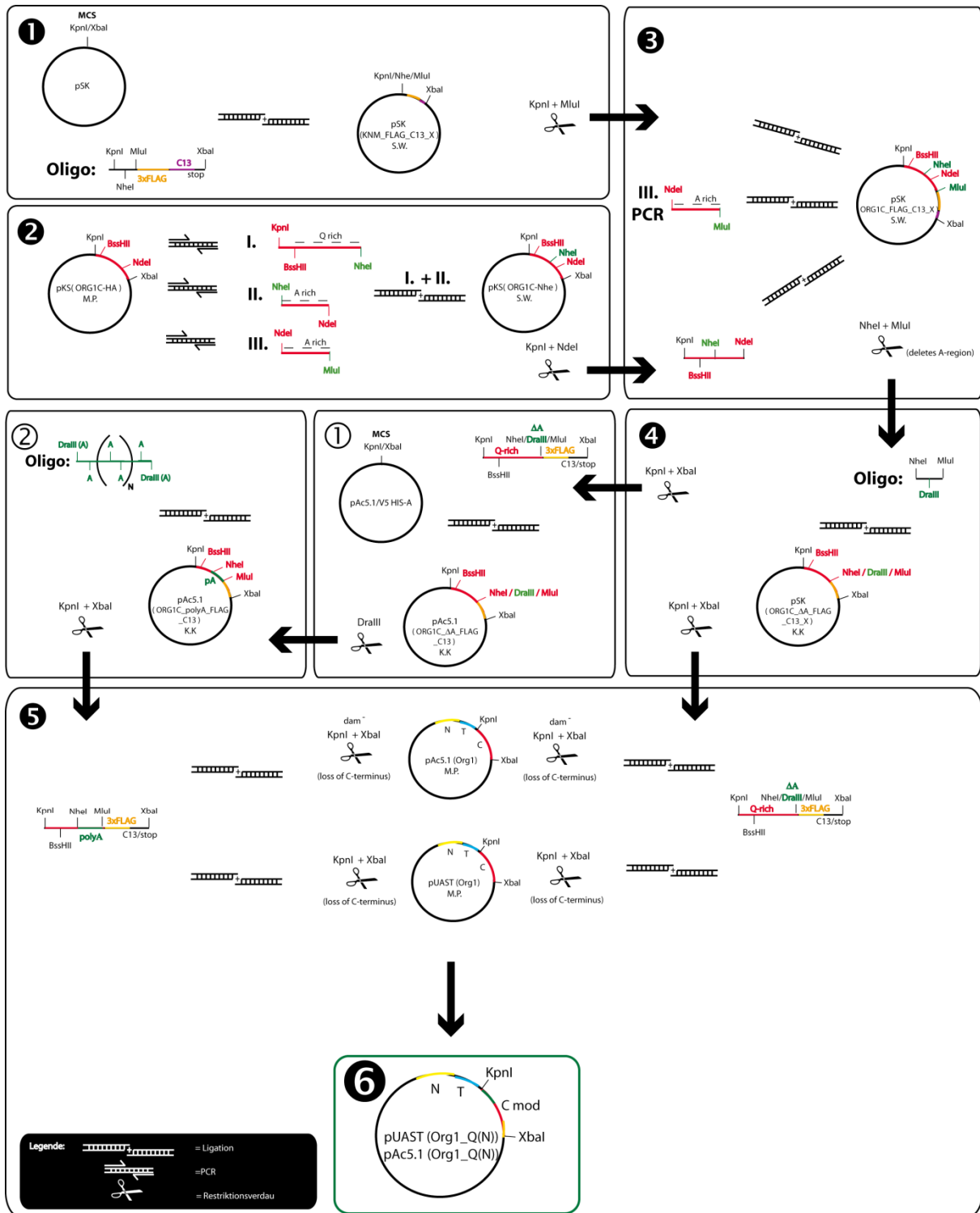


Abbildung 53: Schematische Gesamtübersicht über die im Text beschriebenen durchgeführten und noch geplanten Schritte der Konstruktion der Homoalaninpolymere in Org-1. Die schwarzen Ziffern beschreiben den Weg des eigentlichen Org-1 Konstruktes. Die weißen Ziffern beschreiben die Erstellung der Polymere in einem geeigneten Zwischenvektor. Im schritt 5 werden diese daraus in den Org-1 C-Terminus eingefügt.

III-D Arbeiten am DROSDEL Projekt

Der Mechanismus der zur Herstellung dieser Deletionslinien verwendet wurde basiert auf zwei modifizierten P-Elementen, genannt RS3 und RS5 (Golic and Golic, 1996). Der Insertionsort der P-Elemente wurde vorher für unabhängige 3332 Fliegenlinien basengenau durch inverse PCR bestimmt. Außerdem wurde sichergestellt, dass es sich jeweils um eine einmalige Insertion handelt (Ryder et al., 2004). Diese Elemente besitzen ein funktionstüchtiges *white*-Gen (*mini-white*) als Marker und jeweils zwei, ursprünglich aus *S. cerevisiae* stammende, Flippase-Erkennungssequenz (FRT). Bei beiden P-Elementen liegt eine FRT im ersten Intron von *white*. Die zweite findet sich bei RS3 oberhalb und bei RS5 unterhalb der *white*-Exons. (Abbildung 54). Nach Kreuzen dieser RS-Linien mit einer Flippase-Linie und anschließender Hitzeschockinduktion (45Minuten, 37°C) erfolgt Rekombination zwischen den beiden FRTs. Daraus entstehen bei den Nachkommen dieser Fliegen P-Elemente, die nur noch entweder den 3' oder den 5' Abschnitt des *white* Gens und eine FRT enthalten. *white* ist in diesen Tieren inaktiviert. Dieser Kreuzungsschritt, der weiß-äugige Tiere erzeugt, wurde „flip out“ genannt (Abbildung 55). Diese neuen P-Element-Linien, jetzt RS3r und RS5r (r steht für „reduced“) benannt, erzeugen, miteinander gekreuzt und nach Induktion der Rekombination durch erneuten Hitzeschock in ihren Nachkommen Deletionen des genomischen Bereichs zwischen den beiden in *trans* positionierten FRTs. Gleichzeitig entsteht bei richtiger Orientierung der Elemente im Genom wieder ein funktionsfähiges *white* Gen, das als Positivmarker dient. Dieser Schritt, der wieder zu rot-äugigen Tieren führt, wurde als „Flip in“ bezeichnet (Abbildung 55). Wegen der nun beidseitig vorhandenen 3'Enden kann außerdem langfristig eine hohe Stabilität der Insertion erwartet werden (Mullins et al., 1989). Das detaillierte Kreuzungsschema für den bearbeiteten Genombereich findet sich in Abbildung 67.

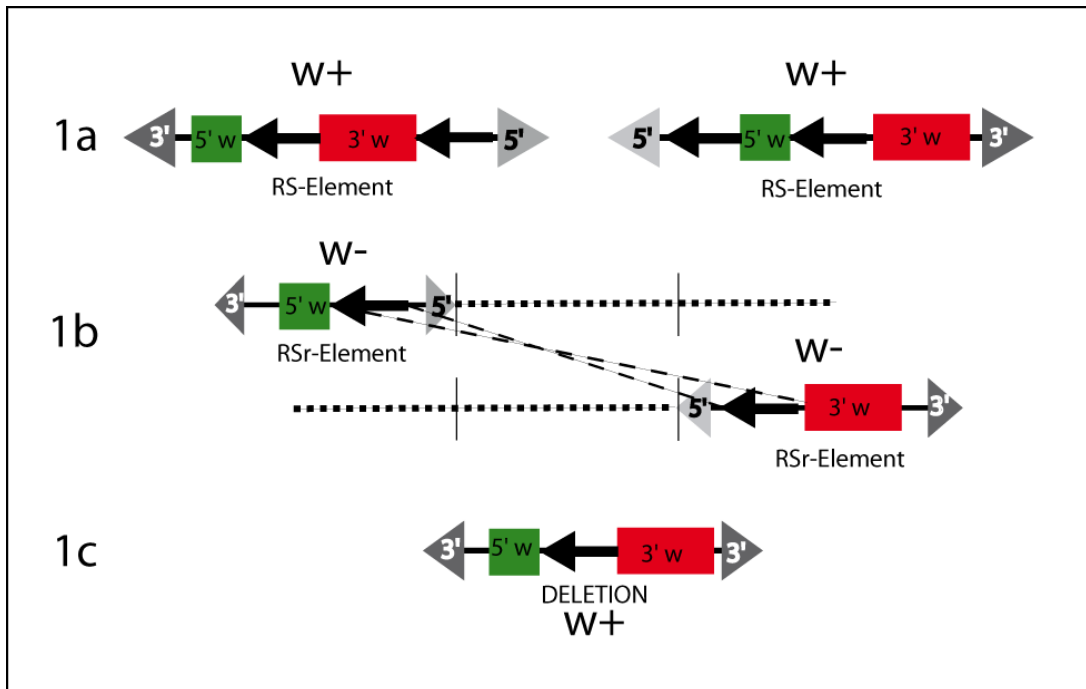


Abbildung 54: Nach Ryder et al, 2004. Bild 1a zeigt den Aufbau eines RS3 und RS5 Elementes. Die beiden schwarzen Pfeile stehen für die FRTs. Eine davon liegt jeweils im ersten Intron, so dass das *white* Gen unterteilt wird. Eine interne Rekombination nach Aktivierung der Flippase erzeugt die in 1b dargestellten RSr-Elemente. Deren *white* Gen ist nicht mehr vollständig und daher nicht funktionsfähig, daher haben die Rekombinanten weiße Augen. Liegen diese in *trans* und werden wiederum rekombiniert, entsteht die in 1c gezeigte Deletion. Der Bereich zwischen den FRTs wird dabei eliminiert. Das *white* Gen wieder vervollständigt. So ist eine Selektion der Nachkommen nach roter Augenfarbe wieder möglich.

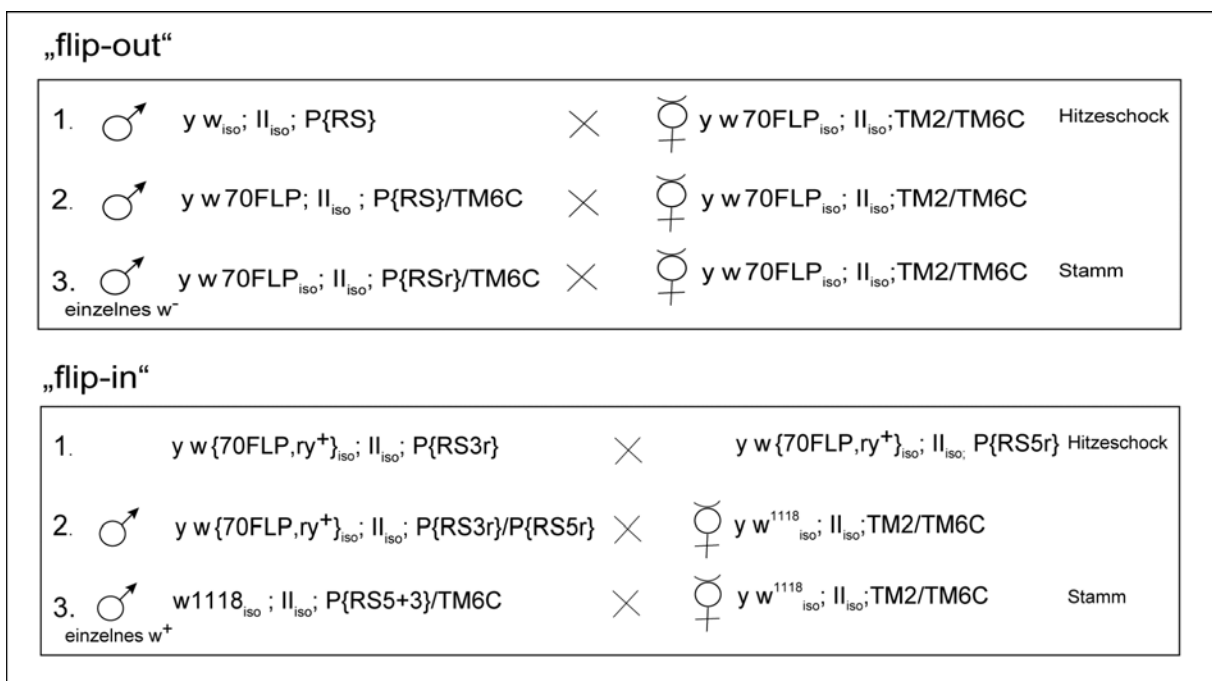


Abbildung 55: detailliertes Kreuzungsschema für „flip out“ und „Flip in“ Experimente auf Chromosom 3R. Jeder Teil besteht aus drei Kreuzungen. Nach je der ersten Kreuzung wird der Hitzeschock für 45Minuten bei 37°C gegeben, um die Flippaseaktivität zu induzieren. Die Nachkommen der zweiten Kreuzung werden dann nach ihrem Marker selektiert und einzelne Individuen wiederum mit Balancern gekreuzt, um einen stabilen Stamm zu etablieren.

Für den „flip out“ wurden zwei bis vier Kreuzungen pro Linie nach dem Hitzeschock angesetzt, da eine Rekombinationseffizienz von ca. 98% vorhergesagt war (Ryder et al., 2004), und letztlich eine rekombinante Linie als Stamm etabliert und weiterverwendet. Dieser Schritt verlief für alle Linien erfolgreich.

Jeweils eine der, wie oben beschrieben, konstruierten RS3r Linien wurde nun im zweiten Schritt, dem „Flip in“ mit einer ebenso erzeugten RS5r Linie gekreuzt. Dafür wurden zwischen 20 und 40 Einzelkreuzungen nach dem Hitzeschock angesetzt. Je nach Häufigkeit des Rekombinationsereignisses wurden bis zu fünf unabhängige Positive behalten. Eine dieser Linien wurde letztlich in Cambridge molekular analysiert und offiziell als Defizienzenstamm etabliert, der Rest verworfen.

Um mit den vorhandenen P-Elementlinien möglichst den ganzen Bereich zwischen den zytologischen Positionen 89 und 100E mit neuen Deletionen abzudecken, wurden die in Tabelle 1 dargestellten Kombinationen zum „Flip in“ gewählt. Eine graphische Darstellung aller durchgeführten Kreuzungen im bearbeiteten Bereich des rechten Arms des III. Chromosoms und deren Ergebnis findet sich in Abbildung 56. Von einigen genomischen Bereichen war durch frühere Arbeiten, beispielsweise der BDSC-Sammlung, bekannt, dass sich dort wegen Haploinsuffizienz keine lebensfähigen Deletionslinien erzeugen lassen. Es wurde versucht, soweit RS-Linien in den entsprechenden Bereichen vorhanden waren, diese bisher bekannten Lücken in der Verfügbarkeit von Deletionslinien zu schließen oder zumindest zu verkleinern.

Eine tabellarische Auswertung über den Produktionserfolg der Deletionslinien, der Anzahl der gesichteten Tiere und der Effizienz, mit der Rekombinanten erhalten wurden, ist in Tabelle 2 zu sehen. Eine statistische Gesamtauswertung ist aufgrund der geringen Anzahl an Ereignissen auf dem in dieser Arbeit begrenzten Abschnitt 89-100E des rechten Arms des dritten Chromosoms nicht sinnvoll. Im Rahmen des Gesamtprojektes erfolgte aber eine solche Auswertung (Ryder et al., 2007).

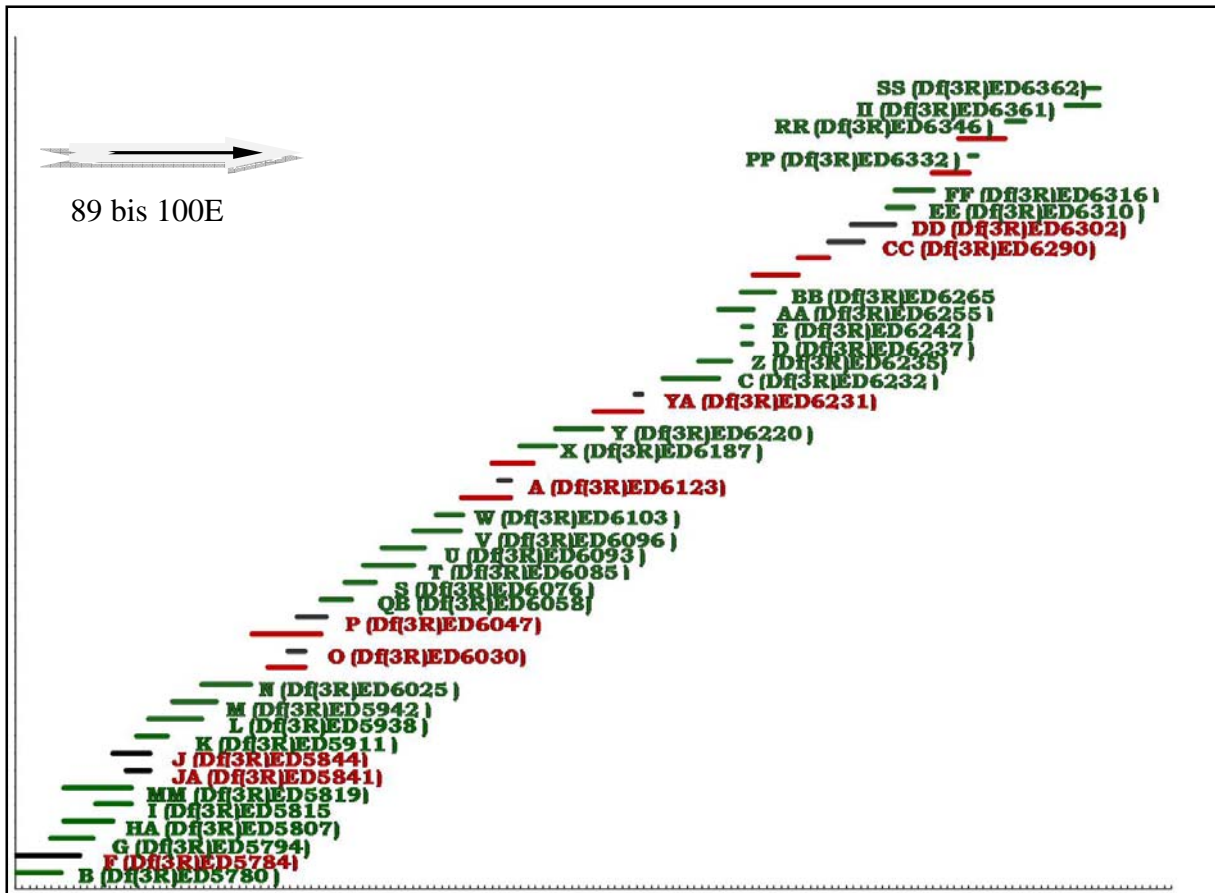


Abbildung 56: Übersicht über die Lage und den Erfolg der Deletionen auf 3R 89-100E. Die Farbe der Balken, zeigt das Ergebnis der Kreuzungen an. Ein grüner Balken demonstriert den Rekombinationserfolg einer Defizienz. Steht ein schwarzer Balken, so war die Rekombination nicht erfolgreich, oder es konnte kein lebensfähiger Stamm etabliert werden. Ein roter Balken steht für genomische Bereiche mit vorhergesagter Haploinsuffizienz. Eine Kreuzung wurde hier nicht durchgeführt, wohl aber der Bereich durch benachbarte Überlappungen versucht zu reduzieren. Eine grüne Schrift steht für den erfolgreich etablierten Stamm, eine rote Schrift für den Misserfolg. Die Buchstaben vor dem offiziellen Namen bedeuten den Laborcode der Kreuzungsreihe. Das Weibchensymbol hinter einem Namen zeigt, dass dieses Kreuzungsexperiment nur weibliche Rekombinante hervorgebracht hat.

Defizienz Name (Df(3R)EDxxxx)	Deletion funktioniert	Balancierter Stamm verfügbar	Gesamtzahl der Gläser	Gläser mit rotäugigen Fliegen	Gesamtzahl der Fliegen	Anzahl der Fliegen mit roten Augen
5780	Y	Y	23	4	3450	5
5784	N	N	18	---	3600	---
5794	Y	Y	40	3	6000	3
5807	Y	Y	35	6	8750	9
5815	Y	Y	40	5	8000	9
5819	Y	N	14	1	2100	1
5841	N	N	21	0	5250	0
5844	Y	N	40	4	8000	4
5911	Y	Y	20	13	<3000	22
5938	Y	Y	40	6	<6000	8
5942	Y	Y	20	7	<3000	8
6025	Y	Y	40	3	8000	7
6030	N	N	20	0	4000	0
6047	Y	N	35	1	7000	1
6058	Y	Y	36	2	7200	2
6076	Y	Y	20	15	<3000	31
6085	Y	Y	40	6	<6000	9
6093	Y	Y	40	3	6000	6
6096	Y	Y	40	1	6000	3
6103	Y	Y	40	3	<6000	16
6123	N	N	40	0	6000	0
6187	Y	Y	40	10	<6000	27
6220	Y	Y	39	4	7800	12
6231	N	N	18	6	4500	6
6232	Y	Y	31	4	4650	9
6235	Y	Y	32	15	6400	32
6237	Y	Y	15	2	2250	3
6242	Y	Y	19	2	2850	5
6255	Y	Y	37	7	7400	11
6265	Y	Y	40	6	8000	7
6290	N	N	40	0	6000	0

6302	Y	N	38	2	7600	2
6310	Y	Y	40	7	<6000	15
6316	Y	Y	36	15	7200	31
6332	Y	Y	15	13	3750	105
6346	Y	Y	20	9	5000	18
6361	Y	Y	36	1	9000	1
6362	Y	Y	25	1	6250	1

Tabelle 2: Durchgeführte Defizienzen und deren Parameter. Die erste Spalte gibt den Namen der Defizienz anhand der ED-Nummer wieder, in der zweiten Spalte findet sich der Erfolg der Konstruktion. Die dritte Spalte gibt Auskunft darüber, ob die Defizienz als balancierter Stamm verfügbar ist (oder verworfen werden musste). Der nächste Abschnitt der Tabelle befasst sich mit der Anzahl der Gläser, die pro Defizienz angesetzt wurden und der Anzahl derer, die Positive hervorbrachten. Der letzte Abschnitt letztlich zeigt die (teilweise geschätzte) Anzahl der Individuen, die untersucht wurden, sowie die Anzahl der positiven Individuen.

