



cis*-Regulation des *Drosophila melanogaster* Gens *optomotor-blind

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Lisa Mayer

geboren am 23.08.1982

in Eckernförde

Mainz, im Juli 2012

Dekan

Erster Berichterstatter

Zweiter Berichterstatter

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2012

*„Die wahren Optimisten sind nicht überzeugt, dass alles gut gehen wird,
aber sie sind überzeugt, dass nicht alles schief gehen kann.“*

Friedrich Schiller

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Genregulation.....	7
1.2	Das T-Box Gen <i>optomotor-blind</i>	9
1.3	Regulation von <i>optomotor-blind</i> durch CRMs.....	12
1.4	Entwicklung der Tergiten bei <i>Drosophila melanogaster</i>	13
1.5	<i>optomotor-blind</i> in der Musterbildung des adulten Abdomens	16
1.6	Fragestellung und Ziel dieser Arbeit.....	17
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Enzyme	19
2.1.2.1	Restriktionsendonukleasen	19
2.1.2.2	Weitere Enzyme	19
2.1.3	Bakterien	19
2.1.4	Lösungen und Puffer	20
2.1.4.1	Ethanol-fällung.....	20
2.1.4.2	Phenol-Chloroform Extraktion	20
2.1.4.3	Isolierung genomischer DNA aus adulten Fliegen.....	20
2.1.4.4	Plasmid Minipräparation (manuelle Labormethode).....	20
2.1.4.5	Gelelektrophorese.....	20
2.1.4.6	Medien	21
2.1.4.7	X-Gal Färbung	21
2.1.4.8	Antikörperfärbung an L3 Imaginalscheiben	22
2.1.4.9	Antikörperfärbung an pupalen Abdomen	22
2.1.4.10	Antikörper.....	22
2.1.5	Kits	22

2.1.6	Oligonukleotide (Primer)	23
2.1.7	Laborgeräte	23
2.1.7.1	PCR Gerät.....	23
2.1.7.2	Gelkammern für Gelelektrophorese	23
2.1.7.3	Gel-Dokumentationssystem	23
2.1.7.4	Pipetten	23
2.1.7.5	Zentrifugen	23
2.1.7.6	Mikroskope und Binokulare	24
2.1.7.7	Sonstige Laborgeräte.....	24
2.1.8	Fliegenstämme	24
2.2	Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1	Gelelektrophorese.....	26
2.2.1.1	Gelextraktion.....	26
2.2.2	Enzymreaktionen.....	27
2.2.2.1	Restriktionsverdau.....	27
2.2.2.2	Ligation	27
2.2.2.3	Dephosphorylierung.....	28
2.2.2.4	Phosphorylierung	28
2.2.3	Annealing von Oligonukleotiden	29
2.2.4	Ethanol-fällung.....	29
2.2.5	Phenol-Chloroform Extraktion	29
2.2.6	Isolierung genomischer DNA aus adulten Fliegen.....	30
2.2.7	Transformation.....	31
2.2.8	„Topo-Klonierung“.....	32
2.2.9	„Gateway®-Technologie“	32
2.2.10	Bakterienkulturen.....	33
2.2.11	Plasmidpräparationen	33
2.2.11.1	Manuelle Plasmidpräparation.....	33

2.2.11.2	Plasmidpräparation nach verschiedenen Kits	34
2.2.12	Sequenzierung	34
2.2.13	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.13.1	Standard PCR/Long-Range PCR	34
2.2.13.2	Inverse PCR	35
2.2.13.3	Site-directed Mutagenesis.....	36
2.2.13.4	Pool PCR.....	36
2.2.14	Anhängen von A-Überhängen an PCR-Produkte (A-Tailing)	37
2.2.15	Herstellung von <i>enhancer-reporter</i> Konstrukten für die Transgenese	37
2.2.16	Herstellung von Deletionskonstrukten für die homologe Rekombination	38
2.3	Genetische Methoden.....	41
2.3.1	Transgenese.....	41
2.3.1.1	P-Element Insertionen.....	41
2.3.1.2	ϕ C31 Integration	41
2.3.1.3	Identifikation transgener Fliegen	41
2.3.1.4	Balancer-Kreuzungen	42
2.3.2	Herstellung endogener Deletionen durch homologe Rekombination.....	43
2.3.2.1	Toxizitätstest	43
2.3.2.2	„Targeting“-Kreuzung	43
2.3.2.3	„Screening“-Kreuzung.....	44
2.3.2.4	„Mapping“-Kreuzung und Etablierung eines stabilen Deletionsstammes	45
2.3.3	Einführung von <i>enhancer-reporter</i> Linien in <i>hh^{ts}</i> Hintergrund.....	46
2.3.4	Einführung von <i>enhancer-reporter</i> Linien in <i>omb</i> -mutanten Hintergrund	47
2.3.5	Generierung <i>omb</i> -mutanter Klone durch FRT-FLP	47
2.4	Histologische Methoden	47
2.4.1	Präparation von L3-Larven	47
2.4.2	Präparation pupaler Abdomen.....	47
2.4.3	Präparation adulter Abdomen	48