IV. DISKUSSION

IV-A-1 Untersuchungen zur Regulation von *omb*:

IV-A-1.1 Das Omb URR Deletion Projekt

Die omb upstream regulatory region wurde erfolgreich deletiert. Eine Linie, A2, wurde molekular genau charakterisiert und der Verlust der URR so nachgewiesen. Alle weiteren entwicklungsbiologischen Untersuchungen wurden von Dr. J. Shen im Labor vorgenommen. Dabei zeigte sich das unerwartete Ergebnis, dass die durch den Verlust eines in der URR enthaltenen Flügelenhancers ausgelöste gleichmäßige Absenkung der Omb Konzentration in der *pouch*-Region der Flügelimaginalscheibe (die in weiblichen Larven stärker ausfällt als in männlichen) zum Auftreten einer apikalen Einfaltung im Epithel entlang der anterior-posterioren Kompartimentgrenze führt. Während der Metamorphose reißt der Flügel entlang dieser Linie (Shen et al., 2008). Das Ergebnis zeigt, dass bei essentiellen und pleiotropen Entwicklungsgenen wie *omb*, die Analyse regulatorischer Mutanten wesentlich ergiebiger ist als die Analyse des Nullphänotyps, wo der gravierendste Entwicklungsdefekt alle später auftretenden unabhängigen Defekte überdeckt.

IV-A-1.2 Enhancer-reporter Konstrukte

Alle genomischen Fragmente, die die in der von Sivasankaran et al (Sivasankaran et al., 2000) durchgeführten Analyse noch bestehenden Lücken schließen sollten, konnten erfolgreich amplifiziert werden. Teilweise konnten sie zur weiteren Amplifikation in pDrive PCR-Cloning Vektor zwischenkloniert werden. Die Umklonierung in den Enhancer-reporter Vektor pCPLZ und die A/T Klonierung von *pomb27A* und *pomb27B* scheiterte jedoch wiederholt.

Die im zweiten Teil dieses Experimentes begonnene Analyse durch X-Gal Färbung von Imaginalscheiben der von I. Duncan gesandten bereits vorhandenen Enhancer-reporter Linien wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit (Abassi, 2007) fortgeführt. Dort konnte gezeigt werden, dass bei sieben von zehn untersuchten *pomb* Fragmentlinien Expression in mindestens einer Scheibenart zu sehen ist. Insbesondere gilt, dass stets verschiedene und räumlich weit getrennte Enhancer zum Gesamtmuster in einer Imaginalscheibe beitragen, d. h. dieses nicht „in einem Guss“ entsteht.

IV-A-1.3 Charakterisierung einer vollständigen Omb Nullmutante nach Mobilisierung von *omb*[P6]

Gegenstand dieses Projektes war die Suche nach einer vollständigen Omb Protein-Nullmutante. Alle existierenden Nullmutanten können, zumindest theoretisch, noch mutante Formen von Omb synthetisieren, die mit einem polyklonalen Antikörper nachweisbar wären. Um eine vollständige Nullmutante zu erhalten, sollte versucht werden durch Mobilisation der P-Element-Insertion P[6] eine größere Defizienz im Bereich des Insertionsortes zu erhalten. P[6] liegt in der Nähe des alternativen *omb* Promoters P2, sowie in der Nähe des beiden Transkripten gemeinsamen Exons 2. Da der Translationsstartpunkt in Exon 2 liegt, würde eine Defizienz, die in Exon 2 hineinreichte, mit großer Wahrscheinlichkeit kein nachweisbares Omb Protein mehr bilden.

Omb[P6] wurde mittels *jump starter* mobilisiert. Diese Kreuzung wurde von G. Pflugfelder durchgeführt und die Charakterisierung in einer früheren Arbeit (Dorner, 2003) begonnen. Damals konnten aber nicht alle Ergebnisse zweifelsfrei erzielt werden, weswegen sie in dieser Arbeit reproduziert und erweitert wurden. Vier Linien, 783, 784, 785 und 786 sind so in die nähere Auswahl gerückt, wenngleich sie noch nicht abschließend eindeutig als Protein-Nullmutante charakterisiert werden konnten. Um festzustellen, ob der alternative Transkriptionsstart tatsächlich eliminiert wurde, könnte künftig eine weitere PCR-Reaktion direkt über Exon 1b ausgeführt werden. Erhält man ein Fragment von wildtypischer Größe, ist der alternative Transkriptionsstart wohl immer noch vorhanden. Erhält man kein Produkt, sollte er eliminiert sein. Da auch in diesem Experiment wieder mit negativen Evidenzen gearbeitet wurde, ist eine Arbeit mit DNA aus Balancer-freien einzelnen Larven und eine WT-Kontrolle unumgänglich.

IV-A-1.4 Charakterisierung der Insertion Qd[For]

In diesem Teilprojekt sollte ein ebenfalls in die *omb* Region inseriertes hochmobiles Element charakterisiert werden. Das Projekt wurde bereits in früheren Arbeiten begonnen ((Bonengel, 1999), (Dorner, 2003)). Dabei konnte die Insertionsregion molekular eingegrenzt werden. Die jetzt durch Sequenzierung von iPCR Produkten erhaltenen Informationen lassen auf ein Foldback (FB) Element schließen, das im weiteren Verlauf dieser Arbeit weiter charakterisiert werden sollte. *Quadroon* Expression führt zur erweiterten Pigmentation der Tergiten und zu einer Veränderung des Zellschicksals von Sehzellen am dorsalen Augenrand

(Tomlinson, 2003). Um zu verstehen, wie Qd[For] die Expression von *omb* in bestimmten Geweben verstärken kann, sollte das auf mindestens 20 kb geschätzte Element weiter molekular analysiert werden. Da die bisher dazu erfolgreich verwendete Technik der inversen PCR wegen der hohen Repetitivität der Foldback-Sequenz nicht weiter benutzt werden konnte und eine von Myrick et al.(2002) entwickelte Technik zur Amplifikation großer genomischer DNA Fragmente, UFW genannt (Myrick and Gelbart, 2002), nicht etabliert werden konnte, wurde begonnen eine Phagenbank aller genomischen Fragmente, die Qd[FOR] DNA enthalten zu generieren. Über eine Southern Blot Hybridisierung eines genomischen Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen durch eine geeignete Sonde wurden die in der Mutante veränderten Fragmente identifiziert. Die effektive und möglichst verlustfreie Gel-Reinigung der sehr großen DNA-Stücke bereitete allerdings erhebliche Probleme, weswegen das Projekt auch aus Mangel an Fliegenmaterial in der erforderlichen Größenordnung an dieser Stelle nicht mehr fortgeführt wurde. Wenngleich in dieser Arbeit der basengenaue Insertionsort und das Element identifiziert wurden und es an beiden Enden ansequenziert wurde, ist das FB-Element immer noch nicht in seiner gesamten Größe charakterisiert. Ein neuer Ansatz mit einer größeren Ausgangsmenge an Qd[FOR]-DNA oder vielleicht bessere Reinigungsmethoden für große DNA Fragmente aus Agarosegelen könnten künftig zu einem besseren Ergebnis führen. Mit den bisher erzielten geringen Mengen an aufgereinigten Qd[For] Fragmenten ist eine Klonierung in geeignete Phagen schwierig.

IV-A-1.5 Genaue Kartierung von *In(1)ombH31*

Ziel dieses Projektes war die molekularbiologisch genaue Lokalisation des historisch zuerst entdeckten *omb* Allels *In(1)ombH31*. Bislang waren nur die durch zytologische Position der Bruchpunkte bekannt (Pflugfelder et al., 1990) und eine grobe molekulare Kartierung vorgenommen worden (Poock, 1992). Der dadurch grob bekannte Insertionsort konnte in dieser Arbeit durch PCR-basierte Experimente wesentlich genauer bestimmt werden, wenngleich der basengenaue distale Bruchpunkt der Inversion nach wie vor nicht bekannt ist, da die iPCR Experimente trotz mehrfacher Wiederholung versagten.

IV-A-1.6 omb-WRE

Wie in der Einleitung besprochen, enthält das 164 bp grosse *omb Wingless response element* (WRE) Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, die für das veränderte Expressionsmuster des WRE nach Mutation einer TCF-Bindungsstelle verantwortlich sein könnten. Hierzu gehören Sd, TCF selbst, das eine weitere potentielle Bindungsstelle im Fragment hat, sowie T-box Proteine. Bei den letzteren wäre Dorsocross (Doc) ein interessanter Kandidat, da es in der Flügelimaginalscheibe in einem ähnlichen Muster wie WREmut exprimiert wird (Reim et al., 2003). Durch *site-directed mutagenesis* wurde hier begonnen, die potentiellen Bindestellen zu mutieren. Die Auswirkung dieser zusätzlichen Mutationen auf das WRE Aktivitätsmuster kann erst nach Etablierung transgener Fliegen beurteilt werden. Die erste dieser Mutationen potentieller Bindestellen in TCF wurde in dieser Arbeit erfolgreich hergestellt. Eine weitere wurde unternommen, führte aber nicht zum Erfolg. In diesem Fall war eine Detektion der mutanten Plasmide über Restriktionsverdau nicht möglich. Zufällig ausgewählte und zum Sequenzieren gesandte Plasmide zeigten die gewünschte Mutation nicht. Dies lässt darauf schließen, dass das als PCR Template dienende Ausgangsmaterial nicht vollständig durch DpnI verdaut worden war, so dass nicht-mutante Klone ebenfalls in größerer Anzahl entstehen konnten.

IV-A-2 Erzeugung verschiedener Mutationen in der Omb T-Domäne

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Erstellung verschiedener Mutationen im Omb Protein, um deren Auswirkung auf DNA-Bindung *in vitro* und Funktion *in vivo* beurteilen zu können.

Omb[K431E], Omb[K431R] und Omb[K431G] wurden erfolgreich erstellt. In *C. elegans* war beobachtet worden, dass Mutanten, mit einem Austausch einer in TBX2 konservierten Aminosäure Lysin gegen Arginin in einer Linie bzw. gegen Glutaminsäure in einer zweiten Linie, einen Defekt in der olfaktorischen Adaption aufweisen (Miyahara et al., 2004). Auch im *Drosophila* Homolog Omb ist dieses Lysin an Position 431 konserviert. Der gezielte Austausch dieser Aminosäure gegen die beiden in *C. elegans* gefundenen Aminosäuren sowie gegen Glycin stellt das Ausgangsmaterial für eine Reihe weiterführender Experimente zur Verfügung. Der dritte Austausch von Lysin mit Glycin, soll Erkenntnis darüber bringen, ob jegliche Substitution von K431 zu den beschriebenen Defekten führt, oder ob die Natur der substituierten Aminosäure dafür bestimmend ist. Glycin wurde ausgesucht, da es die kleinste und biochemisch einfachste Aminosäure darstellt. Um die DNA-Bindung der

mutierten Proteine *in vitro* untersuchen zu können, wurde die Mutagenese in pBAT7071 durchgeführt, einem Vektorkonstrukt, welches die Omb T-Domäne enthält und in der Vergangenheit erfolgreich für Expressionsexperimente eingesetzt wurde. Für Untersuchungen *in vivo* müssen die mutierten T-Domänen in den Kontext des Gesamtproteins eingefügt werden. Hierzu wurde von M. Porsch ein Modulsystem entwickelt, das einen leichten Austausch von Omb-Domänen ermöglicht (Porsch et al., 2005). Bei Expression der mutanten Proteine durch das Gal4/UAS System (Brand and Perrimon, 1993) sind *gain-of-function* Analysen *in vivo* möglich. Wesentlich schwieriger wird sich die Untersuchung der Frage gestalten, ob die Mutationen einen Einfluss auf das olfaktorische System der Fliege haben. Hierzu muss ein *gene replacement* (knock-in) Experiment durchgeführt werden, dessen Machbarkeit in *Drosophila* erst in jüngster Zeit nachgewiesen wurde (Venken and Bellen, 2007). Die Vorbereitungen für die *in vivo* Experimente konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Die nächste erfolgreich eingeführte Mutation Omb[H454Y] steht im Zusammenhang mit der Untersuchung eines potentiellen ATCUN Bindemotives in *Drosophila* Omb. Für dieses Strukturmotiv konnte gezeigt werden, dass es für die Bindung von Cu(II) und Ni(II) Ionen verantwortlich ist. Dieses Motiv wurde auch in der Struktur des zu Omb orthologen humanen TBX3 Proteins gefunden (Sankararamakrishnan et al., 2005). Die Tbx Gene kodieren für eine relativ große Familie von Transkriptionsfaktoren (17 Mitglieder in Säugern, 8 in *Drosophila*). In der Entwicklung dieser Genfamilie Bei der ersten Duplikation des Ur-Tbx Gens entstanden zwei Gene (Brachyury/Tbrain und Tbx1/2/6) die als Vorläufer für alle Unterfamilien dienten. Alle Nachkommen dieser beiden Vorläufer unterscheiden sich innerhalb der DNA-Bindungsdomäne in einem speziellen 3D-Strukturmotiv, der ATCUN Domäne (amino terminal Cu(II) and Ni(II)-binding). Dieses Motiv, repräsentiert durch die Sequenz SMH, findet sich in allen Mitgliedern der Tbx1/2/6 Unterfamilien, während Brachyury/Tbrain-Gene die Sequenz SLH tragen. Die funktionelle Bedeutung dieser stark konservierten Signatur bezüglich Metall- und DNA-Bindung und Dimerisierung soll untersucht werden. Auch hier wurde die Mutation erfolgreich im pBAT7071 Konstrukt erzeugt. Eine Umklonierung in einen Injektionsvektor zusammen mit den restlichen Domänen steht noch aus.

Zuletzt wurde in Omb[A508V] noch die T-Domäne von Omb an Position 508 von Alanin zu Valin geändert. Diese Mutation fand sich in einem EMS-induzierten letalen *omb* Allel (Sen,

2006). Durch *band shift assays* (durchgeführt von A. Sen) wurde gezeigt, dass A508V zum Verlust der DNA Bindungsfähigkeit der T-Domäne führt

In dieser Arbeit wurden eine Reihe von Mutationskonstrukten erstellt, von diesen bereits eines erfolgreich verwendet werden konnte. Diejenigen Konstrukte, die der Erzeugung transgener Fliegen dienen, müssen noch mit den andern Domänen zusammengesetzt werden, damit in transgenen Fliegen, die Bedeutung der Mutationen im Kontext des gesamten Proteins untersucht werden kann.

IV-B Erstellen von Dpp-GFP-Fusionskonstrukten

Ziel dieses Projektes war die Generierung dreier Dpp-GFP-Fusionskonstrukte. Bereits in der Vergangenheit wurden von M. Roth Dpp-Konstrukte erstellt, die im N-Terminus des reifen Proteins eine unterschiedliche Anzahl an geladenen Aminosäuren tragen (Roth, 2003). In der Duplikationsvariante wurde das wildtypische Cluster positiv geladener Aminosäuren verdoppelt. In dem Deletionskonstrukte wurde es komplett deletiert. Um das modifizierte Protein später identifizieren zu können, wurde in der Arbeit von M. Roth allen Konstrukten ein myc-tag hinzugefügt. Die so erstellten drei Dpp-Konstrukte (Duplikation, Deletion und Kontrolle mit myc-tag) wurden bereits damals sowohl in einen für die Zellkultur geeigneten Vektor, als auch in einen zur Drosophila-Injektion geeigneten Vektor kloniert. Die Ergebnisse dieser Experimente ließen auf eine Interaktion der geladenen Region von Dpp mit der Extrazellulären Matrix (ECM) schließen. Darauf basierend wurden Theorien des extrazellulären Transportmechanismus für den Langstreckentransport des Morphogens Dpp aufgestellt. *In vivo* Experimente waren mit diesen Konstrukten nicht möglich, da sich der myc-tag nur auf Western Blots nicht aber immunohistochemisch nachweisen ließ. Dieses Problem sollte mit den in dieser Arbeit konstruierten Dpp-GFP-Fusionskonstrukten umgangen werden. Frühere Versuche in anderen Labors hatten bereits gezeigt, dass GFP an den C-Terminus von Dpp angehängt, nicht zu einem funktionstüchtigen Protein führt (Teleman and Cohen, 2000). Da die Prodomäne vom letztlich aktiven Liganden abgeschnitten wird, kann GFP auch nicht am N-Terminus eingebaut werden. Dagegen führte der Einbau der GFP-kodierenden Sequenz nahe der Spaltungsstelle von Ligand und Prodomäne zu funktionellen Fusionsproteinen. Nach einigen technisch erzwungenen Änderungen der ursprünglich geplanten Klonierungsstrategie, konnten in allen drei Fällen die Varianten in pAc5.1/V5-His-A (für die Expression in Zellkultur), als auch in pUAST (zur Herstellung

transgener Fliegen) kloniert werden. Die Zellkulturkonstrukte wurden an M. Roth zur Durchführung der entsprechenden Experimente versandt. Die Injektion der Dpp-GFP-Fusionskonstrukte in *Drosophila* Embryonen wurde in dieser Arbeit begonnen. Da die laboreigene Apparatur aber nicht problemlos funktionierte, wurden nach langen Fehlversuchen die drei Konstrukte von einem kommerziellen Anbieter (Rainbow Transgenic Flies, USA) injiziert. In einigen Linien wurde von Dr. Jie Shen die Expression eines GFP Fusionsproteins nachgewiesen. Für die Untersuchungen des Ausbreitungsverhaltens der Dpp-Varianten ist wichtig, dass alle drei Konstrukte mit gleicher Stärke exprimiert werden. Daher soll zunächst die Expressionsstärke in allen Linien durch Western Blot Analyse verglichen werden. Sobald diese abgeschlossen ist, kann mit der *in vivo* Analyse der veränderten Dpp-Varianten begonnen werden.

IV-C Polyglutamin und Polyalanin Expansionen in Org-1

Es konnten in dieser Arbeit viele Zwischenkonstrukte zum Erstellen der verschiedenen polyQ und polyA Org-1 Konstrukte erstellt werden. Einige werden nach Strategiewechsel nicht mehr benötigt, mit anderen wurde von C. Gadomski in seiner Diplomarbeit weitergearbeitet (Gadomski, 2007). Die Abbildungen 57 und 58 zum Ergebnisteil zeigen die weitere Strategie. Zunächst sollte der neue (Q)_n Akzeptorvektor pAC5.1/V5-HisA[KBDBM] durch Einklonieren von Oligo 788/789 hergestellt werden. Nach Aufreinigung des (Q)_n Selbstligates über ein Gel sollten drei Größenfraktionen eluiert werden und in den mit DraIII geöffneten Vektor pAC5.1/V5-HisA[KBDBM] ligiert werden. Über BstEII Verdau ist eine Analyse des Resultats auf einem hochprozentigen Gel möglich. Sequenzierung mittels Primer 486 (pAc forward) kann letztlich genauen Aufschluss über die erhaltenen Klone geben. Der gleiche Prozess muss für (A)_n durchgeführt werden, da noch nicht alle gewünschten Konstrukte erstellt werden konnten. Die Alanin-reiche Region aus Org-1 muss in pSK[ORG1CKNheM3xFLAGC13stopX] noch durch Nhe-Mlu Verdau deletiert werden.

Das Umklonieren der (A)_n und (Q)_n Homomere aus ihren Akzeptorvektoren in pSK[ORG1CΔBssHII/Nhe→BstEIIIM3xFLAGC13stopX] und pSK[ORG1CΔNhe/Mlu→DraIIIM3xFLAGC13stopX] (Abbildungen 57, 58) steht noch aus, ebenso wie das Umklonieren der fertigen C-Termini Konstrukte aus pSK-Basisvektor über KpnI und XbaI in pAC5.1/V5-HIS-A und UAST[ORG1-NT] (Porsch, 2002), der die N und T Domäne, die für das funktionstüchtige Org-1 Protein nötig sind, schon beinhaltet

In einer Diplomarbeit (Gadomski, 2007) wurden nach diesem Plan inzwischen bereits ein pUAST[Org1-NTCdeltaA], pUAST[Org1-NTCdeltaQ], pUAST[Org1-NTCAMonomer] und pUAST[Org1-NTCADimer] Konstrukt erstellt und im Falle von pUAST[Org1-NTCdeltaA] bereits in Fliegen injiziert.

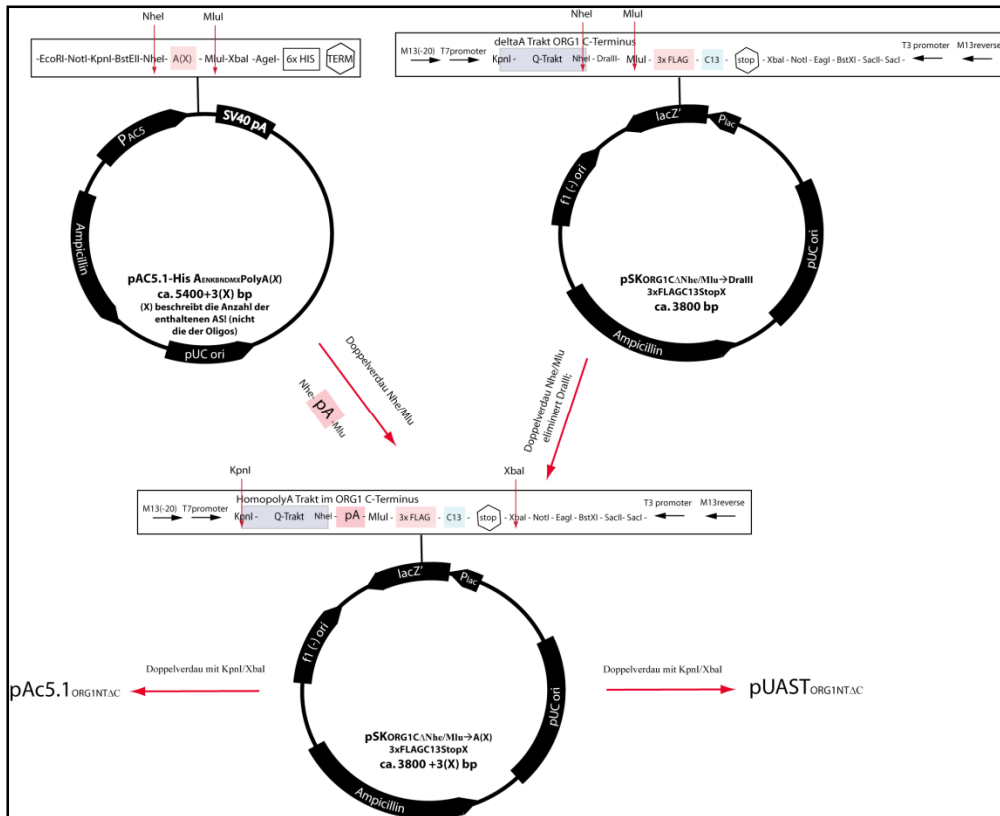


Abbildung 57: Finale Konstruktion der Alanin Homopolymerkonstrukte und Umklonierungsstrategie in die Zielvektoren pAc5.1[ORG1NTΔC] und pUAST[ORG1NTΔC].

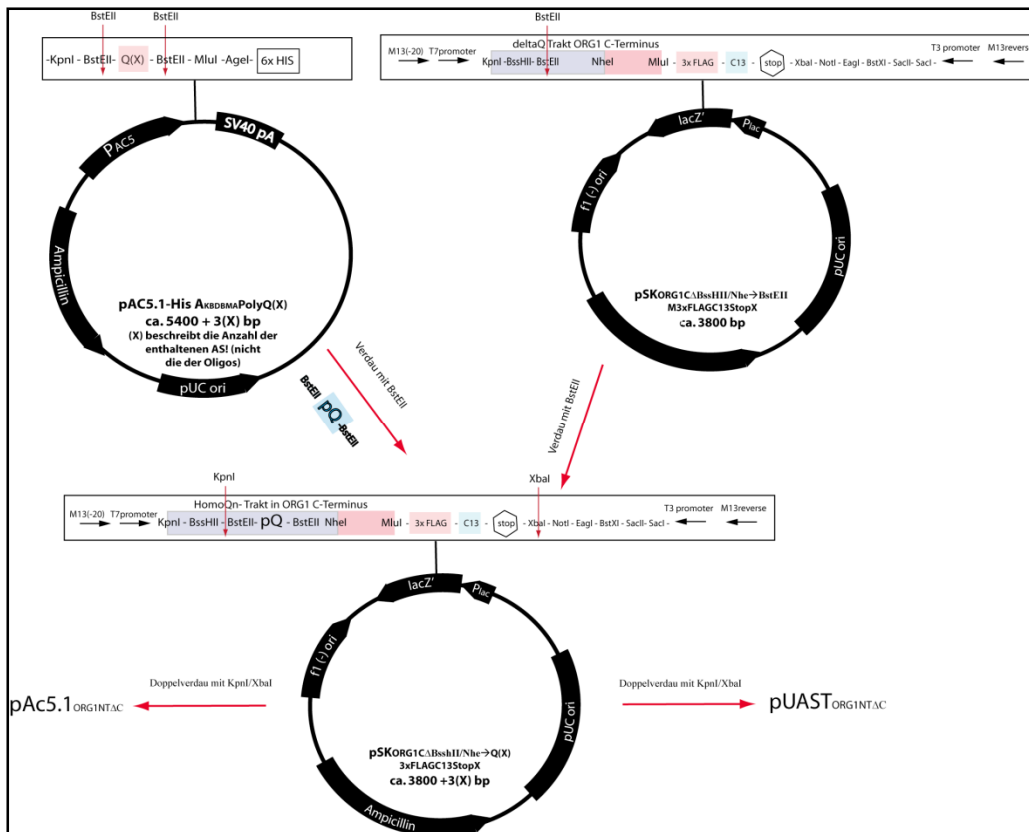


Abbildung 58: Finale Konstruktion der Glutamin Homopolymerkonstrukte und Umklonierungsstrategie in die Zielvektoren pAc5.1[ORG1NT Δ C] und pUAST[ORG1NT Δ C].

IV-D Mitarbeit am DROSDel Projekt

Wie in Abbildung 50 zu sehen ist, konnten die meisten, aber nicht alle gewünschten Deletionen erzeugt werden. Es gelang aber dennoch den größten Teil des genomischen Bereichs mit meist einander überlappenden Deletion abzudecken. Probleme traten hauptsächlich in den bereits als haploinsuffizient vermuteten Bereichen auf. Ein Beispiel dafür ist Df(3R)ED6030, wie in Abbildung 50 zu erkennen ist. Auch am distalen Ende, zwischen den Defizienzen Df(3R)ED6316 und Df(3R)ED6362 blieben ebenfalls einige Lücken, da an diesen Positionen nur wenige RS-Ausgangslinien verfügbar waren. Allerdings war es durchaus möglich neue Defizienzen in rot markierten Bereichen zu erzeugen. Dies gelang entweder in Randbereichen durch Erweiterung der Nachbardeletion (Df(3R)6058) oder auch durch kleine Deletionen im Inneren, wie Df(3R)ED6332 zeigt. Die beiden relativ großen Deletionen Df(3R)ED6302 und Df(3R)ED6290 könnten unter Umständen bei einer Wiederholung der Experimente in größerem Maßstab noch isoliert werden, da die Rekombinationsrate auch von der Größe der Deletion abhängig ist. Die Gesamtstatistik des

DROSDel Projektes zeigt, dass der Deletionserfolg selbst nur wenig von der Größe abhängt, wohl aber die dazu notwendige Anzahl an zu untersuchenden Tieren (Ryder et al., 2007). In einigen Fällen, die in der Übersicht entsprechend gekennzeichnet sind, wurden nur weibliche Rekombinanten gefunden. Da diese kreuzungsbedingt noch das Flippase Gen enthielten, musste in diesen Fällen eine weitere Kreuzung durchgeführt werden (Abbildung 59), um dauerhaft stabile Stämme zu erhalten. Die Richtigkeit der Deletionen wurde in einer mehrstufigen molekulare Analyse durch die englischen Mitglieder des Konsortiums bestätigt (Ryder et al., 2007).

1. y w 70FLP/w; II; P(RS5+3)/TM	x	w/Y; II; TM/TM	
----		w/Y; II; P(RS5+3)/TM oder y w 70FLP/Y; II; P(RS5+3)/TM	
2. w/w; II; TM/TM	x	w/Y; II; P(RS5+3)/TM oder y w 70FLP/Y; II; P(RS5+3)/TM	
		(5 parallele Einzelpaarkreuzungen)	
3. w/w oder y w 70FLP; II; TM/TM	x	w/Y; II; UAS>w+>lacZ	Hitzeschock

Abbildung 59: Kreuzungsschema zur Elimination des flippase Chromosoms aus weiblichen flip-in Linien.

Die Präsenz der Flippase-Insertion lässt sich bei den männlichen Nachkommen der Kreuzung 1 wegen der *rosy+*-Markierung von 70FLP nicht direkt (über die Augenfarbe) nachweisen. In Kreuzung 2 werden ausgehend von 5 einzelnen Männchen parallele Sublinien etabliert. In Kreuzung 3 wurden 10 weibliche TM/TM-Nachkommen auf Flippase-Aktivität getestet (in einem Glas). Das hierzu verwendete $UAS>w+>lacZ$ Konstrukt exprimiert *w+* unter der Kontrolle des *mini-white* Promoters. In $y w FLP; II; UAS>w+>lacZ$ Nachkommen äußert sich flippase Aktivität am Auftreten von Fliegen mit weißen Augenflecken.

In einigen Fällen wurden falsche Positive berichtet, ein Phänomen, das in dem von uns bearbeiteten Bereich (3R) aber nicht auftrat.

Die erzeugten R_{Sr}-Linien sind außerdem in der Lage neben Deletionen auch andere Genom-Mutationen durch Inversion oder Duplikation zu erzeugen (Ryder et al., 2007), was sie über die Deletionserzeugung hinaus zu einem nützlichen Werkzeug macht. Durch geeignete Duplikationen kann es möglich sein, haploinsuffiziente Deletionen als Stamm zu etablieren

Zusammenfassung

Die räumliche und zeitliche Organisation von Genexpression ist für die Entwicklung und das Funktionieren eines jeden Lebewesens von immenser Bedeutung. Dazu laufen eine Vielzahl von Regulationsprozessen auf unterschiedlichen Ebenen ab. In dieser Arbeit wurden im ersten Teil Untersuchungen zur Genregulation des *Drosophila melanogaster optomotor-blind* Genes und zur Funktion des Omb Proteins durchgeführt. Eine Mutante, der ein großer Teil der *upstream regulatory region* fehlt wurde erzeugt, aus einer Vielzahl von Linien isoliert und molekular charakterisiert. Die Auswirkungen dieser Deletion werden in Shen et al. (2008) beschrieben. Plasmide zur Erzeugung transgener Fliegen, mit deren Hilfe eine bereits von Sivasankaran et al. (2000) durchgeführte Enhancer-reporter-Analyse vervollständigt werden sollte, wurden hergestellt. Die historisch zuerst entdeckte Inversion *In(1)ombH31* wurde molekular kartiert. Eine Reihe von Konstrukten mit Punktmutationen in der Omb T-Domäne wurden generiert, die über deren Funktion hinsichtlich DNA-Protein Interaktion, olfaktorischer Adaption und einer potentiellen Metallionenbindefähigkeit hin Aufschluss geben sollen. Des Weiteren wurde eine Reihe von P-Element-Deletionslinien auf den Verlust eines alternativen *omb* Transkriptionsstartpunktes hin untersucht, mit dem Ziel eine vollständige Protein-Nullmutante zur Verfügung zu haben.

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit befasste sich mit der Erzeugung von Dpp-GFP-Fusionskonstrukten, mit deren Hilfe weitere Erkenntnisse über den Dpp-Langstreckentransport erhofft werden. Es wurde außerdem damit begonnen eine Reihe von Org-1 Varianten mit polyAlanin und polyGlutamin Expansion unterschiedlicher Länge herzustellen. Durch diese soll Aufschluss darüber gewonnen werden, ob Glutaminexpansionen, wie in der Literatur vorgeschlagen, aktivierend und Alaninexpansionen in Transkriptionsfaktoren vielleicht reprimierend auf Genaktivität wirken. Org-1 ist ein T-Box Transkriptionsfaktor, der sowohl einen glutaminreichen, als auch einen alaninreichen Bereich enthält und deshalb zu dieser Manipulation gut geeignet war.

Letztlich wurden in dieser Arbeit im Rahmen des DROSDEL Projektes (Ryder et al., 2004, 2007) Deletionen in der rechten Hälfte des Chromosomenarms 3R hergestellt. Der DROSDEL Deletionskit, der durch eine Kooperation vieler europäischer Labore entstand, und der gleichzeitig kommerziell erzeugte Exelixis Kit stellen der *Drosophila* Forschung erstmals einen umfassenden Satz molekular definierter Defizienzen zur Verfügung.

V. Literaturverzeichnis

- Abassi, Y.** (2007). Regulation im Drosophila Gen optomotor blind: Cis-regulatorische Regionen und Expressionstreue von Enhancer-trap Insertionen. *Bachelorarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Ambra, R., Grimaldi, B., Zamboni, S., Filetici, P., Macino, G. and Ballario, P.** (2004). Photomorphogenesis in the hypogeous fungus *Tuber borchii*: isolation and characterization of *Tbwc-1*, the homologue of the blue-light photoreceptor of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **41**, 688-97.
- Ashburner, M. and Bergman, C. M.** (2005). *Drosophila melanogaster*: a case study of a model genomic sequence and its consequences. *Genome Res* **15**, 1661-7.
- Bamshad, M., Lin, R. C., Law, D. J., Watkins, W. C., Krakowiak, P. A., Moore, M. E., Franceschini, P., Lala, R., Holmes, L. B., Gebuhr, T. C. et al.** (1997). Mutations in human *TBX3* alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat Genet* **16**, 311-5.
- Basler, K. and Struhl, G.** (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* **368**, 208-14.
- Basson, C. T., Bachinsky, D. R., Lin, R. C., Levi, T., Elkins, J. A., Soultz, J., Grayzel, D., Kroumpouzou, E., Traill, T. A., Leblanc-Straceski, J. et al.** (1997). Mutations in human *TBX5* [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet* **15**, 30-5.
- Bausenwein, B., Wolf, R. and Heisenberg, M.** (1986). Genetic dissection of optomotor behavior in *Drosophila melanogaster*. Studies on wild-type and the mutant optomotor-blindH31. *J Neurogenet* **3**, 87-109.
- Bettencourt, B. R., Hogan, C. C. and Nimali, M.** (2007). Polyglutamine expansion in *Drosophila*: thermal stress and Hsp70 as selective agents. *J Biosci* **32**, 537-47.
- Bienvenu, T., Poirier, K., Friocourt, G., Bahi, N., Beaumont, D., Fauchereau, F., Ben Jeema, L., Zemni, R., Vinet, M. C., Francis, F. et al.** (2002). *ARX*, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet* **11**, 981-91.
- Blondeau, J. and Heisenberg, M.** (1982). The three-dimensional optomotor torque system of *Drosophila melanogaster*. Studies on wildtype and the mutant optomotor-blind[H31]. *J. Comp. Physiol.* **145**, 321-329.
- Bollag, R. J., Siegfried, Z., Cebra-Thomas, J. A., Garvey, N., Davison, E. M. and Silver, L. M.** (1994). An ancient family of embryonically expressed mouse genes sharing a conserved protein motif with the *T* locus. *Nat Genet* **7**, 383-9.
- Bonengel, S.** (1999). *Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- Brais, B., Bouchard, J. P., Xie, Y. G., Rochefort, D. L., Chretien, N., Tome, F. M., Lafreniere, R. G., Rommens, J. M., Uyama, E., Nohira, O. et al.** (1998). Short GCG expansions in the *PABP2* gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* **18**, 164-7.
- Brand, A. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Brand, A. H., Manoukian, A. S. and Perrimon, N.** (1994). Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol* **44**, 635-54.
- Bridges, C. B.** (1916). Non-Disjunction as Proof of the Chromosome Theory of Heredity. *Genetics* **1**, 1-52.

- Brunner, A., Wolf, R., Pflugfelder, G. O., Poeck, B. and Heisenberg, M.** (1992). Mutations in the proximal region of the optomotor-blind locus of *Drosophila melanogaster* reveal a gradient of neuroanatomical and behavioral phenotypes. *J Neurogenet* **8**, 43-55.
- Bull, P. C. and Cox, D. W.** (1994). Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet* **10**, 246-52.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G.** (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-5.
- Callewaert, L., Christiaens, V., Haelens, A., Verrijdt, G., Verhoeven, G. and Claessens, F.** (2003). Implications of a polyglutamine tract in the function of the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 46-52.
- Campbell, G., Weaver, T. and Tomlinson, A.** (1993). Axis specification in the developing *Drosophila* appendage: the role of wingless, decapentaplegic, and the homeobox gene *aristaless*. *Cell* **74**, 1113-23.
- Carreira, S., Dexter, T. J., Yavuzer, U., Easty, D. J. and Goding, C. R.** (1998). Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *Mol Cell Biol* **18**, 5099-108.
- Chapman, D. L., Garvey, N., Hancock, S., Alexiou, M., Agulnik, S. I., Gibson-Brown, J. J., Cebra-Thomas, J., Bollag, R. J., Silver, L. M. and Papaioannou, V. E.** (1996). Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn* **206**, 379-90.
- Coll, M., Seidman, J. G. and Müller, C. W.** (2002). Structure of the DNA-bound T-box domain of human TBX3, a transcription factor responsible for ulnar-mammary syndrome. *Structure (Camb)* **10**, 343-56.
- Conlon, F. L., Fairclough, L., Price, B. M., Casey, E. S. and Smith, J. C.** (2001). Determinants of T box protein specificity. *Development* **128**, 3749-58.
- Cooley, L., Thompson, D. and Spradling, A. C.** (1990). Constructing deletions with defined endpoints in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3170-3.
- Cummings, C. J. and Zoghbi, H. Y.** (2000). Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet* **9**, 909-16.
- Daniels, S. B., Strausbaugh, L. D. and Armstrong, R. A.** (1985). Molecular analysis of P element behavior in *Drosophila simulans* transformants. *Mol Gen Genet* **200**, 258-65.
- Diegelmann, S.** (1999). Untersuchung der Genregulation im omb-Lokus von *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit. Universität Würzburg*.
- Dobrovolskaia-Zavadskaia, N.** (1927). Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caractère héréditaire 'non-viable'. *C. R. Hébd. Séances Soc. Biol.* **97**, 114-116.
- Dorner, C.** (2003). Untersuchungen zu cis-regulatorischen Elementen im omb Gen von *Drosophila* und Charakterisierung Marker-defekter P-element Linien *Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- Driscoll, D. A., Spinner, N. B., Budarf, M. L., McDonald-McGinn, D. M., Zackai, E. H., Goldberg, R. B., Shprintzen, R. J., Saal, H. M., Zonana, J., Jones, M. C. et al.** (1992). Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* **44**, 261-8.
- Engels, W. R.** (1984). A trans-acting product needed for P factor transposition in *Drosophila*. *Science* **226**, 1194-6.
- Engels, W. R.** (1989). P elements in *Drosophila*. In *Mobile DNA*, (ed. D. Berg, and Howe, M.), pp. 437-484. Washington D.C: American Society for Microbiology
- Engels, W. R., Johnson-Schlitz, D. M., Eggleston, W. B. and Sved, J.** (1990). High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent. *Cell* **62**, 515-25.

- Entchev, E. V., Schwabedissen, A. and Gonzalez-Gaitan, M.** (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* **103**, 981-91.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.
- Gadomski, C.** (2007). Konstruktion von Derivaten des Drosophila org-1 Gens zur Untersuchung der polyglutamin- und polyalaninreichen Regionen. *Diplomarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.*
- Gasmi, G., Singer, A., Forman-Kay, J. and Sarkar, B.** (1997). NMR structure of neuromedin C, a neurotransmitter with an amino terminal Cull-, Nill-binding (ATCUN) motif. *J Pept Res* **49**, 500-9.
- Gatchel, J. R. and Zoghbi, H. Y.** (2005). Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* **6**, 743-55.
- Gloor, G. B., Nassif, N. A., Johnson-Schlitz, D. M., Preston, C. R. and Engels, W. R.** (1991). Targeted gene replacement in Drosophila via P element-induced gap repair. *Science* **253**, 1110-7.
- Golic, K. G. and Golic, M. M.** (1996). Engineering the Drosophila genome: chromosome rearrangements by design. *Genetics* **144**, 1693-711.
- Goodman, F. R.** (2002). Limb malformations and the human HOX genes. *Am J Med Genet* **112**, 256-65.
- Goodman, F. R., Mundlos, S., Muragaki, Y., Donnai, D., Giovannucci-Uzielli, M. L., Lapi, E., Majewski, F., McGaughran, J., McKeown, C., Reardon, W. et al.** (1997). Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7458-63.
- Green, M. M. and Shepherd, S. H.** (1979). Genetic instability in Drosophila melanogaster: the induction of specific chromosome 2 deletions by MR elements. *Genetics* **92**, 823-32.
- Grimm, S. and Pflugfelder, G. O.** (1996). Control of the gene optomotor-blind in Drosophila wing development by decapentaplegic and wingless. *Science* **271**, 1601-4.
- Grogan, J., McKnight, C. J., Troxler, R. F. and Oppenheim, F. G.** (2001). Zinc and copper bind to unique sites of histatin 5. *FEBS Lett* **491**, 76-80.
- Han, K. and Manley, J. L.** (1993). Transcriptional repression by the Drosophila even-skipped protein: definition of a minimal repression domain. *Genes Dev* **7**, 491-503.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for Transformation of E. coli. In *DNA cloning: a practical approach*, vol. 1 (ed. D. M. Glover), pp. 109-136. Oxford, Washington D.C.: IRL Press.
- Hanna-Rose, W. and Hansen, U.** (1996). Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet* **12**, 229-34.
- Harford, C. and Sarkar, B.** (1995). Neuromedin C binds Cu(II) and Ni(II) via the ATCUN motif: implications for the CNS and cancer growth. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 877-82.
- Hausen, K. and Egelhaaf, M.** (1989). Neuronal mechanisms of visual course control in insects. In *Facets of Vision*, (ed. D. G. Stavenga and R. C. Hardie), pp. 391-424. Berlin: Springer.
- He, M., Wen, L., Campbell, C. E., Wu, J. Y. and Rao, Y.** (1999). Transcription repression by Xenopus ET and its human ortholog TBX3, a gene involved in ulnar-mammary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10212-7.
- Heberlein, U., Wolff, T. and Rubin, G. M.** (1993). The TGF beta homolog dpp and the segment polarity gene hedgehog are required for propagation of a morphogenetic wave in the Drosophila retina. *Cell* **75**, 913-26.