2.4.4	Xgal-Färbung.....	48
2.4.4.1	Xgal-Färbung von L3-Imaginalscheiben.....	48
2.4.4.2	Xgal-Färbung von pupalen Abdomen.....	49
2.4.5	Antikörperfärbung.....	49
2.4.5.1	Antikörperfärbung an L3-Imaginalscheiben.....	49
2.4.5.2	Antikörperfärbung an pupalen Abdomen.....	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Abdominale Expression und Regulation von <i>omb</i>	51
3.1.1	Omb in der Pigmentierung des adulten Abdomens.....	51
3.1.2	Omb Expression in der Entwicklung des adulten Abdomens.....	53
3.1.3	Identifikation des <i>omb</i> Tergiten-Enhancers.....	55
3.1.3.1	Expression der Enhancer-Reporter Konstrukte der 3' <i>omb</i> TU in den Tergiten.....	55
3.1.3.2	Subfragmente von <i>omb</i> TU10 und <i>omb</i> TU12.....	62
3.1.4	Hedgehog-Abhängigkeit des <i>omb</i> Tergiten-Enhancers.....	68
3.1.4.1	Analyse des Subfragments <i>omb</i> TU12A.....	70
3.1.4.2	Mutation und Oligomerisierung der hoch-konservierten Ci-Bindestelle Ci22.....	74
3.1.5	Deletionen verschiedener Bereiche der endogenen <i>omb</i> Tergiten-Enhancer Region durch homologe Rekombination.....	77
3.1.5.1	Herstellung der Deletionskonstrukte.....	79
3.1.5.2	Deletion von <i>omb</i> TU10-1.....	80
3.1.5.3	Molekulare Charakterisierung einer II.-chromosomalen Streifenaugen-Fliege.....	82
3.1.5.4	Deletion von <i>omb</i> TU10-2.....	83
3.1.5.5	Molekulare Charakterisierung der Deletion <i>omb</i> TU10-2.....	84
3.1.5.6	Deletion von <i>omb</i> TU12A.....	86
3.1.5.7	Molekulare Charakterisierung der Deletion <i>omb</i> TU12A.....	87
3.1.5.8	Charakterisierung der Δ <i>omb</i> TU10-2 und der Δ <i>omb</i> TU12A Tiere.....	91
3.1.6	Expressionstreue verschiedener Enhancer-Trap Insertionen in der Abdominalentwicklung.....	93
3.1.7	β -Galactosidase Aktivität in pupalen Herzzellen.....	97

3.2	Ergebnisse und Diskussion: Untersuchungen zur Regulation von <i>omb</i>	98
3.2.1	Enhancer-Reporter Konstrukte	98
3.2.1.1	Expression der Enhancer-Reporter Konstrukte ombTU8 bis ombTU12 der 3'ombTU in den Imaginalscheiben.....	100
3.2.1.2	Expression der Subfragmente von ombTU10 und ombTU12 in den Imaginalscheiben 104	
3.2.1.3	Expression des Minimalfragments ombTU12Amin und seinen Subfragmenten in den Imaginalscheiben.....	109
3.2.1.4	Expression weiterer Enhancer-Reporter Konstrukte	113
3.2.1.5	Wingless-Response-Element in ombJ+K.....	114
3.2.1.6	Diskussion Enhancer-Reporter Konstrukte	117
3.2.2	PRE/TRE Regulation von <i>omb</i>	118
3.2.3	Selbstregulation von <i>omb</i>	120
3.2.3.1	Diskussion	124
3.2.4	Molekulare Charakterisierung der <i>bifid</i> -Insertion.....	124
3.2.4.1	Diskussion	125
3.2.5	Versuche zur Deletion in der OLR von <i>omb</i>	126
3.2.5.1	Diskussion	128
3.2.6	Molekulare Charakterisierung der Heindel-Linie 667 und Untersuchung ihrer Expression in Augenimaginalscheiben	128
4	Diskussion	131
4.1	Abdominale Expression und Regulation von <i>omb</i>	131
4.1.1	Der Einfluss von Omb auf Zellschicksal und Zellpolarität des adulten Abdomens.....	131
4.1.2	Omb Expression in der Entwicklung des adulten Abdomens.....	134
4.1.3	Die <i>omb</i> Tergiten-Enhancer Region.....	135
4.1.4	Identifikation eines Hedgehog abhängigen Fragments im <i>omb</i> Tergiten-Enhancer...	137
4.1.5	Analyse der in ombTU12Amin enthaltenen konservierten Bindestellen.....	138
4.1.6	Endogene Deletionen in der Tergiten-Enhancer Region.....	141
4.1.6.1	Die Methode.....	141