- Heisenberg, M.** (1972). Behavioral diagnostics, a way to analyze visual mutants of *Drosophila*. In *Information procession in the visual system*, (ed. R. Wehner), pp. 265-268. Berlin: Springer.
- Heisenberg, M. and Götz, K. G.** (1975). The use of mutations for the partial degradation of vision in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiology* **98**, 217-241.
- Heisenberg, M., Wonneberger, R. and Wolf, R.** (1978). Optomotor-blindH31 – a drosophila mutant of the lobula plate giant neurons. *J. Comp. Physiology* **124**, 287-296.
- Herbst, M. and Wanker, E. E.** (2006). Therapeutic approaches to polyglutamine diseases: combating protein misfolding and aggregation. *Curr Pharm Des* **12**, 2543-55.
- Herrmann, B. G., Labeit, S., Poustka, A., King, T. R. and Lehrach, H.** (1990). Cloning of the T-gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* **343**, 617-622.
- Heslip, T. R. and Hodgetts, R. B.** (1994). Targeted transposition at the vestigial locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **138**, 1127-35.
- Hiroi, Y., Kudoh, S., Monzen, K., Ikeda, Y., Yazaki, Y., Nagai, R. and Komuro, I.** (2001). Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* **28**, 276-80.
- Hofmeyer, K.** (2001). The optic lobe regulatory region of the *Drosophila melanogaster* gene *optomotor-blind*. *Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- Hofmeyer, K., Kretzschmar, D. and Pflugfelder, G.** (2008). *optomotor-blind* expression in glial cells is required for correct axonal projection across the *Drosophila* inner optic chiasm. *Dev. Biol., im Druck*.
- Hursh, D. A., Padgett, R. W. and Gelbart, W. M.** (1993). Cross regulation of decapentaplegic and Ultrabithorax transcription in the embryonic visceral mesoderm of *Drosophila*. *Development* **117**, 1211-22.
- Irish, V. F. and Gelbart, W. M.** (1987). The decapentaplegic gene is required for dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **1**, 868-79.
- Jacobs, J. J., Keblusek, P., Robanus-Maandag, E., Kristel, P., Lingbeek, M., Nederlof, P. M., van Welsem, T., van de Vijver, M. J., Koh, E. Y., Daley, G. Q. et al.** (2000). Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet* **26**, 291-9.
- Jin, W., Riley, R. M., Wolfinger, R. D., White, K. P., Passador-Gurgel, G. and Gibson, G.** (2001). The contributions of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* **29**, 389-95.
- Kaphingst, K. and Kunes, S.** (1994). Pattern formation in the visual centers of the *Drosophila* brain: wingless acts via decapentaplegic to specify the dorsoventral axis. *Cell* **78**, 437-48.
- Karlin, S., Brocchieri, L., Bergman, A., Mrazek, J. and Gentles, A. J.** (2002). Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 333-8.
- Kispert, A. and Herrmann, B. G.** (1993). The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *Embo J* **12**, 3211-20.
- Kispert, A., Koschorz, B. and Herrmann, B. G.** (1995). The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. *Embo J* **14**, 4763-72.
- Koch, K. A., Pena, M. M. and Thiele, D. J.** (1997). Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chem Biol* **4**, 549-60.
- Lamolet, B., Pulichino, A. M., Lamonerie, T., Gauthier, Y., Brue, T., Enjalbert, A. and Drouin, J.** (2001). A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* **104**, 849-59.

- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M.** (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* **381**, 387-93.
- Liao, G. C., Rehm, E. J. and Rubin, G. M.** (2000). Insertion site preferences of the P transposable element in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3347-51.
- Massague, J.** (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**, 753-91.
- Mayer, L.** (2008). Analyse der Enhancer Region des Gens *optomotor-blind* von *drosophila*. *Diplomarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- McKenna, N. J. and O'Malley, B. W.** (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **108**, 465-74.
- Miyahara, K., Suzuki, N., Ishihara, T., Tsuchiya, E. and Katsura, I.** (2004). TBX2/TBX3 transcriptional factor homologue controls olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol* **58**, 392-402.
- Morgan, T. H. and Bridges, C. B.** (1916). Sex-linked inheritance in *Drosophila*. *Carnegie Institution of Washington Publication no. 237*, 1-88.
- Morimura, S., Maves, L., Chen, Y. and Hoffmann, F. M.** (1996). decapentaplegic overexpression affects *Drosophila* wing and leg imaginal disc development and wingless expression. *Dev Biol* **177**, 136-51.
- Muller, C. W. and Herrmann, B. G.** (1997). Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *Nature* **389**, 884-8.
- Mullins, M. C., Rio, D. C. and Rubin, G. M.** (1989). cis-acting DNA sequence requirements for P-element transposition. *Genes Dev* **3**, 729-38.
- Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J. B., Aylsworth, A. S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W. G., Henn, W., Knoll, J. H. et al.** (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* **89**, 773-9.
- Muragaki, Y., Mundlos, S., Upton, J. and Olsen, B. R.** (1996). Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. *Science* **272**, 548-51.
- Myrick, K. V. and Gelbart, W. M.** (2002). Universal Fast Walking for direct and versatile determination of flanking sequence. *Gene* **284**, 125-31.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y. and Kingston, R. E.** (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-87.
- Nassif, N. and Engels, W.** (1993). DNA homology requirements for mitotic gap repair in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1262-6.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K.** (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-68.
- O'Hare, K. and Rubin, G. M.** (1983). Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* **34**, 25-35.
- Packham, E. A. and Brook, J. D.** (2003). T-box genes in human disorders. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 1**, R37-44.
- Padgett, R. W., Wozney, J. M. and Gelbart, W. M.** (1993). Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2905-9.
- Panganiban, G. E., Reuter, R., Scott, M. P. and Hoffmann, F. M.** (1990). A *Drosophila* growth factor homolog, decapentaplegic, regulates homeotic gene expression within and across germ layers during midgut morphogenesis. *Development* **110**, 1041-50.
- Papapetrou, C., Edwards, Y. H. and Sowden, J. C.** (1997). The T transcription factor functions as a dimer and exhibits a common human polymorphism Gly-177-Asp in the conserved DNA-binding domain. *FEBS Lett* **409**, 201-6.

- Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E. et al.** (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet* **36**, 288-92.
- Partington, M. W., Mulley, J. C., Sutherland, G. R., Hockey, A., Thode, A. and Turner, G.** (1988). X-linked mental retardation with dystonic movements of the hands. *Am J Med Genet* **30**, 251-62.
- Paxton, C., Zhao, H., Chin, Y., Langner, K. and Reecy, J.** (2002). Murine Tbx2 contains domains that activate and repress gene transcription. *Gene* **283**, 117-24.
- Pearson, C. E., Nichol Edamura, K. and Cleary, J. D.** (2005). Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* **6**, 729-42.
- Pflugfelder, G. O. and Heisenberg, M.** (1995). Optomotor-blind of *Drosophila melanogaster*: a neurogenetic approach to optic lobe development and optomotor behaviour. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **110**, 185-202.
- Pflugfelder, G. O., Roth, H. and Poeck, B.** (1992a). A homology domain shared between *Drosophila* optomotor-blind and mouse Brachyury is involved in DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 918-25.
- Pflugfelder, G. O., Roth, H., Poeck, B., Kerscher, S., Schwarz, H., Jonschker, B. and Heisenberg, M.** (1992b). The lethal(1)optomotor-blind gene of *Drosophila melanogaster* is a major organizer of optic lobe development: isolation and characterization of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1199-203.
- Pflugfelder, G. O., Schwarz, H., Roth, H., Poeck, B., Sigl, A., Kerscher, S., Jonschker, B., Pak, W. L. and Heisenberg, M.** (1990). Genetic and molecular characterization of the optomotor-blind gene locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **126**, 91-104.
- Poeck, B.** (1989). Genom-Charakterisierung im Bereich des Gens optomotor-blind von *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- Poeck, B.** (1992). Untersuchungen zur Genetik und Expression im *optomotor-blind* Genlokus von *Drosophila melanogaster*. *Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- Poeck, B., Balles, J. and Pflugfelder, G. O.** (1993a). Transcript identification in the optomotor-blind locus of *Drosophila melanogaster* by intragenic recombination mapping and PCR-aided sequence analysis of lethal point mutations. *Mol Gen Genet* **238**, 325-32.
- Poeck, B., Hofbauer, A. and Pflugfelder, G. O.** (1993b). Expression of the *Drosophila* optomotor-blind gene transcript in neuronal and glial cells of the developing nervous system. *Development* **117**, 1017-29.
- Porsch, M.** (2002). OMB and ORG-1: Homologous *Drosophila* T-box proteins with functional specificity. *Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- Porsch, M., Hofmeyer, K., Bausenwein, B. S., Grimm, S., Weber, B. H., Miassod, R. and Pflugfelder, G. O.** (1998). Isolation of a *Drosophila* T-box gene closely related to human TBX1. *Gene* **212**, 237-48.
- Porsch, M., Sauer, M., Schulze, S., Bahlo, A., Roth, M. and Pflugfelder, G. O.** (2005). The relative role of the T-domain and flanking sequences for developmental control and transcriptional regulation in protein chimeras of *Drosophila* OMB and ORG-1. *Mech Dev* **122**, 81-96.
- Prince, S., Carreira, S., Vance, K. W., Abrahams, A. and Goding, C. R.** (2004). Tbx2 directly represses the expression of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res* **64**, 1669-74.
- Ray, R. P., Arora, K., Nusslein-Volhard, C. and Gelbart, W. M.** (1991). The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* **113**, 35-54.
- Regan, L.** (1995). Protein design: novel metal-binding sites. *Trends Biochem Sci* **20**, 280-5.

- Reim, I., Lee, H. H. and Frasch, M.** (2003). The T-box-encoding Dorsocross genes function in amnioserosa development and the patterning of the dorsolateral germ band downstream of Dpp. *Development* **130**, 3187-204.
- Rio, D. C.** (1990). Molecular mechanisms regulating Drosophila P element transposition. *Annu Rev Genet* **24**, 543-78.
- Ross, C. A., Margolis, R. L., Becher, M. W., Wood, J. D., Engelender, S., Cooper, J. K. and Sharp, A. H.** (1998). Pathogenesis of neurodegenerative diseases associated with expanded glutamine repeats: new answers, new questions. *Prog Brain Res* **117**, 397-419.
- Roth, M.** (2003). Functional and developmental characterisation of matrix binding sites in *decapentaplegic*. *Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- Ryder, E., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Drummond, J., Webster, J., Johnson, G., Morley, T., Chan, Y. S., Blows, F., Coulson, D. et al.** (2007). The DrosDel deletion collection: a Drosophila genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics* **177**, 615-29.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G. et al.** (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**, 797-813.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sankararamkrishnan, R., Verma, S. and Kumar, S.** (2005). ATCUN-like metal-binding motifs in proteins: identification and characterization by crystal structure and sequence analysis. *Proteins* **58**, 211-21.
- Scambler, P. J.** (2000). The 22q11 deletion syndromes. *Hum Mol Genet* **9**, 2421-6.
- Schaffar, G., Breuer, P., Boteva, R., Behrends, C., Tzvetkov, N., Strippel, N., Sakahira, H., Siegers, K., Hayer-Hartl, M. and Hartl, F. U.** (2004). Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Mol Cell* **15**, 95-105.
- Scharf, S.** (2002). Investigations into the gene structure of *drosophila melanogaster* and *drosophila virilis* *optomotor-blind*. *Diplomarbeit. Universität Würzburg*.
- Sen, A.** (2006). *Optomotor-blind* and the Horizontal and Vertical System cells of the *Drosophila* optic lobes: Molecular and laser ablation studies. *Dissertation. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Shen, J., Dorner, C., Bahlo, A. and Pflugfelder, G. O.** (2008). *optomotor-blind* suppresses instability at the A/P compartment 3 boundary of the *Drosophila* wing. *Mech Dev. im Druck*.
- Sinden, R. R., Potaman, V. N., Oussatcheva, E. A., Pearson, C. E., Lyubchenko, Y. L. and Shlyakhtenko, L. S.** (2002). Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA. *J Biosci* **27**, 53-65.
- Sivasankaran, R., Vigano, M. A., Muller, B., Affolter, M. and Basler, K.** (2000). Direct transcriptional control of the Dpp target *omb* by the DNA binding protein Brinker. *Embo J* **19**, 6162-72.
- Spencer, F. A., Hoffmann, F. M. and Gelbart, W. M.** (1982). *Decapentaplegic*: a gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell* **28**, 451-61.
- Spradling, A. C. and Rubin, G. M.** (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-7.
- Spradling, A. C., Stern, D. M., Kiss, I., Roote, J., Lavery, T. and Rubin, G. M.** (1995). Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10824-30.

- Stromme, P., Mangelsdorf, M. E., Shaw, M. A., Lower, K. M., Lewis, S. M., Bruyere, H., Lucherath, V., Gedeon, A. K., Wallace, R. H., Scheffer, I. E. et al.** (2002). Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat Genet* **30**, 441-5.
- Sun, H., Tsai, C., Green, M. M., Chao, J., Yu, C., Jaw, T., Yeh, J. and Bolshakov, V. N.** (1995). *white* as a Reporter Gene to Detect Transcriptional Silencers Specifying Position-Specific Gene Expression During *Drosophila melanogaster* Eye Development. *Genetics* **141**, 1075-1086.
- Teleman, A. A. and Cohen, S. M.** (2000). Dpp gradient formation in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Cell* **103**, 971-80.
- ten Dijke, P., Miyazono, K. and Heldin, C. H.** (1996). Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 139-45.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L. et al.** (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet* **36**, 283-7.
- Thompson, P. E.** (1959). New mutants. *Drosophila Inf. Serv.* **33**, 99.
- Tomlinson, A.** (2003). Patterning the peripheral retina of the fly: decoding a gradient. *Dev Cell* **5**, 799-809.
- Twombly, V., Blackman, R. K., Jin, H., Graff, J. M., Padgett, R. W. and Gelbart, W. M.** (1996). The TGF-beta signaling pathway is essential for *Drosophila* oogenesis. *Development* **122**, 1555-65.
- Ubbink, M., Worrall, J. A., Canters, G. W., Groenen, E. J. and Huber, M.** (2002). Paramagnetic resonance of biological metal centers. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**, 393-422.
- Venken, K. J. and Bellen, H. J.** (2007). Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*. *Development* **134**, 3571-84.
- Vincent, S., Ruberte, E., Grieder, N. C., Chen, C. K., Haerry, T., Schuh, R. and Affolter, M.** (1997). DPP controls tracheal cell migration along the dorsoventral body axis of the *Drosophila* embryo. *Development* **124**, 2741-50.
- Wappner, P., Gabay, L. and Shilo, B. Z.** (1997). Interactions between the EGF receptor and DPP pathways establish distinct cell fates in the tracheal placodes. *Development* **124**, 4707-16.
- Warren, S. T.** (1997). Polyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossing-over of HOXD13. *Science* **275**, 408-9.
- Wharton, K., Ray, R. P., Findley, S. D., Duncan, H. E. and Gelbart, W. M.** (1996). Molecular lesions associated with alleles of decapentaplegic identify residues necessary for TGF-beta/BMP cell signaling in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **142**, 493-505.
- Wharton, K. A.** (1992). Technical notes: P-Element vectors for analysis of enhancer elements. *D.I.S.* **71**, 152.
- Wharton, K. A., Ray, R. P. and Gelbart, W. M.** (1993). An activity gradient of decapentaplegic is necessary for the specification of dorsal pattern elements in the *Drosophila* embryo. *Development* **117**, 807-22.
- Wytenbach, A.** (2004). Role of heat shock proteins during polyglutamine neurodegeneration: mechanisms and hypothesis. *J Mol Neurosci* **23**, 69-96.
- Yu, K., Sturtevant, M. A., Biehs, B., Francois, V., Padgett, R. W., Blackman, R. K. and Bier, E.** (1996). The *Drosophila* decapentaplegic and short gastrulation genes function antagonistically during adult wing vein development. *Development* **122**, 4033-44.

VI. Anhang

VI.1 Anhang zu Teil C: Historische Abfolge alternativer Versuche der Klonierungsstrategie zur Erstellung der Polyalanin und Polyglutamin Konstrukte

VI.1.1 Erstellen eines Polyglutaminakzeptorvektors aus pDrive-Selbstligat

Der erste Zwischenvektor für die Subklonierung von Polyglutaminhomopolymeren, der konstruiert wurde, war pDrive[BBstEIIIN] (B = BssHII, N = NheI), ein Derivat des selbstligierten pDrive, genannt pDrive[SL] (der Vektor pDrive selbst ist nur in einer linearisierten und *T-tailed* Form kommerziell erhältlich). Aufgrund seiner Restriktionsschnittstellenkonfiguration, besonders der Absenz einer BssHII Schnittstelle, erschien dieser Vektor, der eigentlich ein Nebenprodukt eines anderen Experimentes war, dazu gut geeignet. Mit einem BssHII und NheI Doppelverdau sollte das subklonierte Fragment später ausgeschnitten und umkloniert werden. Ein Vektor mit MCS-interner BssHII wäre demnach nicht geeignet gewesen. Dennoch musste auch der pDrive Polylinker erst manipuliert werden. Der Vektor wurde dazu mit XhoI und XbaI geöffnet und ein doppelsträngiges Oligomer, durch Annealing der beiden Oligomere 741 und 742 gebildet, integriert. Dieses trug zwischen XbaI und XhoI die für den Einbau und die spätere Umklonierung der Polyglutamintrakte nötige einzigartige Schnittstelle BstEII (Abbildungen 59, 60).

Nach der Transformation wurde der Insertionserfolg dieses Oligomers durch Restriktionsverdau mit BstEII überprüft. Das Enzym schneidet den Originalvektor ohne Insertion nicht. Da sich aus technischen Gründen die Strategie zum Einbau der Homopolymere in den Org-1 C-Terminus änderte, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, konnte dieser erfolgreich hergestellte Vektor nicht weiter verwendet werden.

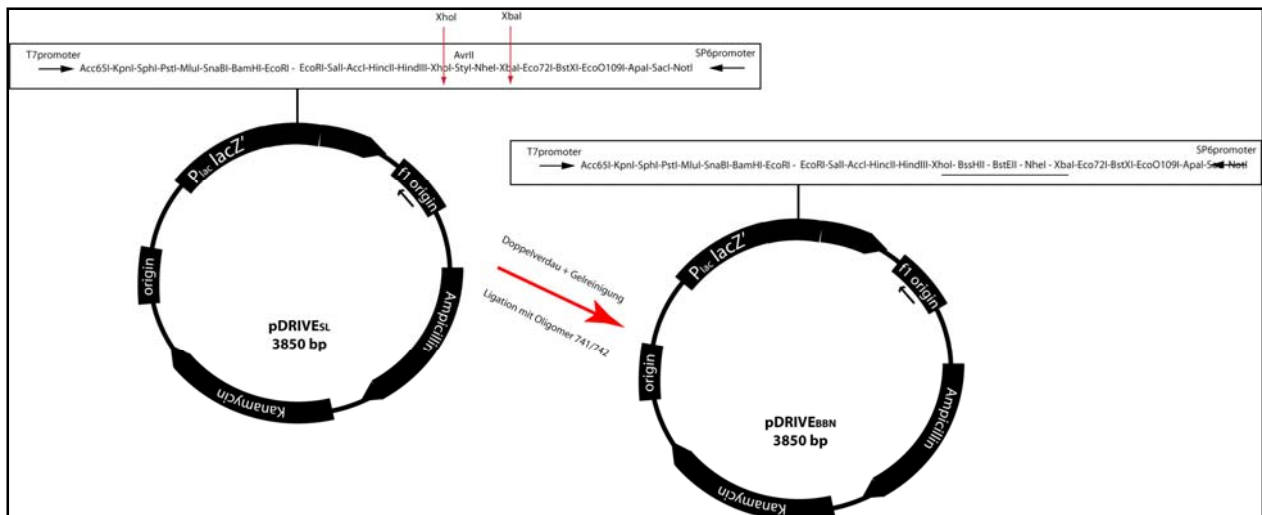


Abbildung 59: Schematische Darstellung über die Konstruktion des Zwischenvektors pDrive[BBStEIIN] aus einem pDrive[SL] (Selbstligat).



Abbildung 60: Sequenz des Oligos 741/742, das den Einbau der Polyglutaminhomomere in pDrive[SL] ermöglicht. In rot ist die XbaI Sequenz gekennzeichnet, in Blau die BssHII Schnittstelle. Des Weiteren folgen die Sequenzen für BstEII (grün), NheI (braun) und XhoI in violett.