4.1.6.2	Deletionen innerhalb der Tergiten-Enhancer Region	142
4.1.6.3	Bedeutung und Redundanz der deletierten Regionen.....	144
4.1.6.4	Streifenaugenphänotyp der Deletionsfliegen	146
4.1.7	Expressionstreue der Enhancer-Trap Insertionen in der Abdominalentwicklung	146
5	Zusammenfassung	148
6	Literatur	149
7	Anhang	156
7.1	In dieser Arbeit hergestellte Fliegenstämme	156
7.2	Verwendete Oligonukleotide	161
7.3	Nukleotidaustausch in der Herstellung des ombTU12A-Deletionskonstrukts.....	169
7.3.1	Sequenz von Exon V im ombTU12A-Deletionskonstrukt	169
7.3.2	Sequenz von Exon V im homozygot letalen Stamm B2.....	169
7.3.3	Sequenz von Exon V im homozygot lebensfähigen Stamm C2	170
7.3.4	Aminosäuresequenzen Exon V	171
7.4	Sequenz der iPCR der <i>bi</i> -Insertion mit Primerpaar 1017/1018.....	172
7.5	Sequenz des UAS- <i>rpr</i> Anteils des ombA-Deletionskonstrukts	173
7.6	Eidesstattliche Erklärung	175
7.7	Danksagung	176

1 Einleitung

1.1 Genregulation

Die räumliche und zeitliche Expression von Genen einer Zelle wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Durch das spezifische Zusammenspiel dieser Faktoren können Zellen eines vielzelligen Organismus zu verschiedenen Zelltypen differenzieren. Verschiedene Zelltypen enthalten dieselbe genetische Grundinformation in Form einer Kopie des gesamten Genoms, exprimieren jedoch für jeden Zelltyp spezifische Gene. Die unabdingbare Voraussetzung hierfür sind die verschiedenen regulatorischen Prozesse, die auf die Expression eines Gens wirken können. In eukaryotischen Organismen, in denen die Transkription und Translation eines Gens räumlich voneinander getrennt sind, findet die Regulation der Genexpression auf verschiedenen Ebenen statt: Auf der Chromatinebene spielen die Chromatinstruktur und die Zugänglichkeit der Promotorregion der Gene für die Transkriptionsmaschinerie eine wichtige Rolle (Narlikar et al., 2002). Ob ein Gen im transkriptionell inaktiven Heterochromatin oder aktiven Euchromatin lokalisiert ist, entscheidet über dessen transkriptionellen Status. Die während der Entwicklung einer Zelle erlangte Aktivität eines Gens kann über mehrere Zellgenerationen beibehalten werden. Das Feld der Epigenetik beschäftigt sich mit dieser vererbaren Genexpression, die der Methylierung der DNA und Modifikation der Histone unterliegt (Jaenisch and Bird, 2003). Die Modifikation der Histone und die Struktur des Chromatins können sich in verschiedenen Geweben unterscheiden und somit zu unterschiedlicher Genexpression in diesen Geweben führen. Im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* wurde dies erstmals bei Untersuchungen zur Expression bzw. Repression von homöotischen Genen, den HOX Genen, durch die Gruppe der *Polycomb*-Gene in der Embryonalentwicklung beobachtet (Lewis, 1978). Auch über die Amplifikation eines Gens kann dessen Expression reguliert werden. Wird in einer Zelle eine große Menge eines bestimmten Proteins benötigt, kann diese durch verstärkte Amplifikation eines Gens erlangt werden. Beispielsweise werden in Follikelzellen der *Drosophila* Ovariole die Choriongene überamplifiziert, um eine schnelle Synthese des Chorions zu gewährleisten (Tower, 2004).

Die Regulation von Genen durch extrazelluläre Signale wie Transkriptionsfaktoren und Komponenten von Signaltransduktionskaskaden spielt in der Entwicklung von Organismen ebenfalls eine entscheidende Rolle. Die transkriptionelle Genregulation basiert auf Anwesenheit und Binden von regulatorischen Proteinen an *cis*-regulatorische Sequenzen (CRM = *cis*-regulatory module, *enhancer* und *silencer*) und deren Einfluss auf die Transkriptionsmaschinerie am Promotor. CRMs können einen

aktivierenden oder reprimierenden Einfluss auf die Transkription haben und in jeder Orientierung und Position relativ zum Zielgen agieren (Banerji et al., 1981). Im Genom der Säugetiere wurden CRMs als hochkonservierte, nicht-kodierende Sequenzen mit einer Länge von 100bp bis über 200bp beschrieben (Bejerano et al., 2004), die in einer Entfernung von bis zu 1Mb von ihrem zu aktivierenden Promotor liegen können (Sagai et al., 2005). Im *optomotor-blind* Locus in *Drosophila* wurde Enhanceraktivität über eine Entfernung von ca. 100kb nachgewiesen (Pflugfelder and Heisenberg, 1995). CRMs enthalten Bindestellen für zwei oder mehr Klassen von Sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren (Istrail and Davidson, 2005). Somit integrieren CRMs die Aktivität multipler Transkriptionsfaktoren, abhängig von deren zeitlichen und räumlichen Expression, und kontrollieren so das Expressionsmuster ihres korrespondierenden Gens (Arnosti and Kulkarni, 2005). Da jeder Transkriptionsfaktor auf multiple CRMs wirkt und jede CRM unter dem Einfluss multipler Transkriptionsfaktoren steht, werden so ineinander greifende Netzwerke der Genexpression gebildet (Levine and Davidson, 2005).

Viele der Transkriptionsfaktoren und Komponenten der Signaltransduktionskaskaden sind über verschiedene Taxa hinaus konserviert. Deshalb wird vermutet, dass die morphologische Evolution zu einem bedeutenden Teil auf Veränderung der CRMs und damit der Expression der regulatorischen Netzwerke beruht (Prud'homme et al., 2007).

In eukaryotischen Organismen findet Genregulation auch auf posttranskriptioneller Ebene, beispielsweise durch verschiedene Prozessierung oder selektiven Transport der mRNA, bei der Translation und posttranslationalen Modifikation von Proteinen statt.

In genomweiten *screens* in *Drosophila* wurden Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, Histonmodifikationen, *cis*-regulatorische Elemente, RNA-Polymerase II Bindestellen und Chromatin Elemente identifiziert (Negre et al., 2011; Oktaba et al., 2008; Roy et al., 2010; Schwartz et al., 2010). Verschiedene Transgenese-Assays lieferten Einsicht in die räumliche und zeitliche Aktivität von CRMs einzelner Gene (Ip et al., 1992; Kim et al., 1996; Sivasankaran et al., 2000). Trotz dieser erlangten Informationen sind wir noch weit davon entfernt die regulatorischen Netzwerke in der Entwicklung einzelner Organismen und deren Einfluss auf die morphologische Evolution zu verstehen.

In dieser Arbeit soll durch Untersuchungen am T-box Gen *optomotor-blind* im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* ein Beitrag zum Verständnis der Regulation dieses Gens geleistet werden. Hierzu wurden vor allem intronische Sequenzen auf regulatorische Elemente und deren Aktivität in verschiedenen Geweben und zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung von *Drosophila* hin untersucht.

1.2 Das T-Box Gen *optomotor-blind*

Gene der Familie der T-Box Gene (*Tbx*-Gene) kodieren für Transkriptionsfaktoren, denen eine hochkonservierte DNA-Bindesequenz, die T-Box, gemeinsam ist. *Tbx*-Gene regulieren Schlüsselprozesse in der Entwicklung und Organogenese von Vertebraten und Invertebraten. Das erste und namensgebende *Tbx*-Gen wurde 1927 in Mäusen als *Brachyury* (*T*) Locus beschrieben (Dobrovolskia-Zavadskia, 1927). Erst in den frühen 1990er Jahren konnte eine Sequenzhomologie zwischen *Brachyury* und dem *Drosophila* Gen *optomotor-blind* (*omb*), die T-Box, gezeigt werden (Pflugfelder et al., 1992). Bei der T-Box handelt es sich um ein 200 Aminosäuren umfassendes DNA-Bindemotiv. Die Bindung der *Tbx*-Proteine erfolgt an spezifischen Erkennungssequenzen (*Tbx-binding element*: TBE). In der Maus wurde eine aus zwei palindromischen *half-sites* (2 x 10bp) bestehende Sequenz als *Brachyury*-Zielsequenz identifiziert (Kispert and Herrmann, 1993). Aus *in vitro* Experimenten mit weiteren *Tbx*-Proteinen ließ sich eine gemeinsame Konsensussequenz herleiten (Wilson and Conlon, 2002). Bis heute sind in *Drosophila* 8 und in Säugetieren 17 *Tbx*-Gene bekannt, die sich durch Homologien in der T-Box Sequenz zu fünf Unterfamilien gruppieren lassen (Papaioannou, 2001). Phylogenetisch lässt sich *omb* der *Tbx2*-Unterfamilie zuordnen, der ebenfalls die *TBX*-Gene *TBX2-5* der Vertebraten angehören (Abbildung 1.1). Ein Großteil der bisher untersuchten *Tbx*-Gene stellen transkriptionelle Aktivatoren dar (Kispert et al., 1995; Lamolet et al., 2001). *TBX2* und *TBX3/ET* der Vertebraten sind die am besten charakterisierten Repressoren der *Tbx*-Genfamilie (Carreira et al., 1998; Rowley et al., 2004). Untersuchungen von M. Porsch (Porsch et al., 2005) legten nahe, dass *omb* ebenfalls zu der Gruppe der transkriptionellen Repressoren gehört. *Omb* teilt nicht nur seine transkriptionellen Eigenschaften mit *TBX2/3*, sondern weist mit ihnen die höchste Homologie innerhalb der *Tbx*-Proteine der Vertebraten auf (Papaioannou, 2001). Die Bedeutung der *Tbx*-Proteine äußert sich dadurch, dass beim Menschen Genmutationen mit klinischen Syndromen assoziiert sind, beispielsweise Mutationen in *TBX1* (DiGeorge syndrom), *TBX15* (Cousin syndrom), *TPIT/TBX19* (Isolated ACTH deficiency), *TBX20* (Congenital heart disease) und *TBX22* (X-linked cleft palate and ankyloglossia) (Kirk et al., 2007; Lausch et al., 2008; Packham and Brook, 2003; Wilson and Conlon, 2002). Mutationen in Genen der *Tbx2*-Unterfamilie resultieren in haploinsuffizienten Syndromen, *TBX3* im Ulnar-Mammary Syndrom, *TBX4* im Small Patrella Syndrom und *TBX5* im Holt-Oram Syndrom (Bongers et al., 2004; Packham and Brook, 2003), die sich vor allem in Missbildung der Extremitäten äußern. Untersuchungen von Jacobs (2000) und Sinclair (2002) ergaben, dass *TBX2* in Mamma-Karzinomen amplifiziert und hochreguliert wird.