VI.1.2 Erstellen eines T-Tail Zwischenvektors zur Subklonierung der Homoglutamin-polymere

Eine andere Strategie, die im Wesentlichen die Polymerinsertionsreaktion vereinfachen sollte, erforderte einen linearen Zwischenvektor mit T-Überhängen. Der Standardvektor pDrive konnte nicht gewählt werden, da nach einer A/T-Ligation des Homopolymers ein Herausschneiden des Fragmentes ohne Mitnahme von zu Leserasterverschiebungen führenden Vektorrestsequenzen nicht möglich gewesen wäre. Deshalb wurde dazu der Basisvektor pSK[ORG1CΔBssHII/Nhe →BstEII M3xFLAGC13stopX] ausgewählt. Es wurde ein weiteres Oligo aus den Einzelsträngen 778 und 779 erzeugt, das eine StuI Schnittstelle enthielt, und in den mit BstEII geöffneten Vektor ligiert (Abbildungen 61, 62 63). Die BstEII Schnittstelle wurde vorher bereits an der richtigen Stelle, nämlich bei der Deletion der Q-reichen Region, wie weiter oben beschrieben, in den Org1-C-Terminus eingebaut.

Der Vektor pSK[ORG1CΔBssHII/Nhe →BstEII StuI BstEII M3xFLAGC13stopX], der daraus resultierte, wurde mit StuI geöffnet. StuI erzeugt sogenannte stumpfe Enden, an die durch das Enzym Terminale Nukleotid-Transferase (TNT) in Anwesenheit von ddTTP (DideoxyTTP)

Einzel-T-Überhänge angehängt werden konnten. Die durch Klenow-Enzym aufgefüllten und durch Taq-Polymerase mit A-Überhängen versehenen Glutaminhomopolymere sollten so direkt in den modifizierten ORG1 C-Terminus eingefügt werden. Außer der Konstruktion des Zwischenvektors pSK[ORG1CΔBssHII/Nhe →BstEIIStuIBstEIIIM3xFLAGC13stopX] wurde diese Strategie aber nicht weiterverfolgt, da sie sich als nicht effizient erwies. Durch A/T-Klonierung ist keine Richtungsvorgabe möglich, weshalb zu erwarten war, dass nur etwa die Hälfte der Insertionen in der gewünschten Richtung vorliegen würde. Nachträglich, ohne zu sequenzieren, festzustellen, welcher der Polyglutaminklone die Insertion in der richtigen Richtung trägt, war schlecht möglich. Letztlich kam eine andere Strategie zum Einsatz. Diese war für beide Experimente, Homoglutaminpolymere und Homoalaninpolymere gleichermaßen dienlich.

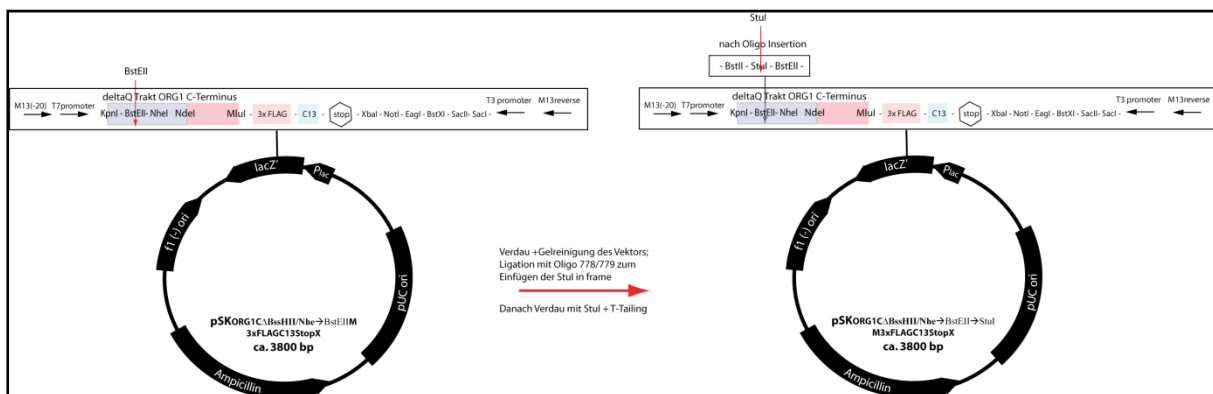


Abbildung 61: Herstellung des StuI Derivat von pSK[ORG1CΔBssHII/Nhe →BstEIIIM3xFLAGC13stopX] zur Konstruktion des T-Überhang Vektors um A-getailte Polyglutamintrakte subzuklonieren.



Abbildung 62: Teil 1 zeigt die Sequenz des Oligos 778/779 zur Insertion einer StuI Schnittstelle in BstEII des ΔQ Bereichs des Org1 C-Terminus. In rot sind die beiden BstEII kompatiblen Enden gezeigt. In blau die neue StuI Schnittstelle. Teil 2 zeigt die mit StuI geschnittene und T-getailte Sequenz, in die A-getailte Homopolymere eingesetzt werden können.

ggg	tca	cag	gga	gta	ggt	caa	cag	cag	caa	cag	caa	caa	acc	tca	gtc	aac	aa	gtca	cct
G	S	Q	G	V	G	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	T	S	V	N	K	S	P

Abbildung 63: Nach dem A/T Tailing ist wird die Sequenz immer noch korrekt translatiert. In rot ist die für Homopolyglutamin kodierende inserierte Sequenz zu sehen, in blau die Stul Schnittstelle. Grün ist das angehängte T zu sehen. Die zweite Zeile zeigt die Aminosäuresequenz.

VI.1.3 Erstellen eines pSK-Dralll Derivates zur erfolgreichen Subklonierung der Glutaminhomopolymere

Eine weitere Strategie sah vor, ein neues doppelsträngiges Oligo aus den Strängen 788 und 789 über KpnI und MluI in den Vektor pSK[KNM3xFLAGC13stopX] einzusetzen. Zwischen diesen beiden Restriktionserkennungssequenzen trug es die Schnittstellen BstEII, Dralll, BstEII. Über die asymmetrische und teildegenerierte Erkennungssequenz des Enzyms Dralll ist ein richtungsgebundenes und direktes Klonieren der Polymertrakte möglich.

Der Vektor pSK besitzt allerdings bereits eine eigene Dralll Schnittstelle im f1 origin außerhalb des Polylinkers. Diese musste zuerst eliminiert werden. Dazu wurde der Vektor mit Dralll geöffnet und ein kurzes Oligomer, bestehend aus den Einzelsträngen 765 und 766, das zur Selektion des richtigen Klones auch eine BglII Site trug, eingebaut (Abbildung 64). Durch die Insertion dieses Oligomers wird die Dralll Erkennungssequenz zerstört. Eine Mutation im f1 origin, der nur für die Einzelstrangreplikation notwendig ist, war nicht als problematisch erwartet worden. Da BglII das pSK-Derivat nicht schneidet, wäre außerdem eine positive Selektion der Klone nach der Transformation möglich gewesen. Allerdings gab es nach mehrfachen Versuchen keine einzige Transformante. Diese Strategie wurde deshalb ebenfalls eingestellt, und das aus den Oligos 788 und 789 generierte KpnIBstEII-Dralll-BstEII-MluI-Oligo statt in pSK[KNM3xFLAGC13stopX] in pAc5.1/V5-His-A eingebaut, was der anfangs beschriebenen aktuellen Strategie an dieser Stelle entspricht.

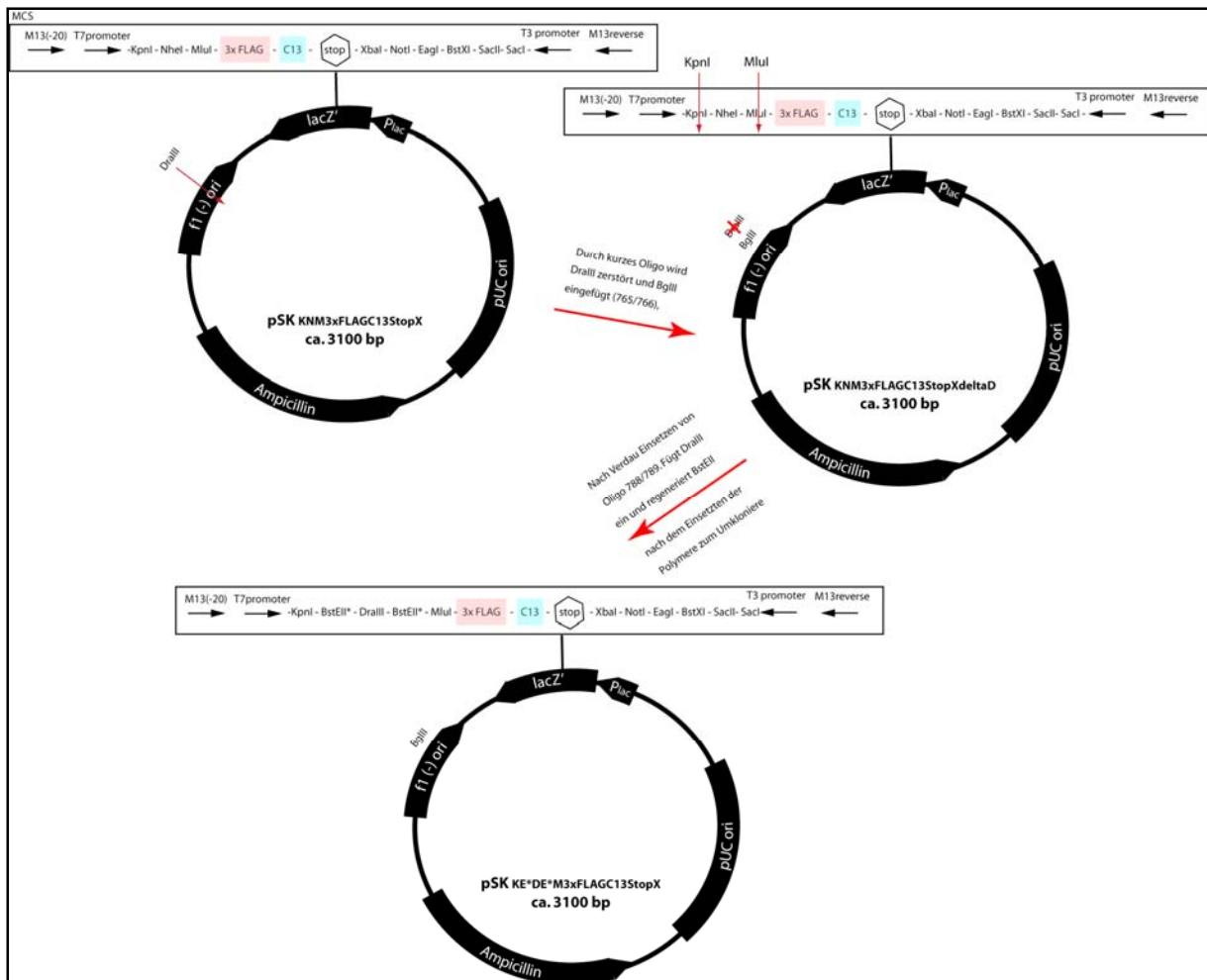


Abbildung 64: Geplante Strategie zum Erstellen eines Vektors, in dem die Homoglutaminpolymere zwischenkloniert werden können. Ein Oligo zerstört die Vektoreigene DralIII Site im f1 origin. Danach wird in den Polylinker über KpnI und MluI eine BstEII-DraIII-BstEII Sequenz eingefügt (siehe Abb13B). Über die DraIII Klonierung sollten die Homopolymere direkt eingefügt werden, und die BstEII Site an beiden Enden dabei regeneriert werden. Dies ermöglichte das Umklonieren in die bereits dafür modifizierte *org1* Sequenz. Da pSK[KNM3xFLAGC13stopXΔDraIII] nicht erzeugt werden konnte, wurde der letzte Schritt nicht in die Tat umgesetzt.

VI.1.4 Adaptorbasiertes Subklonieren der Glutaminpolymere

Da die beiden Enden des Polymers, nicht direkt zur BstEII Sequenz kompatibel sind, sollten zwei Adaptoroligomere synthetisiert werden, die ein gerichtetes Einbauen ermöglichen (Abbildung 65, 66, 67) Diese wurden zunächst phosphoryliert und mit dem Polymergemisch in einer 3-Komponentenligation ligiert, bevor der BstEII geöffnete und dephosphorylierte Vektor pDrive[BBstEIIIN] zugegeben wurde. Die Reaktion wurde auch in einer 4-Komponentenligation direkt angesetzt. Beide Versuche führten aber nicht zum Erfolg. Nach Transformation und Charakterisierung der wenigen, erhaltenen Kolonien durch Kolonie PCR, zeigte die Analyse auf dem 8% Polyacrylamidgel lediglich Produkte der Größe des Kontrollansatzes (Vektor ohne Fragment). Daraufhin wurde nach einer Strategie gesucht, die die Adaptoren eliminiert und so zur Vereinfachung der Ligationsreaktion beiträgt.

18-mer zur Erstellung von Homopolyglutamintrakten
(Adaptorstrategie)

CAA	CAG	CAG	CAA	CAG	CAA	oligo	459
	GTC	GTC	GTT	GTC	GTT	GTT	oligo 460

Abbildung 65: Basenfolge der Oligomere zur Erstellung der Homopolymertrakte. Die Sequenz codiert jeweils für sechs gleiche Aminosäuren. Die Überhänge sind so gewählt, dass Ligation jeweils nur in einer Orientierung möglich ist.

Polyglutaminadaptor I) rechts und II) links

I)	CAA	CAG	CAG	CAA	CAA	CAG	GG	oligo	737
		GTC	GTC	GTT	GTT	GTC	CCC AGT G	oligo	738
II)	G	TCA	CCT	CAG	CAG	CAA	CAA	CAG	oligo 735
		GA	GTC	GTC	GTT	GTT	GTC	GTT	oligo 736

Abbildung 66: Basenfolge der BstEII-Glutamin-Oligo-Adaptoren. Beide sind so konstruiert, dass ein Überhang (hier rot markiert) an die Polymere ligiert werden kann, der zweite Überhang an die BstEII-Schnittstelle im Vektor (blau markiert). Der schwarze Sequenzteil codiert ebenfalls für Glutamin. Da asymmetrische Schnittstellen verwendet werden, um das Insert in der richtigen Leserichtung zu inserieren, ist für jede Seite ein eigener Adaptor nötig.

18-mer zur Erstellung von Homopolyalanintrakten
(Adaptorstrategie)

GCA GCA GCT GCT GCA GCA	oligo 769
CGT CGA CGA CGT CGT CGT	oligo 770

Abbildung 68: Basenfolge der Oligomere zur Erstellung der Homopolymertrakte. Die Sequenz codiert jeweils für sechs gleiche Aminosäuren. Die Überhänge sind so gewählt, dass sie eine Ligation jeweils in nur einer Orientierung zulassen.

Polyalaninadaptor I) rechts und II) links

I)	GCA GCC GCA GCT GCG GCT GGA	oligo 773
	CGG CGT CGA CGC CGA	oligo 774
II)	GCA GCT GCT GCA GCA	oligo 771
	CCT CGT CGA CGA CGT CGT CGT	oligo 772

Abbildung 69: Basenfolge der für Homopolyalanin kodierenden Oligoadaptoren. Beide sind so konstruiert, dass ein Überhang (hier rot markiert) an die Polymere ligiert werden kann, der zweite Überhang an die DraIII Schnittstelle im Vektor (blau markiert). Der schwarze Sequenzteil codiert ebenfalls für Alanin. Da asymmetrische Schnittstellen verwendet werden, um das Insert in der richtigen Leserichtung zu inserieren, ist für jede Seite ein eigener Adaptor nötig.

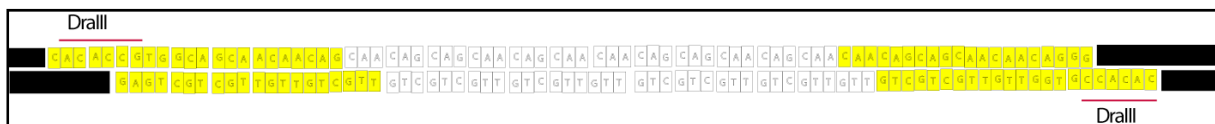


Abbildung 70: Schematische Gesamtdarstellung der Strategie, mit Hilfe zweier Adaptoren die Polymere gerichtet in einen Zielvektor über die asymmetrische Schnittstelle DraIII zu klonieren. Gelb markiert sind die Adaptoren, weiß ist ein Beispiel für ein Polyalanin-Dimer dargestellt. Schwarz ist der Vektor gezeigt.

VI.2 Montage der Einzelsequenzen über die Deletion der URR bei der Linie A2

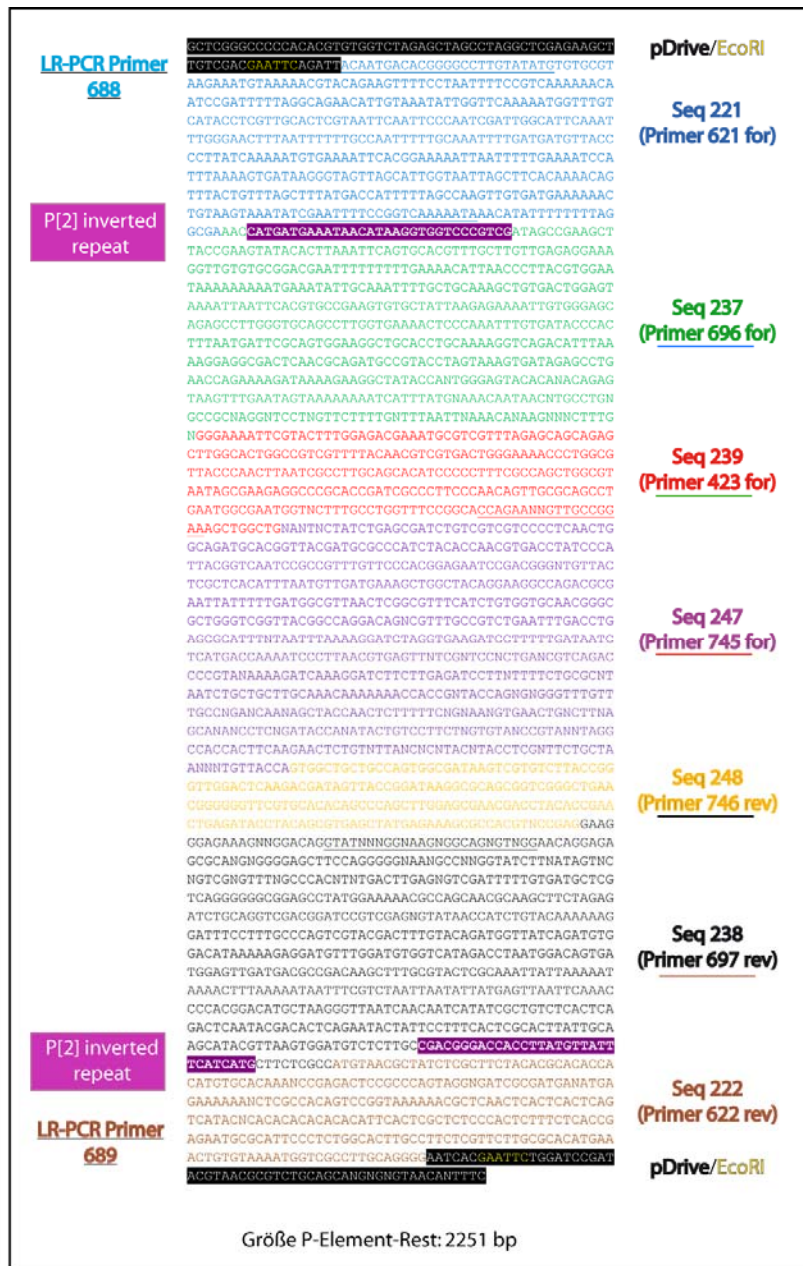


Abbildung 71: Die Abbildung zeigt alle sieben sich überschneidenden Teilsequenzen zu einem Bild zusammengesetzt. Auf Grund schlechter Sequenzqualität stehen an manchen Positionen N. Da die einzelnen Sequenzen aber überlappen, war ein Alignment dennoch unproblematisch. Die schwarzen Balken zeigen die flankierenden Vektorsequenzen des Subklons pDrive[A2-LR-PCR]. Die beiden Sequenzierprimer 622 und 621 liegen im Polylinker des Vektors. Blau (221) und braun (222) ist die genomische Sequenz zu sehen, die P2 flankiert. Die violetten Balken zeigen die charakteristischen P-Elementenden, die beide noch vorhanden sind. Farblich abgegrenzt sind die zur Montage der Abbildung verwendeten Sequenzen, deren Originale weiter unten im Anhang zu sehen sind. Die Größe der Sequenz zwischen den P-Elementenden hat nur mehr eine Größe von ca. 2,3 kb. Das zweite P-Element P[3] ist nicht mehr zu sehen (wenn das inverted repeat nicht von diesem stammt). Die genomische Sequenz der *omb* URR zwischen den transposablen Elementen ist jedenfalls deletiert.

VI.3 Liste der verwendeten Oligos

Auf den folgenden Seiten findet sich eine Liste aller verwendeten Oligomere.