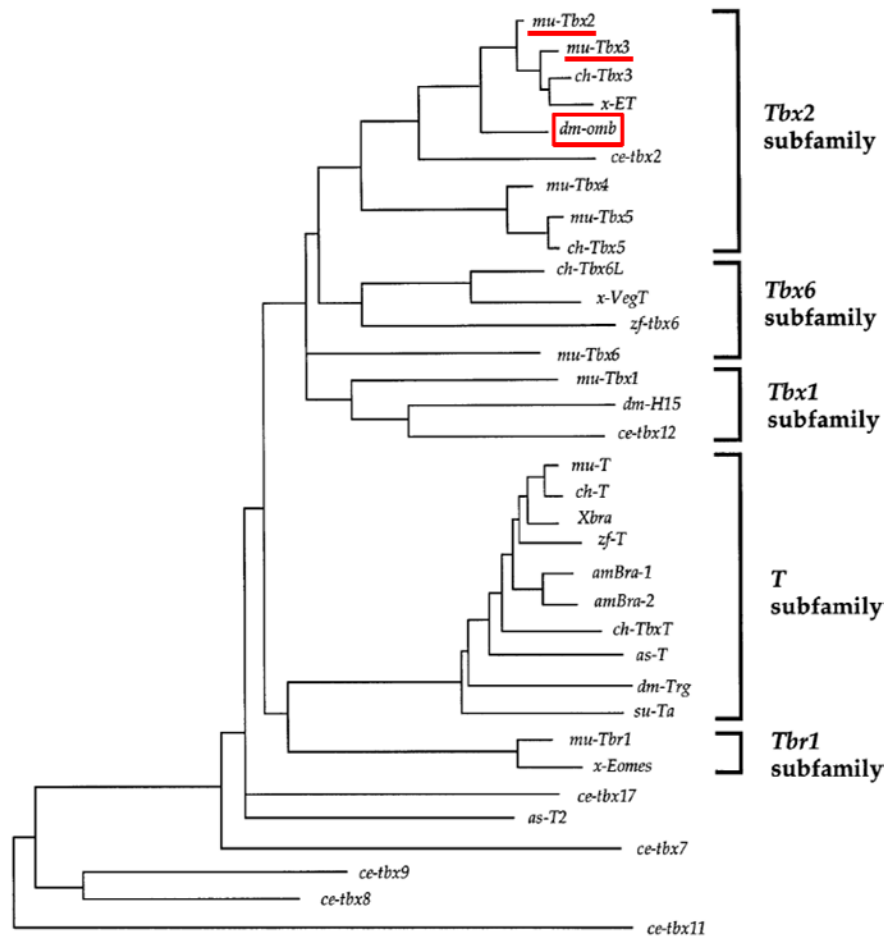


Abbildung 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der *Tbx*-Genfamilie (nach Papaioannou and Silver, 1998). Das *Drosophila Tbx*-Gen *optomotor-blind (omb)* und seine orthologen Gene *Tbx2* und *Tbx3* sind hervorgehoben. Von bislang acht bekannten *Drosophila Tbx*-Genen sind neben *omb* hier nur zwei weitere aufgeführt (*dm-H15* und *dm-Trg*).