Nr.	Sequenz	Projekt/Zweck	Name
363	CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT	inverse PCR am 3' Ende von placW (aus BDGP)	Pry1
364	CTT GCC GAC GGG ACC ACC TTA TGT TAT T	inverse PCR am 3' Ende von placW (aus BDGP)	Pry2
365	5'- AAA TCA ACT GCA ACT ACT GAA -3	Sequenzieren und PCR von pUAST MCS	pUAST-down position 5704
366	5'- TCT CTG TAG GTA GTT TGT CCA - 3'	Sequenzieren und PCR von pUAST MCS	pUAST-up position 5540
447	cgcgccaaaaaacgaataaagcca	Omb URR del Projekt	ombP3dist1
448	agccattccctctcgctcacactgc	Omb URR del Projekt	ombP3prox1
449	acacggggccttgatatgtgtcg	Omb URR del Projekt	ombP2dist1
450	aaatcgaaacttcaccaattttccaa	Omb URR del Projekt	ombP2prox1
451	CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT	P-element ampl primer; (BDGP)	plac1
452	ACA CAA CCT TTC CTC TCA ACA A	P-element end amplification and sequ. primer.	pSp1
459	CAA CAG CAG CAA CAG CAA	Org-1 PolyA/Q Projekt	Qn-oligo-1 (reordered as 857)
460	TTG TTG CTG TTG CTG CTG	Org-1 PolyA/Q Projekt	Qn-oligo-2
477	CAA TCA TAT CGC TGT CTC ACT CA	PCR primer aus dem 3' ende von PGawB oder PlacW	Pry4
486	ACA CAA AGC CGC TCC ATC AG	seq primer pAc5 constructs	Ac5 forward primer (rev primer: 777)
507	CTTTTGC GCCTTAAAGTGCTTCTCG	Omb[P6] Projekt	ombP6-36520down
508	GAG TGT TGA GTT TCT TTC GCG GAG G	Omb[P6] Projekt	ombP6-37607up
509	CTCTGTCGCTTTTGTGCGCTGTCGT	Omb[P6] Projekt	ombP6-37807down (funktioniert nicht:539 benutzt)
510	TAG TTG GGG TCG CCG CTT GAG ATT T	Omb[P6] Projekt	ombP6-38801up
511	TAGGTT CAGCAGGA ACTTCTCGAGC	Omb URR del Projekt	usofombP2-286802down
512	TGG GAA TTG AAT TAC GAG TGC AAC G	Omb URR del Projekt	usofombP2-287669up
513	ACACACACATTCACTCGCTCTCCCA	Omb URR del Projekt	dsofombP3-22083down
514	ACC AAT TTC GGG TAA AAG GAG CCA A	Omb URR del Projekt	dsofombP3-22989up
529	CGCCGGAAGTCGAACAATTCA	Qd[For] Projekt	Qd111657FOR
530	CAGCGCACACAAACACCGACAT	Qd[For] Projekt	Qd111861FOR
531	CGCTTACACAATGTTGGCGGGT	Qd[For] Projekt	Qd112052FOR

Nr.	Sequenz	Projekt/Zweck	Name
532	TTATTCAGTGGCCGAAAAATGTCCA	Qd[For] Projekt	Qd112385FOR
533	CCAAACCCCTTTATCATGCTGCTGT	Qd[For] Projekt	Qd112555FOR
534	TGA AAT TGT TCG ACT TCC GGC G	Qd[For] Projekt	Qd111678REV
535	ATG TCG GTG TTT GTG TGC GCT G	Qd[For] Projekt	Qd111882REV
536	ACC CGC CAA CAT TGT GTA AGC G	Qd[For] Projekt	Qd112073REV
537	TGG ACA TTT TTC GGC CAG TGA ATA A	Qd[For] Projekt	Qd112409REV
538	ACA GCA GCA TGA TAA AGG GGT TTG G	Qd[For] Projekt	Qd112579REV
539	GCCCGTCGTCGTTTCTCGTCGT	Omb[P6] Projekt	OMBP6-37846DOWN
542	CACGCTTTGCCACGCTTTGTTGACA	Qd[For] Projekt	QD111750FOR
543	AAGGTTGGACACAGCACAGCAGCCT	Qd[For] Projekt	Qd111798For
580	ACT GTG CGT TAG GTC CTG TTC ATT GTT	primer für iPCR von P-Elementen	plac4
619	GTA AAA CGA CGG CCA GT	sequencing primer for Quiagen pDriv etc	M13 forward-20
620	AAC AGC TAT GAC CAT G	sequencing primer for Quiagen pDrive etc	M13 reverse
621	CAT TTA GGT GAC ACT ATA G	sequencing primer for Quiagen pDrive etc	sp6 promoter
622	GTA ATA CGA CTC ACT ATA G	sequencing primer for Quiagen pDrive etc	t7 promoter
623	TAT TAT CCG CGG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG	for amplification of EGFP from ClonTech- derived vector 2xEGFP	GFP-down-SacII-b
624	TAT TAT CCG CGG CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC	for amplification of EGFP from ClonTech- derived vector 2xEGFP	GFP-up-SacII-b
625	GTGGACCGTGGCTGGCGAGTC	Dpp-GFP fusion project.	dpp-Agel-down
625A	GTGGACCGTGGCTGGCGAGTC NEUSYNTHESE	Dpp-GFP fusion project.	dpp-Agel-down
626	AAG AAA ATG TCA GGC CCT TGC G	QdFor proj	Qd-111318
637	CG GCA GGT CCG CGG GTC GTC GTG GTT GCC ACC GCC CAG	Dpp-GFP fusion project. corrected Saclup primer	dpp-up-SacIIbcor
638	GCTGGAATCGTTTGCCATTTT	for QdFor iPCR	Qd-for-lend-iPCRfor2
639	AGCT T ATCCG ACCGGT GTTAC C	Dpp-GFP fusion project	Agel-top
640	TCGA G GTAAC ACCGGT CGGAT A	Dpp-GFP fusion project	Agel-bottom
641	TGG CTG AAA AGG AGG CGT GGN NNN NNN NNN	universal fast walking project;	QdFor-UFW-497 prev580
642	GGC TGC TGG GGA AGC TAA AGN NNN NNN NNN	universal fast walking project;	QdFor-UFW-528 prev581

Nr.	Sequenz	Projekt/Zweck	Name
678	CGTGCCCTGGCCCACCCTCG	internal seq primers for EGFP DPP-GFP proj	intEGFPfor
679	GTGCCCCAGGATGTTGCCGT	internal seq primers for EGFP DPP-GFP proj	intEGFPprev
688	ACAATGACACGGGGCCTTGTATATG	Long range PCR omb URR-del-proj	ombupstr820for
689	CCCCTGCAAGGCGACCATTTTACAC	Long range PCR omb URR-del-proj	ombupstr29925rev
690	ATTCTCCCGACAGCGAGGCAATTAG	Long range PCR omb URR-del-proj	ombupstr3754rev
691	CGGGTCGATTGAAAGGGAAATACT	Long range PCR omb URR-del-proj	ombupstr6869rev
692	GAATTGCCCGAGTCCCTGTTGTCTA	Long range PCR omb URR-del-proj	ombupstr10144rev
693	GAGCCACCGCCACGGAGACAGTTTA	Long range PCR omb URR-del-proj	ombupstr26951for
694	ACGTTGCCACTGGCACTGCCATGAT	Long range PCR omb URR-del-proj	ombupstr23344for
695	TCGCCAGTCTCCGGACTCCAGTCTC	Long range PCR omb URR-del-proj	ombupstr19984for
696	CGA ATT TTC CGG TCA AAA ATA	Omb URR del Projekt	ombupstr1200for
697	TGG GCG GAG TCT CGG GCT TGT	Omb URR del Projekt	ombupstr29729down
699	GCTGCCGCTTGCCGCCTCC	Construction of dpp-GFP fusion.	dpp-dup-1b-discriminator
700	CGCGGGTCGTCGTGGTTGC	Construction of dpp-GFP fusion.	dpp-del-1b-discriminator
702	TGGTTCTTGCGCCTCGTTC	Construction of dpp-GFP fusion.	dpp-myc2-1b-discriminator
707	CGCCAACGCCAAGGCCATCA	Construction of dpp-GFP fusion.	dpp-1a-619for
725	TCCTTGTAATCGATGTCATGATCTTTA TAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTC ACGCG	Org-1 PolyA/Q Projekt	31-88up
726	atgacatcgattacaaggatgacgatgacaaga tgatcgaccgaatagctacatagatc	Org-1 PolyA/Q Projekt	70-129down
727	TGAAGCTCTAGACCCTTAGCGCGGCA CCAGATCTATGTAGCTATTTCGG	Org-1 PolyA/Q Projekt	111-158up
728	CG CGC atg aag GGG TCA CCT tac cag G	Org-1 PolyA/Q Projekt	BssHII-BstEII-Nheltop
729	CTAGC CTG GTA AGG TGA CCC CTT CAT G	Org-1 PolyA/Q Projekt	BssHII-BstEII-Nhelbot
730	AGTTAGGTACCTTGAACGCTAGCCAA CAGACGCGTgactacaaagacca	Org-1 PolyA/Q Projekt	1-49down2
731	tac cag gct agc gtg cag tcg cat ccc cta acg	Org-1 PolyA/Q Projekt	org1-Nheldown
732	CTG CAC GCT AGC CTG GTA TGC ATG ATG ATA GCT GCC	Org-1 PolyA/Q Projekt	org1-Nhelup
733	TGTGT ACG CGT GCG CGG CAC CAG ATC TAT	Org-1 PolyA/Q Projekt	ORG-CDus-Mlul
734	agcagcagcagccgtagc	Org-1 PolyA/Q Projekt	ORG-1998down

Nr.	Sequenz	Projekt/Zweck	Name
735	G TCA CCT CAG CAG CAA CAA CAG	Org-1 PolyA/Q Projekt	BstEII-CAXadaptop
736	TTG CTG TTG TTG CTG CTG AG	Org-1 PolyA/Q Projekt	BstEII-CAXadapbot
737	CAA CAG CAG CAA CAA CAG GG	Org-1 PolyA/Q Projekt	CAX-Bstelladaptop
738	G TGA CCC CTG TTG TTG CTG CTG	Org-1 PolyA/Q Projekt	CAX-Bstelladapbot
741	CTAGA GAT GCG CGC ATG AAG GGG TCA CCT TAC CAG GCT AGC GAT C	Org-1 PolyA/Q Projekt	XbaBBNXhoTOP
742	TC GAG ATC GCT AGC CTG GTA AGG TGA CCC CTT CAT GCG CGC ATC T	Org-1 PolyA/Q Projekt	XbaBBNXhoBOT
743	CGCGACACCTTCAGCTTGTCG	Org-1 PolyA/Q Projekt	org1-2247up
744	GTCATAGGTACCAACGATGTAACCAC TGGCGGTGG	Org-1 PolyA/Q Projekt	org1-1420down
745	CCAGAAGCGGTGCCGAAAG	seq of omb us del gap	placW772for
746	ACCCTGCCGCTTACCGGATA	seq of omb us del gap	placW10105rev
763	G TACGAT GAATTC GATAT GCGGCCGC TAATC GGTACC GATAT GGTCACC TACATC GCTAGC GATTAC CACGGAGTG GATGAT ACGCGT AATGAT TCTAGA AAGGTT T	Org-1 PolyA/Q Projekt	deltaKpn-Mlu-top
764	CGCGA AACCTT TCTAGA ATCATT ACGCGT ATCATC CACTCCGTG GTAATC GCTAGC GATGTA GGTGACC ATATC GGTACC GATTA GCGGCCGC ATATC GAATTC ATCGTA CGTAC	Org-1 PolyA/Q Projekt	deltaKpn-Mlu-bot
765	GGCAGATCTCGTTAC	Org-1 PolyA/Q Projekt	DraIII-del-top
766	ACGAGATCTGCCGTA	Org-1 PolyA/Q Projekt	DraIII-del-bot
767	CT AGC GTG CAG CAC GGA GTG CCG CGC A	Org-1 PolyA/Q Projekt	Nhe-Dra-Mlu-adap-top
768	CGCGTGCGCGGCACTCCGTGCTGCA CG	Org-1 PolyA/Q Projekt	Nhe-Dra-Mlu-adap-bot
769	GCA GCA GCT GCT GCA GCA	Org-1 PolyA/Q Projekt	polyAlatop
770	TGC TGC TGC AGC AGC TGC	Org-1 PolyA/Q Projekt	polyAlabot
771	GCA GCT GCT GCA GCA	Org-1 PolyA/Q Projekt	Dra-Ala-adap-lefttop
772	TGC TGC TGC AGC AGC TGC TCC	Org-1 PolyA/Q Projekt	Dra-Ala-adap-leftbot
773	GCA GCC GCA GCT GCG GCT GGA	Org-1 PolyA/Q Projekt	Dra-Ala-adap-righttop
774	AGC CGC AGC TGC GGC	Org-1 PolyA/Q Projekt	Dra-Ala-adap-rightbot
777	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	pcDNA3 seq primer	pcDNA3.1/BGH-rev forward primer ist 486

Nr.	Sequenz	Projekt/Zweck	Name
778	G TCA CAG GGA GT AGG CCT CA GT CAA CAA	Org-1 PolyA/Q Projekt	BstEII-Stul-top
779	GTGACTTGTTGACTGAGGCCTACTCC CT	Org-1 PolyA/Q Projekt	BstEII-Stul-bot
784	TGC AGC AGC TGC TGC TGC	Org-1 PolyA/Q Projekt	polyAla-bot2
785	CT AGC GTG CAG CAC GCA GTG CCG CGC A	Org-1 PolyA/Q Projekt	Nhe-Dra-Mlu-adap-top2
786	CGCGT GCG CGG CAC TGC GTG CTG CAC G	Org-1 PolyA/Q Projekt	Nhe-Dra-Mlu-adap-bot2
787	CTG TTG CTG CTG TTG TTG	Org-1 PolyA/Q Projekt	polyQ-bot2
788	CGGTCACCACCAAGTGGTCACCA	Org-1 PolyA/Q Projekt	KpnE-DraIII-EMLu-top
789		Org-1 PolyA/Q Projekt	KpnE-DraIII-EMLu-bot
790	c gat aac aat ccg ttt gtg aag ggc ttt cgt gat act gg	mutagenesis primer for the introduction of A508V into OMB	OMB-A508V- uppermutprimer
791	CC AGT ATC ACG AAA GCC CTT CAC AAA CGG ATT GTT ATC G	mutagenesis primer for the introduction of A508V into OMB	OMB-A508V- lowermutprimer
792	CGGGTGAGCAATGGATGCAGAAAAGT TGTTTCATTTTCATGAATTTAAATTGAC CAAC	mutagenesis primer for the introduction of K431E into OMB Ce Tbx3 olf adapt mut)	OMB-K431E- uppermutprimer
793	GTTGGTCAATTTTAATTCATGAAATG AAACAACCTTCTGCATCCATTGCTCAC CCG	mutagenesis primer for the introduction of K431E into OMB Ce Tbx3 olf adapt mut	OMB-K431E- lowermutprimer
796	CGGGTGAGCAATGGATGCAGAAAAGT TGTTTCATTTTCATGGATTTAAATTGAC CAAC	mutagenesis primer for the introduction of K431G into OMB Ce Tbx3 olf adapt mut	OMB-K431G- uppermutprimer
797	GTTGGTCAATTTTAATCCATGAAATG AAACAACCTTCTGCATCCATTGCTCAC CCG	mutagenesis primer for the introduction of K431G into OMB Ce Tbx3 olf adapt mut	OMB-K431G- lowermutprimer
798	CGGGTGAGCAATGGATGCAGAAAAGT TGTTTCATTTTCACCGTTAAATTGAC CAAC	mutagenesis primer for the introduction of K431G into OMB Ce Tbx3 olf adapt mut)	OMB-K431R- uppermutprimer
799	GTTGGTCAATTTTAACCGTGAAATG AAACAACCTTCTGCATCCATTGCTCAC CCG	mutagenesis primer for the introduction of K431G into OMB Ce Tbx3 olf adapt mut	OMB-K431R- lowermutprimer
804	TACGATCCTGAACTCGATGTACAAGT ACCAGCCGCGTTTC	introduction of H454Y mutation into OMB T domain in ATCUN Cu/Ni-binding motif	omb-H454Y-upmutprmr
805	GAAACGCGGCTGGTACTTGTACATC GAGTTCAGGATCGTA	introduction of H454Y mutation into OMB T domain in ATCUN Cu/Ni-binding motif	omb-H454Y-lowmutprmr
810	TGGGGAAAAATATGAGTGTGCGCAG TGTGGACGAATTCGA	mutation of putative Sd BS in KH WRE	Sd-BS-mutfor
811	TCGAATTCGTCCACACTGCGCACACT CATATTTTCCCCA	mutation of putative Sd BS in KH WRE	Sd-BS-mutrev
812	GGTTTTGGTTGGGGCCCGAAAAT CGTCCGAGAAGTTTG	mutation der 2. TCF-BS ("S7") in 164bp WRE	WRE-TCF-S7mut-for
813	CAAACCTCTCGACGATTTTCGGGCC CCCAAACCAAAACC	mutation der 2. TCF-BS ("S7") in 164bp WRE	WRE-TCF-S7mut-rev
814	ACACCTGGGGAAAAATATGTACATG AAATGTGTGGACGAA	mutation in putative TBE in 164 bp WRE	TBE-WREmutfor
815	TTCGTCCACACATTTTCATGTACATATT TTTCCCAGGTGT	mutation in putative TBE in 164 bp WRE	TBE-WREmutrev

Nr.	Sequenz	Projekt/Zweck	Name
818	AGACTGGATCCGCAATAAAGTGAAT ATGGCGAAGTA	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis XIII,35-1	us-omb30012for
819	AGACTGGATCCCCGTGTCCCGCCT TTGTAGTTCT	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis XIII,35-1	us-omb34157rev
820	AGACTGGATCCTTTTGGGGTTCCTTT TTCGCCAGAA	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis XIII,35-2	us-omb33785for
821	AGACTGGATCCCAAATGACCAACAC GCGAGATAAGA	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis XIII,35-2	us-omb37721rev
822	AGACTGGATCCACACATACACATATA CCCGGACTTT	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis XIII,35-3	us-omb37276for
823	AGACTGGATCCAGATTTAACCTTGT GCCGCATTT	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis XIII,35-3	us-omb41091rev
824	AGACTGGATCCACAAAGAATGGGG CAAGATAC	subcloning of Sivasankaran's eye enhancer pomb19.	omb-TU-22265for
825	AGACTGGATCCGAGGACAAAGGCTT ACCGAACA	subcloning of Sivasankaran's eye enhancer pomb19.	omb-TU-23317rev
826	AGACTGGATCCTCGCACTCACCGTTC GCCAAAG	subcloning of Sivasankaran's eye enhancer pomb19.	omb-TU-23053for
827	AGACTGGATCCCACTCAATTAACGC GATGCAG	subcloning of Sivasankaran's eye enhancer pomb19.	omb-TU-25398rev
828	AGACTGGATCCTTTGCACCTTCCACC GCTATTT	subcloning of Sivasankaran's eye enhancer pomb19.	omb-TU-25137for
829	AGACTGGATCCCTGGCAGAGGCAGA GCGTGTA	subcloning of Sivasankaran's eye enhancer pomb19.	omb-TU-25857rev
830	AGACTGAATTGCCTGAACCCGAACA GCGATTG	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis pomb24	omb-TU-36963for
831	AGACTGAATTCTAATGAGGGATTGG GCGAAGTA	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis pomb24	omb-TU-43864rev
832	TGTGCTCTCCCCTCAACGAGTG	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis pomb27	omb-TU-12226for
833	GACACCTGGCCAGACGTATTCC	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis pomb27	omb-TU-17879rev
834	CTTGCGTCAAAATTGCGTTGTC	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis pomb27	omb-TU-17537for
835	ACTACTTTGGCGAACGGTGAGT	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis pomb27	omb-TU-23057rev
842	TTCAATGGCTGCGGCGTTAAA	identification of In(1)ombH31 breakpoint	ds-omb5545for
843	GAAGAGCCCATCCCGAAACTC	identification of In(1)ombH31 breakpoint	ds-omb7379rev
844	GTGCGCCAGAAGTCTTAATCC	identification of In(1)ombH31 breakpoint	ds-omb7067rev

Nr.	Sequenz	Projekt/Zweck	Name
845	CGTCAGTCAGCCAGTTCGGTC	identification of In(1)ombH31 breakpoint	ds-omb6684rev
846	GCTCAGATATCGCGCACATCC	identification of In(1)ombH31 breakpoint	ds-omb6327rev
847	CTACACAGGCGTCAACTCAAC	characterization of ombP6 deletion lines	ombP6-992for
848	ACAACAAACGACGAGAAACGA	characterization of ombP6 deletion lines	ombP6-1374rev
849	CAAGCGGCGACCCCAACTAAA	characterization of ombP6 deletion lines	ombP6-2303for
850	GCGGTGGTATTGGCGGTAGAC	characterization of ombP6 deletion lines	ombP6-3086rev
855	CGGCAAGAAAATAGCTGCGAA	for identification of H31 breakpoint by iPCR	ombH31-6603rev
856	CGTGGACTGGCTGACCGAACT	for identification of H31 breakpoint by iPCR	ombH31-6672for
858	GCA GCA GCT GCT GCA GCA	Org-1 PolyA/Q Projekt	polyAlatop
859	GCCATCGAAATGAGTGAACGG	for identification of H31 breakpoint by iPCR	ombH31-6641for
860	CCGTTCACTCATTTGATGGC	for identification of H31 breakpoint by iPCR	ombH31-6641rev
861	GGCCGC TA AGGCCT AT GC	Org-1 PolyA/Q Projekt	Not-Stu-Not-top
862	GGCCGCATAGGCCTTAGC	Org-1 PolyA/Q Projekt	Not-Stu-Not-top
864	CTATCAGGGCGATGGCCATTACGTG AACCATCACCC	Org-1 PolyA/Q Projekt	DrallImut-top
865	GGGTGATGGTTCACGTAATGGGCCA TCGCCCTGATAG	Org-1 PolyA/Q Projekt	DrallImut-bot

VI.4 Original-Sequenzen:

VI.4.1 Übersicht über die Original-Sequenzen des upstream deletion Projekts

<p>1 CNCNGCCGCN NGCTCGGGCC CCCACACGTG TGGTCTAGAG CTAGCCCTAGG 51 CTCGAGAAAC TTGTGCGAGA ATTCAGATTA CAATGACACG GGGCCCTTGT 101 TATGTGTGGC TAAGAAATGT AAAACAGTAC AGAAGTTTTC CTAATTTTCC 151 GTCAAAAAAC AATCCGATTT TTAGGCAGAA CATTGTAATAT ATTTGGTTCAA 201 AAATGGTTTG TCATACCTCG TTGCACTCGT AATTCATTC CCAATCGATT 251 GGCATTCAAA TTTGGGAAC TTAATTTTTT GCCAATTTTT GCAAATTTTT 301 ATGATGTTAC CCCTTATCAA AAATGTGAAA ATTCACGGAA AAATTAATTT 351 TTGAAAATCC ATTTAAAGT GATAAGGGTA GTTAGCATTG GTAATTAGTT 401 TCACAAAACA TTCTACTGTT TAGCTTTATG ACCATTTTTA GCCAAGTTGT 451 GATGAAAAAA CTGTAAAGTA ATATCGAAT TTCCGGTCAA AAATAACAT 501 ATTTTTTTTA GCGCAAAACA ATGAAAAAT AAATGNAAT NTTTGNCAAA 551 TAGNCCGAAG CTTACCGAAG TATACACTTA AATTTACAGT CAGCTTTTGC 601 TTGTTTGAGA GGGAAAGGTT GTGTGCGGAC GAATTTTTTT TTTGNAAAA 651 ATTAACCCCT TACGGGGGGA ATAAAAAAT AAATGNAAT NTTTGNCAAA 701 ATTTTTTTCN TGGNCAAGA CTGTTGNACT TG</p>	<p>1 GAAANTGTTA CNCNCNTGCT CGACAGCGGT TACGTATCGG ATCCAGAATT 51 CGTGATTCCT CTGCAAGGCG ACCATTTTAC ACAGTTTCAT GTGCCGAAGA 101 ACGAGAAGGC AAGTGCCAGA gGGAATGCGC ATTCCTGGTG AGAAAAGATG 151 GGAGAGCGAG TGAATGTGTG TGTGTGTGNG TATGACTGAG TGAGTGAGTT 201 GAGCGTTTTT TACCGGACTG TGGCGAGNTT TTTTCTCATN TCATCGCGAT 251 CNCCTACTGG GCGGAGTCTC GNNTTTGTGC ACATGTGGTG TNCGTGTAGA 301 AGCGAGNTAG CGTTNCATGG CGAGAANCNT GATGAAATAA CATATTGGTG 351 GNCCCTTNTG NAAGAGANNT CCNCTTNNC GCNNGCTNGC AATAAAGTGC 401 NNTTNTATAN GNAACCCNT TNCTGNANTC TCGTATTGGA NTNTANANCG 451 ATNACNCNT TATATNGANT GCCTGATANA NACCCTCTTT CCCTGTCCAT 501 CTNNGNNTC TNAGNNTTTT ACNACNCCN ATANTCTANA GNTAGGNGNG 551 GMANATTCCT CCTTTTAAAC ATTTTTTAT NNAGCGAANN NANANNNTGG 601 CTNNGNNTC TNAGNNTTTT ACNACNCCN ATANTCTANA GNTAGGNGNG 651 NTNGNTTCTG TTTGNCCTG ATCTAGTNTC TTCNAATGGA TTTNACCNC 701 CCCCNNACG NNTAGCTGTT TCNCTTTTTT TT</p>
<p style="text-align: center;">Sequenz 221</p> <p>1 TATTTTTTTT TGGCGAACCA TGATGAAATA ACATAAGGTG GTCCCGTCGA 51 TAGCCGAAGC TTACCGAAGT ATACACTTAA ATTCAGTGCA CGTTTGGCTG 101 TTGAGAGGAA AGGTTGTGTG CCGACGAAT TTTTGTGAA AACATTAACC 151 CTTACGTGGA ATAAAAAAA ATGAAATATT GCAAATTTTT CTGCGAAGCT 201 GTGACTGGAG TAAATTAAT TCACGTGCGG AAGTGTGCTA TTAAGAGAAA 251 ATTTGGGAG CAGAGCCTTG GGTGCAGCCT TGGTGAAGAA TCCCAAATTT 301 GTGATACCCA CTTTAATAGT TCGCAGTGA AGGCTGCACC TGCAAAAGGT 351 CAGACATTTA AAAGGAGGCG ACTCAACGGA GATGCCGTAC CTAGTAAAGT 401 GATAGAGCCT GAACCAAGAAA AGATAAAGA AGGCTATACC ANTGGGAGTA 451 CACANACAGA GTAATTTTGA ATAGTAAAAA AAATCATTTA TGNAAACAAT 501 AACNCTGCCT NGCCGNCAGG NTCCNTGTTT TTTTGNTTTA ATNAAACAN 551 AAGNNCTTT GNGGGNAAAA AATTTCTNTA CTTTGGCCGN TFCNAAAAAT 601 TGCTTTCTNC CTNAGAGCCA TNNTGANGCT TTGGCCNCT NGGGCCNNTT 651 CNCTGTTTT CNCTCNCCT TNGTTTTTC NCANCTNCC NCCCTTTTTT 701 ATAGCCGCTN TCTCTCCGT NTTCCTTTGG CCNTNGCAT TTCTTTCCN 751 TGTTHACNCA TGNTTTGCIN TCNTTCCN TCCTCTNTFC TTNCCCTTGT 801 TTNCCCTTT NCTTTNACT CNTNCTNCT ACTNCCCTTT TCCNNTTTTT 851 TTTNTTNGC ATTTNACT CCGTGNACC CGNCTCTTC TCTTTTTNCT</p>	<p style="text-align: center;">Sequenz 222</p> <p>1 GTCATGTGTG TGCCTGTaG AGCGAGATAG CGTTACATGG CGAGAAGCAT 51 GATGAAATAA CATAAGGTGG TCCCGTCGGC AAGAGACATC CACTTAACGT 101 ATGCTTGCAA TAAGTGCAGG TGAAGGAAAT AGTATCTGGA GTGTCTGATT 151 GAGCTGAGT GAGACAGCGA TATATTTGTT GATTAACGCT TAGCATCTCC 201 GTGGGTTTTG AATTAACCTA TAATATTAAT TATACGAAAT TATTTTTAAA 251 GTTTTATTTT TAATAATTTG CGAGTACGCA AAGCTGTGCG GCGTCACTAA 301 CTCCATCACT GTCCATTAGG TCTATGACAA CATCCAAACA TCCTCTTTTT 351 ATGTCCACAT CTGATAACCA TCTGTACAAA GTCGTACAGC TGGGCAAGT 401 AAATCCTTTT TTGTACAGAT GGTATACGCG TCGACGATC CTCTGCTTCC 451 CAGATCTCTA GAAGCTTGGC TTGCTGGCgT TTTTCATAg GCTCGCCCC 501 CCTGACgAGC ATCaAAAA TCgAgCTCA AgtCAAggT GCGgAAACCC 551 gCaGGACTA TAAANATaCC agggTtCC CCCTgAggC TCCCTCtgc 601 gCTCTCTgN NCCgACCCN CNNNNNCCN NATNCTNNN NNNNTNNNC 651 CNNNNNNA NNNNNNNN NNNNNNNN CNNNNNNN NNNNNNNN 701 NNNNNNNN NNNNNNNN NNNNNNNN NNNNNNNN CNNNNNNN 751 NNNNNNNN NNNNNNNN NGGATTTGGC NNNNNNNN NNNNNNNN 801 NNNNNNNN NNNNNNNN NNNNNNNN NNNNNNNN NNNNNNNN 851 NNNNNNNN NNNNNNNN NNNNNNNN NNNNNNNN NNNNNNNN 901 N</p>
<p style="text-align: center;">Sequenz 237</p> <p>1 CCCNTATGA ATANACTTGA GGGAAAAATC GACTTTTGGG GACGAAATGC 51 GTCGTTTAGA GCACGAGAGC TTGGCACTGG CCGTCTTTTT ACAAGTCTGT 101 GACTGGGAAA ACCCTGGCGT TACCAACTT AATCGCCTTG CAGCACATCC 151 CCCTTTCCGC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCGCACC GATCGCCCTT 201 CCCAACAGTT GGGCAGCCTG AATGGCGAAT GGTNCTTTGC CTGTTTCCG 251 GCACCAAGAN NGTTGGCCGA AAGCTGGCTG NANTNCAATC TTNNTGANGC 301 CAANNCTNT TCCTCTCNCN AAATGNTAN TGNACNNTTT ANGATNCGCC 351 NATCTACTTC NNTNANATNN ATTNCAATGC AGGTN</p>	<p style="text-align: center;">Sequenz 238</p> <p>1 GCNTATCTGA GCGATCTGTC GTCGTCCTCC CAACTGGCAG ATGCACGGTT 51 ACGATGGGCC CATCTACACC AACGTGACCT ATCCCATAC GGTCAATCCG 101 CCTTTTCTTC CCACGGAGAA TCCGACGGGN TGTACTCCG TCACATTTAA 151 TGTGTATGAA AGCTGGCTAC AGGAAGGCCA GACGCGAAT ATTTTTGATG 201 GCGTTAACTC GGCCTTTTAT CTGTGGTGCA ACGGGCTGGT GGTGCGTTAC 251 GCGCAGGACA GNCCTTTGCG GTCGGAATTT ACCTGAGCG GATTTNTAAT 301 TAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT GACCAAAATC 351 CCTTAACGTG AGTNTCGNT CMCCTGANC TCAGACCCCG TANAAAAAGT 401 CAAGGATCT TCTTGAGATC CTNNTTCTC GCGNTAATC TGCTGCTTGC 451 AAAAATAAAA ACCACCGNTA CCAGNGGGG TTTGTTTGC NGANCAANAG 501 CTACCAACTC TTTTCTNGA ANGTGAACGT NCTTNAGCAN ACCCTCNAT 551 ACCANACTAT GTCCTCTNG TGTANCCGTA NNTAGGCCAC CACTCAAGA 601 ACTCTGNTT ANCNCTACN TACTCCGNTT CTGCTAANN TGTTNCCCG 651 TGNNTNGCTG CCNCTGNGA TANTTTTTT GNTTTACCG GTTCNAGACC 701 NNTNCTAATN TNTNNTNT TTTGNTCMT ATGATTTGCM TTTNANTGNT 751 GGATNCTTNN NCAGNCCAG CTGNTGATCG ANNGCCTAN TCTAATCTGN 801 ANNACNCTNN NGNNTNNT NTGNAGANAG NNGCTCNCTN TCTANGNNT 851 NNNNGGNTN TNGTGTCCG NTNNTGNTA GNTTTTTTT TTTNTTCTT 901 TNNNTNNTN</p>
<p style="text-align: center;">Sequenz 239</p> <p>1 CTTCCCTCGG NACGTGGGCG TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA 51 GTTCGTTGTA GGTCTGTGCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC 101 GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA 151 CCGGTAAGA CAGCACTTAT GCGCACTGGC AGCAGCCACT GGTAAACAGGA 201 TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGTGG 251 CCTAACTACG GCTACACTAG AAGNACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT 301 GAAGCCAGTT ACCTTCGAAA AAAGAGTTTG TAGCTCTTGA TCCGGCAAC 351 AAACCCCGC TGGTAGCGGT GTTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG 401 CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AAGAGATCCT TTGATCTTT CTACGGGGTC 451 TGACGCTCAG TGGAAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGANAT 501 TATNNNNAAN GANCTCANC TAGNTNCTTN TGAATNNGNA ATNCANTCAT 551 NTCANNTCA TANGNACCAT NNTNNTNNG NAGNCGNNC NGNCATNAAC 601 GNNANACNC NACNNGNCA CNCCANATG ANGCANNAT NNTNNTATCG 651 CGTCTGGGAC TTCCNACTCG NCNGANTTCA NACCANNAT ATTNANTCC 701 NNTCACNANN CNTNAGTTT TCNNGGGGNA ACANNNGGT GANTGCCAN 751 NGTNNNTAGG GNCANNGGN AGNNTNAGG CATNATCTTA CCNAGNGTC 801 TGAACANGNT NNAGNGGTTN NACNANGTTN TCANGATCCN TNNANANTNN 851 NCNNAACNGN TATTTTTTTC GNANNGCTTN TGGNGCAGAA AAAATAGNAA 901 NTGCCTTTT</p>	<p style="text-align: center;">Sequenz 247</p>
<p style="text-align: center;">Sequenz 248</p>	

Abbildung 72: Originalsequenzen der „upstream deletion Linie“ A2, die zum Erstellen der Gesamtsequenz in VI.2. Alle weiteren Details sind dort zu finden.

VI.4.1 Übersicht Original-Sequenzen der Mutagenese-Experimente in *omb* und *WRE*

<p>Sequenzierung pBAT7071[omb K 431R] mit M13rev:</p> <pre> 1 CAAGCTCGAA ATTAACCCCTC ACTAAAGGGA ACAAAAGCTG GTACCACACT 51 TGCTTTTGAC ACAACTGTGT TTACTTGCAG TCCCCAAAAG CAGACAGACT 101 CGAGATCCGG GCAGCATGGT CGAGACGCTC GTCCTTGCCT CGGCCGTGCG 151 CCATCAGCTG CATCCGGCGA TGCAGCCGCT GCGGGCGCCT CAGCCCGAGG 201 ACGATGGCGT CGTCGATGAT CCCAAGTCA CGCTGGAGGG CAAGGACCTG 251 TGGGAGAAAG TCCACAAACT GGGCACGGAA ATGGTCAATC CCAAGAGCGG 301 CAGACAAATG TTTCCGCAAA TGAATTTTCG TGTTCGGGGA CTGGATGCCA 351 AGGCTAAATA CATCTTGCTA CTGGACATTT TGGCGGCGGA CGATTATCGT 401 TATAAATTCG ATAATAGTCG CTGGATGGTG GCTGGCAAAG CGGATCCGGA 451 GATGCCAAAA CGCATGTATA TCCATCCAGA TTCGCCCAAC ACGGTGAGCG 501 AATGGATGCA GAAAGTTGTT TCAATTCACC GGTAAAATTT GACCAACAAT 551 ATTAGTGATA AACATGGGAT TGTAACTACT ACGATCCCTG ACTCGATGCA 601 CAAGTACCAG CCGCGTTTCC ACCTGGTGGC AGCCAAATGAC ATCCTGAAGC 651 TGCCGTACTC CAGCTTTCCG AGTACGCTCT TCAAGGAGAC CGAGTTTCATC 701 GCCCTCACCG CATATCAAAA TGAGAAGATA ACTCAATTTA AAATGATAAA 751 CAATCCGTTT GCGAAGGGCT TTCGTGATAC TGGTGGCGCG TAGAGCTCCA 801 TTCGCCCTAT AATGAGTTCG ATTACAATTT ACTGGCGCTC GTTTACAACG 851 TTGTGACTGG GAAAACCCCTG GCGTTACCCA ACTAATCGCC TTGCAGCACA 901 TCCCCCTTCG CAGCT </pre>	<p>Sequenzierung pBAT7071[ombK 431E] mit M13rev:</p> <pre> 1 AACTCAAATT AACCCCTACT AAAGGGAACA AAAGCTGGTA CCACACTTGC 51 TTTTGACACA ACTGTGTTTA CTTCGCAATCC CCCAAAACAG ACAGACTCGA 101 GATCCGGGCA GCATGGTCTG CGACCTGCTC CTTCGCTCGG CCGTCGCCCA 151 TCAGCTGCAT CCGGCGATGC GACCGCTGCG GCGCTTTCAG CCGGAGGACG 201 ATGGCGTCTG CGATGATCCC AAGGTCAACG TGGAGGGCAA GGACCTGTGG 251 GAGAAGTTCC ACAAACTGGG CACGGAAATG GTCATACCCA AGAGCGCGAG 301 ACAAAATGTT CCGCAAATGA AATTTCTGTT TTCGGGACTG GATGCCAAGG 351 CTAATACATC CTTCGCTACT GACATTTGTT GCGCGGACGA TTATCGTTAT 401 AAATTTTATA ATAGTCTGCT GATGGTGGCT GGCAAAGCGG ATCCCGAGAT 451 GCCAAAACGC ATGTATATCC ATCCAGATTC GCCCACAACG GGTGAGCAAT 501 GGATGCAGAA AGTTGTTTCA TTTCAATGAT TAAAATTGAC CAACAATATT 551 AGTGATAAAC ATGGATTTGT AAGTACTACG ATCCGAACTC CGATGCACAA 601 GTACCAGCCG CGTTTCCACC TGTGTGGAGC CAATGACATC CTGAAGCTGC 651 CGTACTCCAC GTTTCGCACG TACGCTCTCA AGGAGACCGA GTTCATCGCC 701 GTCACAGCAT ATCAAAATGA GAAGATAAAT TATTACATTC ATCCGCGGTA 751 TCCCGTTTGC GAAGGGCTTT CGTGATACTG GTCCCGGCTA AGAGCTCCAA 801 TTCGCCCTTA TAGTGAGTGC TTTTACATTC ATCCGCGGCT GTTTTACAAC 851 GTCGTGACTG GAAAACCCCT GGGCGTTACC CACTATTTCG CTGGCAGCCA 901 TCCCTTCGCG CAGCTGGCGT ATATAGCGAA AAGGCGCGA </pre>
<p>Sequenzierung pBAT7071[omb K431G] mit M13rev:</p> <pre> 1 TCGAATTAAC CCTCACTAAA GGAACAAAA GCTGGTACCA CACTTGCTTT 51 TGACACAACCT GTGTTTACTT GCAATCCCCC AAAACAGACA GACTCGAGAT 101 CCGGGCAGCA TGGTGAACGA CGTGTCTCCT GCCTCGGCCG TCGCCCATCA 151 GCTGCTATCC GCGATGCGAC CGCTGGCGGC GCTTCAGCCC GAGGACGATG 201 GCGTCTGCGA TGTATCCCAAG GTCACGCTGG AGGGAAGGAA CCTGTGGGAG 251 AAGTTCCACA AACTGGGCGC GGAATGGTTC ATCAACCAAG GCGCGACAGA 301 AATGTTTCCG CAAATGAAAT TTCGTTTTCG GGGACTGGAT TCGAAGGCTA 351 AATACATCTT GCTACTGGAC ATTTGGGCGG CGGACGATTA TCGTTATAAA 401 TTTTATAATA GTCGCTGGAT GGTGGCTGGC AAAGCGGATC CCGAGATGGA 451 AAAACGCGATG TATATCCATC CAGATTCGCC CACAACGGGT GAGCAATGGA 501 TCGAAGAAAT CATTTCAATG ATTAATAATG ACCAACAATA TTAGTGAATA 551 ACATGCAATG GTAAGTACTA CGATCTGAAA CTCGATGCAC AAGTACCAGC 601 CCGGTTCCCA CCGTGGCGCA GCGAATGACA TCCGAAAGCT GCGCTACTCC 651 ACGTTTCGCA CGTACGCTCT CAAGGAGACC GAGTTCAATG CCGTACACG 701 ATATCAAAAT GAGAAGATAA CTCATTTGAA AATGATAAC NATCCGTTTG 751 CGAANGGCTT TCGTGATACT GGTGCCGGNT AAANCTCCAA TTCGCCCTAT 801 AGTGAAGTCT ANTACNACTC ACTGGCCGCT GTTTTCAACG TONTGACTGG 851 GAAAACCCCTG GCGTACCCAA CTTNATCGCC TTGCAACAAA TNCCCCCTTC 901 GCCAGCTGGG GNTAATAGCG AA </pre>	<p>Sequenzierung pBAT 7071[ombH454Y] mit M13rev</p> <pre> 1 TCGAATTAAC CCTCACTAAA GGAACAAAA GCTGGTACCA CACTTGCTTT 51 TGACACAACCT GTGTTTACTT GCAATCCCCC AAAACAGACA GACTCGAGAT 101 CCGGGCAGCA TGGTGAACGA CGTGTCTCCT GCCTCGGCCG TCGCCCATCA 151 GCTGCTATCC GCGATGCGAC CGCTGGCGGC GCTTCAGCCC GAGGACGATG 201 GCGTCTGCGA TGTATCCCAAG GTCACGCTGG AGGGAAGGAA CCTGTGGGAG 251 AAGTTCCACA AACTGGGCGC GGAATGGTTC ATCAACCAAG GCGCGACAGA 301 AATGTTTCCG CAAATGAAAT TTCGTTTTCG GGGACTGGAT TCGAAGGCTA 351 AATACATCTT GCTACTGGAC ATTTGGGCGG CGGACGATTA TCGTTATAAA 401 TTTTATAATA GTCGCTGGAT GGTGGCTGGC AAAGCGGATC CCGAGATGGA 451 AAAACGCGATG TATATCCATC CAGATTCGCC CACAACGGGT GAGCAATGGA 501 TCGAAGAAAT TGTTCATTTT CACAATATAA AATGACCAA CAATATAGT 551 GATAAAACATG GGATTTGTAA GTACTACCAT CCTGCACTCG ATGTACAAGT 601 ACAGCCCGCT TCCACCTCGT TCGGAGCCAA TGACTCCTG AAGCTCCGCT 651 ACTCCACGTT TCGCACGTAC GTTCTCCAA GAGACCAGGT TCATCCCGCT 701 CACAGCATAT CAAATGAGA AGATNACTCA ATTTGAAAT CGATAACAAT 751 CCGTTTGCNA AANGGCTTTC GTGATACTG GTGCCGGNT AAGAGCTCCC 801 ATCCNCCCT ATAGTGAGTC NTATTACAAT TCNCTGGCC CGTCTTTTA 851 NAACCGTCT GACNTGGGAA AAACCCCTGG GCTTACCCAA CTTAAANCGC 901 CTTGNAGCAA ATCCCTTTTT TG </pre>
<p>Sequenzierung pBAT7071[ombA508V] mit M13rev</p> <pre> 1 GCTCGAAAT AACCCCTACT AAAGGGAACA AAAGCTGGTA CCACACTTGC 51 TTTTGACACA ACTGTGTTTA CTTCGCAATCC CCCAAAACAG ACAGACTCGA 101 GATCCGGGCA GCATGGTCTG CGACCTGCTC CTTCGCTCGG CCGTCGCCCA 151 TCAGCTGCAT CCGGCGATGC GACCGCTGCG GCGCTTTCAG CCGGAGGACG 201 ATGGCGTCTG CGATGATCCC AAGGTCAACG TGGAGGGCAA GGACCTGTGG 251 GAGAAGTTCC ACAAACTGGG CACGGAAATG GTCMTCACCA AGAGCGGCGA 301 ACAAAATGTT CCGCAAATGA AATTTCTGTT TTCGGGACTG GATGCCAAGG 351 CTAATACATC CTTCGCTACT GACATTTGTT GCGCGGACGA TTATCGTTAT 401 AAATTTTATA ATAGTCTGCT GATGGTGGCT GGCAAAGCGG ATCCCGAGAT 451 GCCAAAACGC ATGTATATCC ATCCAGATTC GCCCAACAGC GGTGAGCAAT 501 GGATGCAGAA AGTTGTTTCA TTTCACAAAAT TAAAATTGAC CAACAATATT 551 APTGATAAAC APTGATTTGT AAGTACTACG ATCCTGAACT CGATGCACAA 601 GTACCAGCCG CTTTCCACCG TGGTGGCGAG CAATGACATC CTGAAGCTCG 651 CGTACTCCAC GTTTCGACCG TACGCTTCA AGGAGACCGA GTTCATCGCC 701 GTCACAGCAT ATCAAAATGA GAAGATAACT CAATTTGAAA TCGATAACAA 751 TCCGTTTGTG AAGGCTTTTC GTGATACTGG TGCCGGCTAA GAGTCCATT 801 CGCCCTATAG TGAAGTCTAT TACAATTCAC TGGCGCTGTT TTTACAACGT 851 CGTGACTGGG GAAAACCCCTG GGTACCACCA CTTAATCGCC TTGCAGCACT 901 TCCCCCTTCG CCGAGCTGGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCC </pre>	<p>Sequenzierung pKS[TCF1mut4ABsrGI]:</p> <pre> 1 GATCCGGATT GGAGCTCCAC CCGGCTGGGG GCGCTCTAG AACTAGTGG 51 TCCCGCTTCT GTCTCTGTTT TTTTGGAGTT TGGATTTGGG TTTTGGTTTG 101 GGGGTTTGA AATCTCCGGA GAAGTTTTCG AAAAGCTCAG GGACCGACGC 151 GGGGAAGTA CCGACAATGC CCGTACACTC GGGGGA AAAA TATGTACATG 201 AAATGTGTGG ACGAATTCGA TATCAAGCTT ATCGATACCG TCGACCTCGA 251 GGGGGGGCCC GGTACCAGCT TTTGTTCCCT TTAGTGAGGG TTAATTTCCA 301 GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTCT CTGTGTGAAA TTGTTATCCG 351 CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAG GTAAGCCTG 401 GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCAGATT AATTTGGCTG CGTCACTGC 451 CCGCTTTCCA GTCGGGAAC CTGTGTGATC AGCTGATTA ATGAATCGGC 501 CAACCGCGCG GGAGAGCGCG TTTGTGATTT GGGCTCTCTT CCGCTTCCCT 551 GTCCTACTGAC TCGCTGCGCT CCGCTGTTCG GCTCGGCGCA GCGGTATCAG 601 CTCACTCAA GCGGTAATA CGGTATCCA CAGAACTCAG GGATAACGA 651 GGAAGAACA TGTAGCAAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAG 701 CCGCGGTTGC TGCGCTTTTT CCAATAGCTC CCGCCCGCTG ACCGACATCA 751 CAAAAATCGA CGCTCAAGT AGAGTGGCGA AACCAGCAG GACTATARGA 801 TACCAGCGCT TTCCCTTGA AGCTCTGCTG GCGCTCTCTT GTTCGACCTG 851 CCGCTTACGG ATACTGTGCG CTTCTCTCTC GGAAGNKGNG CTTCTNNNCT 901 CAGCTGAGNN NNGTNGNG TAGTNTGCGC TCAGCTGGCN GNGNMGAC 951 CCC </pre>