Das *Drosophila* Gen *omb* wird in der Entwicklung der Fliege in verschiedenen Geweben exprimiert. Ähnlich wie Mutationen in den Vertebraten-Genen der *Tbx2*-Unterfamilie, führen Mutationen in *omb* zu Defekten in der Entwicklung der Extremitäten, insbesondere der Flügel. Das erste *omb* Allel *bifid (omb^{bi})* wurde bereits 1916 von Morgan und Brigdes isoliert. Hierbei handelt es sich um eine regulatorische, hypomorphe Mutation bei der im Gegensatz zum wildtypischen Flügel die Longitudinalvenen nicht in zwei Venenstränge münden, sondern alle zu einem Venenstrang fusionieren. Ein schwerwiegenderer Phänotyp ist in Flügeln von pharat-adulten *omb* Nullmutanten zu sehen, bei denen die Flügelentwicklung stark gestört und der Flügel damit massiv reduziert ist. Ektopische Expression von *omb* im Notum führt dagegen zur Ausbildung eines zweiten Flügelpaares (Grimm and Pflugfelder, 1996). In der Flügelimaginalscheibe trägt *Omb* zur Stabilität der A/P-Kompartimentgrenze und zur korrekten Morphologie des Epithels bei (Shen and Dahmann, 2005; Shen et al., 2010; Shen et al., 2008). Überexpression von *omb* in der Beinimaginalscheibe führt zu einer distalen Verkürzung im adulten Tier (Porsch et al., 2005).

Das namensgebende Allel *omb* wurde 1978 von Heisenberg et al. als rezessive und lebensfähige Mutation *In(1)omb^{H13}* durch Untersuchungen des optomotor-Verhaltens an *Drosophila* identifiziert. Störungen des optomotor-Verhaltens der mutanten Fliegen korrelieren mit Defekten in der Struktur und Funktion des mutanten Gehirns, in dem eine große Anzahl der Neuronen der „lobula giant plate neurons“ (LPGN), die „horizontal system“ (HS) und „vertical system“ (VS) Neurone der optischen Anlagen fehlen (Heisenberg, 1978). Untersuchungen von K. Hofmeyer zeigten, dass in der *In(1)omb^{H13}* Mutante ein Verlust von Omb in Glia Zellen zu Defekten in den optischen Loben führt (Hofmeyer et al., 2008). Auch in der Augenentwicklung spielt *omb* eine entscheidende Rolle. Überexpression von *omb* in der Augenimaginalscheibe wirkt der Augenentwicklung entgegen, indem es die retinale Differenzierung blockiert. Unterexpression, dagegen, führt zu einer erhöhten Anzahl von Ommatidien (Porsch et al., 2005).

Die Klasse der hypermorphenen Allele *Quadroon (Qd)* führen zu verstärkter Pigmentierung der abdominalen Tergiten der adulten Fliege. Dies reicht von einer Erweiterung des Pigmentstreifens zum Anterioren hin bis zu einer Duplikation des posterioren Kompartiments und Verlust von anterioren Strukturen (Abbildung 1.2). Ähnliche Beobachtungen wurden bei Überexpression von *omb* in der Entwicklung der abdominalen Tergiten gemacht (Kopp and Duncan, 1997).

Das komplexe *omb* Expressionsmuster ist wahrscheinlich in alle seinen Komponenten funktionsrelevant. In jedem Gewebe untersteht es in seiner Regulation einem spezifischen Netzwerk, von denen bisher nur einige bekannt sind. Die Zielgene von Omb sind, wie für die meisten Tbx-Proteine, noch nicht identifiziert.

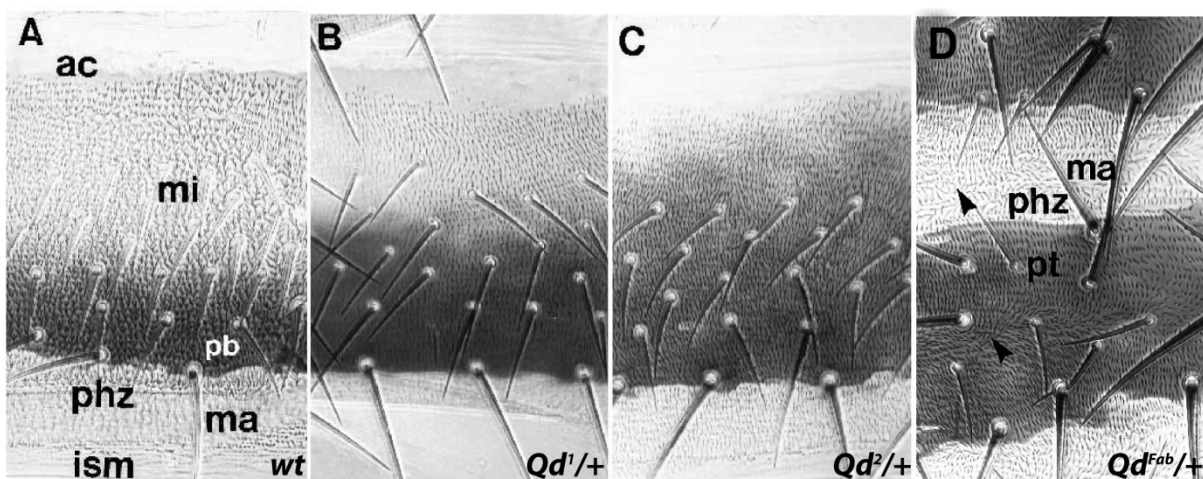


Abbildung 1.2: Verschiedene Phänotypen des hypermorphenen Allels Quadroon (nach Kopp and Duncan, 1997). (A) Wildtypische Pigmentierung des dritten abdominalen Segments. Jedes Segment besteht aus einer Tergite, die wiederum in drei Regionen unterteilt wird: Der Acrotergite (ac), die aus einer unbehaarten sklerosierten Cuticula besteht, die Mikrochaeten (mi) enthaltende anteriore Tergite und eine posteriore Region, die ein dunkles Pigmentband (pb), eine Reihe von Makrochaeten (ma) und eine unpigmentierte Region (phz) enthält. Aufeinanderfolgende Tergiten verbindet die intersegmentale Membran (ISM). Das komplette Segment, bis auf Acrotergite und intersegmentale Membran (ism), ist mit Trichomen versehen. Alle Trichome und Borsten sind

von Anterior nach Posterior orientiert. **(B)** und **(C)** zeigen heterozygote Abdomen des Phänotyps Qd^1 und Qd^2 bei denen sich der Pigmentstreifen in unterschiedlichem Ausmaß zum Anterieren hin ausdehnt. Beide Mutationen haben keine Auswirkung auf die Polarität des Segments. **(D)** In Qd^{Fab} heterozygoten sind Polarität sowie Formation der Borsten stark gestört. Anteriore Strukturen sind durch Spiegelbild-symmetrische Duplikationen von posterioren Strukturen (pt und phz) ersetzt. Pfeilkopf markiert die Symmetrieachse.

1.3 Regulation von *optomotor-blind* durch CRMs

Die Transkription von *omb* steht unter der Kontrolle vieler regulatorischer Regionen, die vor, in sowie hinter der *omb*-Transkriptionseinheit (*omb*-TU) liegen können (Abassi, 2007; Hofmeyer, 2001; Hofmeyer et al., 2008; Mayer, 2008; Sivasankaran et al., 2000). Der *omb* Locus, gelegen auf dem X-Chromosom im Bereich 4C5-6, gehört mit einer Größe von etwa 160kb zur Gruppe der größten Gene in *Drosophila* (Pflugfelder et al., 1990). Die etwa 70kb lange Transkriptionseinheit wird von regulatorischen Sequenzen flankiert. Dabei kann das mehr als 41kb stromaufwärts gelegene Gen CG3626 als distale und das 45kb stromabwärts gelegene Gen CG3556 als proximale Grenze angesehen werden (Abbildung 1.3) (Pflugfelder, 2009). Die 5' regulatorische Region (*upstream regulatory region* = URR) wurde durch P[lacW] Enhancer-Trap Insertionen identifiziert (Sun et al., 1995). Die URR enthält 22kb stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts (TSS) einen Flügel-spezifischen Enhancer. Dieser beinhaltet eine Bindestelle des *decapentaplegic* (*dpp*)-regulierten DNA-Bindeproteins Brinker (Brk) (Sivasankaran et al., 2000). In der Flügelimaginalscheibe wird *omb* durch *dpp* und *wingless* (*wg*) reguliert (Grimm and Pflugfelder, 1996). Das zu TGF- β homologe *dpp* agiert als Morphogen: Die Bindung von Dpp an spezifische Rezeptoren führt zur Phosphorylierung von Smad-Proteinen (in *Drosophila* Mad), die mit weiteren Proteinkomplexen assoziieren. Im Nukleus binden diese direkt an spezifische Sequenzen und regulieren somit ihr Zielgen (Kim et al., 1997). Die Regulation von Dpp-Zielgenen durch Brk stellt ein weiteres Modell der Dpp-Regulation dar. Brk ist ein transkriptioneller Repressor und wird negativ von Dpp reguliert (Campbell and Tomlinson, 1999). Bindet Brk an den in *omb* identifizierten Flügelenhancer, wird die *omb*-Expression in der Flügelimaginalscheibe reprimiert.