Abbildung 73: Originalsequenzen aller in der Arbeit durchgeführten Mutagenese-Experimente. Die Annotation ist im Ergebnisteil zu sehen.

VI.4.2 Übersicht Original-Sequenzen der Analyse von Qd[For]

	1	CCAANCTAGG	ATCGACCGCG	CNCCTCTGCT	CGAATCCCCC	CTNNTTGGGG
	51	AAAGCCGGCT	CNAATGGGCA	AACGATCCA	GCAGGGGNCN	NTTTTCCAC
	101	ATTANGTNGG	ATATNNCACT	TCCTTTTTTC	NGNTNTGTCT	ATACCTTCNT
	151	TCCTNTANTG	CTGAANATTT	TAGCCTTATC	GTCCTTTATG	CGGCCNGATT
	201	TTCCCTGANT	GTGCTCTGGC	TNACTGCCC	TTAGNNTNGN	CAAACNTNTN
251	CNGCATANTT					
Linke Seite	Sequenz 165: iPCR Produkt 534/638 (Maell) Seq-Primer 638					
	1	GCCNGTTTGC	CCGANGTGGG	TGTATTTCGAT	GTAAGATGAT	TGCGCGTGT
	51	TCGATTCCTT	AGACTTCGGG	TTGCGCGCCG	GAGGTCGAAC	AATTTCAAGG
	101	NAAGTCGAAC	TTTTTCAANC	CGACTTANNC	GGGTNGCGTG	GCGTTTGCNT
	151	TTATGTTGGC	ATTCGGCGCA	ATTGGCGGGC	CNATTATGGG	GCCACGATTA
201	TGCCGTATNA	GCACGTNNGA	NCCGGATNCG	CTGGNTATGC	CGCTTTNTAT	
251	GCCGCGGGA	GTCGAAC				
	Sequenz 166: iPCR Produkt 534/638 (Maell) Seq-Primer 534					
	1	CCGGNCTGTN	TTGCNCAGTT	NCACCCCTAG	CACCGNTANT	GTANGCNTNA
	51	TCGCACTGGT	CAACGTGCNT	AGCCGGTATC	CTAGACCNAG	NGCAGCTNCT
	101	CACNGGACTC	GTGCGTAGAA	GCGACAATG	ACGACTCCGC	GTGCACCANG
	151	CTGCACACAA	TGCACNGGAC	ATAGGNANCA	TGGTGNTGGA	NCGCCAANCG
201	ANNCNCAACT	TAGNNCNTAT	CTATCANNNT	TGANATTGCT	GGGAAACCGC	
251	NCATGCTNAT	NNNTCCCGNG	TGTCTCGNCN	ATTNCTNNTG	TNGCACAGGC	
301	TCNACCTGGT	NCAGCANCNC	TGGCNGNACC	NGGCTCATT	GCCANNNGCN	
351	CCTCANCNN	GCCNCNGTNA	TCACNNTGAG	NCCGATATGG	AGGGTACTCA	
401	CCAANGCATG	NTTGCGNTGG	ATTCTNGTAG	CGCNGNACCT	CTCCNGTCCN	
451	GCAGTTNGCA	ACTGCTNGAG	NCAAGGAAGG	CNTTGCNGNC	TNATGATTTCG	
501	ATAGAGANTN	TCANGATTTCG	GCGAGCTNAT	GGCANCCCAC	TGCGTNCCCC	
551	GACTTATGGC	GTCTCATNTG	NATTGGGAAC	GCCNATNGGC	TTAGGCGTTT	
601	CNCTCACNAG	NCGTGNNCNC	CCAAGCNCCG	NGTCNCAACC	ANTGCCTGNC	
651	CAAANTTGGC	CTTAGAGANT	NGCANGCATC	CTNCCCTGGT	TNATGNCNCA	
701	NAANGCTGAA	CGGGCCNGNN	CNTTTTGGC	TGC		
Rechte Seite	Sequenz 167: iPCR Produkt 531/535 (Bsh1236l) Seq-Primer 531					
	1	ANNGAGGGGG	CNGATGGNGT	GTNTCTTNAC	CCTGGANGGN	TATCTGNAGA
	51	CNTGTCTATA	AGAATNGGCA	GGANNTNNTC	NAGTANCAGG	TACNCNATCG
	101	NGGCANTANC	GGAAANTNNC	CNANCANANC	AACACATANG	AGCAANNAAN
	151	ATGNTNGCGG	TCNNNCANNG	GNTGGTTCAN	TGGTGCACGG	CTTTGGTNTT
201	TGCATGATCG	CTTCNGNCNC	TANCNTNCGG	TATNGNNTAG	GGAAATCGGG	
251	CGGTAGAGAT	ATTGCNCTTG	TCTCGCAATC	TATACAGATC	CTGGCGCGAA	
301	ANAGACTGAC	CCCTTCATCC	GCTCNTGNCN	CCATNTANAC	ACGNTGTGNG	
351	AGTCCNACAN	TGNACCGANN	GANNAACCAG	CTGTCAAGNA	TNGCCAGGNC	
401	ACACATCGTG	CGTCTGNAC	GCGATCTNNG	ATGNTCGATN	TCCGNCCTTG	
451	ACCNNGTGNC	NACCATTGTT	GNCCGANACA	ACCGATGNTG	CNGACTTGAN	
501	NTCGNTTCGG	CNNCTGCCTT	NTGCTATCAG	GGNAGCTAAA	GNNTCTCNTG	
551	ACAGCGNAAG	GGATTGGTCG	NATCNGATNT	CNGNAACCTA	GCATTGGGGA	
601	TTCCNGCACN	ACTGNTNGAN	CCCGBAANAG	GGCGGTNATT	CNTCTTCNNG	
651	GATNGNCNAG	GGGNNCCNGG	GGGCCGGCCT	NCTTAAAANA	NGACCCNNGG	
701	GTCCATTTAA	ANNCCANCNN	GTNNATTGGG	GCA		
	Sequenz 168: iPCR Produkt 531/535 (Bsh1236l) Seq-Primer 535					

Abbildung 74: Originalsequenzen der iPCR Produkte von Qd[For]. Die ersten beiden Sequenzen entsprechen dem linken Ende der Insertion (Maell), die unteren beiden Sequenzen entsprechen dem rechten Ende der Insertion. (Bsh1236l). Es wurde eine weitere iPCR (Sau3AI) versucht um anhand dieser Daten weiter in die Insertion zu lesen, was aber nicht gelang.

VI.4.3 Übersicht Original-Sequenzen der Dpp-GFP-Fusionskonstrukte

<pre> 1 CANGGACTA CGGAAGTCT GGTGGAGTG CGGACGGTC GTCCTTGAA 51 GCGCGGCCA CACCACATG TAGCGCTGG CCGCAGGGC GACGAGGGC 101 ADGAGCGTG GCAGCACA CAGCCGCTCC TGTTCACCTA CACGACGAC 151 GCGCGGCCA AGCGCGCTC CATTGGGAC GTTCTGGGG GAGAGGGAG 201 GCAGAACTT ATCTTGAG AGACTTGG CCGTGGAC CAGCAGACC 251 CCGGTTGAG GAGGGGAG GAGCTGTTC CCGGGTGGT GCGCAYCTG 301 GTGAGCTGG AGGGGACT AAACGGCAC AGTTACGG TGTGGGGA 351 GGGGAGGGC GATGCCACT ACGGGAGCT GACCTGAAG TTGATCGCA 401 CTACCGGGA GGTGCGGTG CCTGGGCCA CCTCTGAG GACCTGACC 451 TAGCGCTGG AGTCTTAG CCGCTACCC GACACATGA AGCAGCAG 501 CTTTTHAG TCGCGTGG CCGAGGTA CTTGAGAG GCGACATCT 551 TTTTCARGA CAGCGTAC TACAAGACC GGGCGAGTG GAGTTGAG 601 GGGCAGCC TGTGAAAG CATCGAGCT AAGGGATCG ACTTCAGGA 651 GAGCGGAC ATCTGGGG ACRAAGTGG AGTACACTA CAGCAGCAC 701 AACTTTATA TGTGGGGC AAAAGCAGA GAAAGGATC AGGTGAAGT 751 TCAADATCG CCACAGCTC TGGGAGCG AGCTTGHA GTTGGGAG 801 CACTATNAC AAGGACCG CAGTGGGG ACGGGCGCT TCGTGTGCC 851 CHNACACCA CTNCCGTGA GNAACNATT TCGGCGCTG GCGAANANC </pre>	<pre> 1 CNKNNCGAC TACGGAAGT CTGGATGG GTGGGAGG TCCGCTCCT 51 GAAGCGGGC CCACACACC ATGTAGCCT GCGCGGAGC GGGAGGAGG 101 CGACAGAGG GTGGAGCAC AAGCAGCCG TCTTGTTCAC CTACAGGAG 151 GCGCGGGAG ACAGGGGCG CTCATTCCG GAGCTTCCG GAGCGGCA 201 GCGCAGCCG AGAGGGCTA CGAGCGCAA GTCCGAGGA GAGGAGAGC 251 AGAAGCTAT CTCTGAGAG GACCTGGGG GTGGGAGGG CCGCGGAA 301 AAGGGGAGC GAGAGGGCC TAGGAGGGC AAGAACCAG ACAGCCGGC 351 GTGAGCAAG GGGCAGAGC TTTTACCGG GGTGTGCC ATCTGGTGG 401 AGCTGAGGG GAGGTAAAC GGCACAAAT TCGGCTGTC GGGAGGGG 451 GGGGGAGAG CAGCTTAGG GAGCTGAG GAGCTGAG CTGAGTGA 501 GGGCAGCTG CCGTGGCT GCGCACCTC GGTGACAC CTGACTTGG 551 GGTGAGTGG CTTGAGGG TACCGGAGC ACATGAAGCA GAGCAGTTC 601 TTAAGTCCG CCATGCCGA AGCTAGCTC CAGGAGGCA CCATCTTCT 651 CAGAGCAC GGCACACTA AGACCGGC GAGGTGAG TTGAGGGG 701 AACTCTGG TGAACGAT GAGCTGAG GCACTGACT TCAAGGAG 751 GGCACATAT CTTGGGGC AAGTGGAG ACAANTAC ACANCCACA 801 CTTTATAT ATGGGCGAC AAGGAGAA AGGHTCCA AGGTGACT 851 TTAAGATCC GCGCCANAT NCNAGNAG GCGAGTGA ANTCCGCG </pre>
<p>Sequenz 241: Dpp-del-GFP mit Primer 625A sequenziert</p> <pre> 1 TNACTAGCG GTGAGTGT TCAGCGCTA CCGCGACAC ATGAGGAGC 51 AGGACTTCT CAATCCGCC ATCGCGAAG GCTAGTCCA GAGCGGACC 101 ATCTTTCTA AGGACAGCG CACTACAAG ACCCGCGCG AGGTGAGTT 151 GAGGGGAGC ACCCTGTGA ACCATCGA CTTGAGGGC ATCGCTTGA 201 AGGAGGAGC CAACATCTG GGGCAGAGC TGGAGTACA CTACACAGC 251 CAGAACTCT ATATCATGG CGACAGCAG AAGAACGGC TCAAGGTGA 301 CTTCAAGAT CCGCCAGCA TCGAGGAGC CAGCGTCCG CTCGCGACC 351 ACTACAGCA GAAACCGCC ATGGCGAGC GCGCGTGGT GCTGCGGAG 401 AAGCTTAC TGGCACCTA GTCCGCTG AGCAGAGCC CCAAGGAG 451 CCGGATAC TGGATTCCT GAGCGCGCC GGGATCACT 501 TCGGTGGA CAGCTGTAC AAGCCGGGA CTTGGCGGC GCACTCGTG 551 TAGTGGACT TCTGGAGCT GGGCTGGAC GACTGGAAT TGGGCGCTC 601 GGGCTACAT GCATATACT GCAAGGGAA GTGCGCCCT CGGCTGGCG 651 ACCACTTTA CTCAGCAAT CAGCGGTGG TCGAGACTT GGTCAAAAT 701 ATGATCCCG GAGGGTGG GAGGCTGG TGGTGGGA CAGCACTGG 751 CAGGTGGC ATGCTTATC TCAAGGACA AATAGCGGG GTGCTGAGA 801 ACTCAGGAG ATGACGGGG TGGCTGTGG CTTGCGATG ATTC </pre>	<p>Sequenz 243: Dpp-dup-GFP.Sequenziert mit Primer 625A</p> <pre> 1 TCNATAGGG CTTGAGTGG TTAGCGGT ACCCGACCA CATGAGCAG 51 GAGACTTCT TCANCTCCG CATCGCGGA GGTACTGTC GGGAGGGG 101 CATCTTCTC AAGGAGGAG GCAACACAA GACCGCGCC GAGGTGAGT 151 TGGAGGGCA CACCTGGTG AACCGATCG AGCTGAAGC CATCGACTT 201 AAGGAGGAG GCACATCTT GGGCACAAG CTGGAGTACA ACTACAGAC 251 CCAACAGTC TATATCATG CCGCAGCA GAGAGAGCA GAGAGAGTG 301 ACTTGAAT CCGCGCAC ATGAGGAG GAGAGTGA CTCGCGGAC 351 CACTACAG AAGACACCC CATCGGAGC GCGCGCGCT TGTGCGCGA 401 CACACTAC GTGAGCACC AGTCCGCT GAGCAAGAC CCGAAGGAG 451 AGGGGATCA CATGTCTCT CTGAGTTC TGACCGCGC CGGGATGCT 501 CTCGGCATGG AGAGCTGTA CAGCCGGGG ACTGCGGCT GGGACTGCT 551 GTAGGTGAC TCTGAGAG TGGCTGGG GACTGAGT GTGCGCTTC 601 TGGGTACGA TGCATATT TGCAGGGGA AGTCCGCTT TCCGCTGGC 651 GAGCACTTT AACTGAGCA ATCAGCGGT GGTGAGACT CTGGTCAACA 701 ATATGATCC GCGCAAGTG GCGGAGGGC TGTGCGGTG CCAGCAACT 751 GAGCAGGTT GCGATGCT ATCTCACCA CCAAGTACG GGGGTGCTG 801 AGACTACA GGAGTACG GTGGTGGGC TGGGCTGTC CA </pre>
<p>Sequenz 242: Dpp-del-GFP mit Primer 678 sequenziert</p> <pre> 1 GGTGGAGGT GGGAGGGTC CGCTCCCTG AGCGGGCCC ACACCCACT 51 GTACCGCTG GCGGAGGGC CCGCAGGCT GGCACACAA 101 GAGCGGCTC CTTCTACCT ACPAGAGA CCGGCGGCG AAGGGGGGT 151 CCATTGGGA GGTGCGGGA GAGAGGGAG AGCAGACT TATCTTGA 201 GAGGACTGG GGGTGGCAA GGGGGCGCG AACAGGGCG AGCGGAGCG 251 GCTTACAGG CCGAAGAACC AGCAGGCC GGGGTGAGC AAGGGGAGG 301 AGCTTTTAC GGGGTGGTG CCTCTCTGG TGGAGCTGA CCGCAGGTA 351 AACCGGAG AATTGACT GTCCGGGAG GGGAGGGG ATCGACTTA 401 GGGCAGCTG ACCCTGAGT TCATCTGAC CAGCGCAG CTGCGGTGG 451 CTTGGCCAC CCTCTGACC ACCCTGACT AGGGGTGCA GTCTCTGAG 501 CCGTACCCG ACCCATGAA GAGCAGGAC TTTTCAAGT CCGCATGCC 551 GAAAGCTAC GTCAGGAGC GCACATCTT CTTCAAGAC GAGCGCACT 601 ACAAGACCG CCGCAGGTT AAGTTGAGG GGCACACT GGTGAACTG 701 ATGATCCCG GAGGGTGG GAGGCTGG TGGTGGGA CAGCACTGG 751 CACAAGCTG AATCAANNT ACNACANCA CAACCTTAT ATCATGGCC 801 N </pre>	<p>Sequenz 244: Dpp-myc-GFP.Sequenziert mit Primer 625A</p>

Abbildung 75: Originalsequenzen der Dpp-GFP-Fusionskonstrukte. Grün ist GFP-Sequenz markiert (nach Alignment der Sequenz mit p-2xEGFP-1). Die eingefügte SaclI Linker-Site ist unterstrichen. Blau ist die Modifikation in Dpp-dup-GFP und Dpp-del-GFP hervorgehoben. Der Primer 625A liest vom modifizierten Dpp-Bereich (Fragment 1b) in die GFP Sequenz. Der Primer 678 ist ein GFP interner Primer, der in Fragment2, das Dpp C-terminale Ende liest. So wird sichergestellt, dass die gesamte Sequenz in Ordnung ist. Fragment 1a wurde aus dem Ausgangsklon (pCDNA3-Dpp-myc von M. Roth geschnitten und nicht mehr vollständig sequenziert.