Desweiteren wurde die Rolle der URR durch Deletion eines 28,5kb großen Bereichs dieser Region untersucht (Shen et al., 2008). Die deletierte Region enthielt den von Sivasankaran (2000) identifizierten Flügelenhancer. Tatsächlich zeigten hemizygoter Männchen einen *bifid*-ähnlichen Phänotyp mit distal verkürzten Flügeln bei adulten Tieren und Reduktion der Omb-Expression in der *pouch* Region der Flügelimaginalscheibe im Larvenstadium. Homozygote Weibchen waren letal. Dies bestätigt, dass sich in dem deletierten Bereich wichtige regulatorische Elemente befinden. Die unveränderte Omb-Expression in der *hinge* und Pleura-Region von Flügelimaginalscheiben hemizygoter Mutanten besagt jedoch auch, dass zusätzliche Enhancer außerhalb des deletierten

Bereichs die *Omb* Expression regulieren. In Enhancer-Reporter Analysen überlappender Fragmente des nahezu gesamten *omb*-Locus wurden weitere Regionen identifiziert, die Reporter-gen-Expression in der Flügelimaginalscheibe, sowie Augen- und Beinimaginalscheibe trieben (Abassi, 2007; Hofmeyer, 2001; Mayer, 2008; Sivasankaran et al., 2000).

Eine 45kb lange regulatorische Region wurde stromabwärts der *omb*-TU als *optic lobe regulatory region* (OLR) identifiziert (Brunner et al., 1992). Deletion der kompletten Region oder Teile der Region führten zu zahlreichen neuroanatomischen Defekten in den optischen Loben, die mit Störungen im visuellen Verhalten assoziiert sind. Durch die Analyse verschiedener Mutationen und deren resultierenden Phänotypen wurde die OLR in drei Subregionen unterteilt, von denen OLR1 an die *omb*-TU angrenzt und OLR3 am weitesten entfernt liegt. In diesen Regionen wurden Enhancer charakterisiert, die *omb*-Expression in der Entwicklung der optischen Loben treiben (Hofmeyer, 2001).

Einige Komponenten der Regulation des komplexen *Omb*-Expressionsmusters sind bisher gut charakterisiert, jedoch ist das komplette Expressionsmuster noch nicht verstanden. In dieser Arbeit soll die Regulation von *Omb* in der Entwicklung des adulten Abdomens untersucht werden.

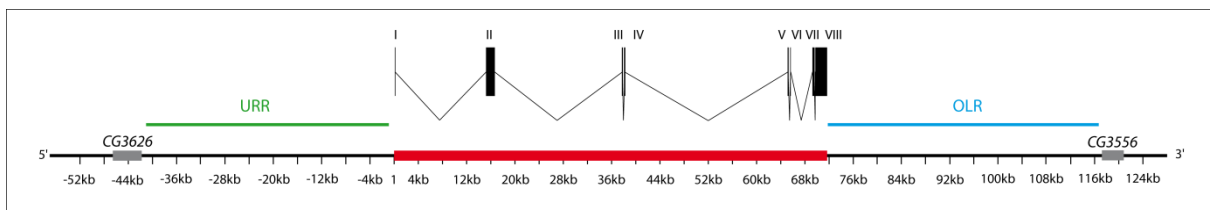


Abbildung 1.3: Die *omb*-Transkriptionseinheit mit 5' und 3' gelegenen regulatorischen Regionen. Die Skala ist in kb angegeben. Punkt 1 der Skala bezeichnet den Transkriptionsstartpunkt (TSS) von *omb*. Die *omb*-TU ist durch das Exon-Intron Muster über und die rote Markierung auf der Skala gekennzeichnet. Die 5' regulatorische Region (URR = *upstream regulatory region*) reicht bis zum distal benachbarten Gen CG3626. Die 3' regulatorische Region, als *optic lobe regulatory region* (OLR) identifiziert (Brunner et al., 1992), reicht bis zum proximal angrenzenden Gen CG3556.

1.4 Entwicklung der Tergiten bei *Drosophila melanogaster*

Die Körpersegmente des adulten Abdomens werden von einer sklerotisierten Tergite und einer flexiblen intersegmentalen Membran gebildet. Die Tergite besteht, wie in Abbildung 1.2 beschrieben, aus drei Regionen, der Acrotergite, der anterioren sowie der posterioren Tergite. Die intersegmentale Membran (ISM) verbindet aufeinander folgende Tergiten.

Das Epithel des adulten Abdomens von *Drosophila* wird während der Metamorphose gebildet. Die Epidermis geht aus Zellen hervor, die während der Embryogenese festgelegt und als Histoblastennester organisiert werden. Die Hemisegmente des Embryos enthalten jeweils vier Histoblastennestpaare, je zu beiden Seiten der dorsalen Mittellinie, aus denen die adulten Segmente

hervorgehen. Das anteriore und posteriore dorsale Histoblastennest aus dem sich die Tergite und die intersegmentale Membran entwickeln, das ventrale Histoblastennestpaar, aus dem die Sterniten und Pleuriten hervorgehen, sowie das spirakale Histoblastennestpaar, welches die Spirakeln und das Pleuriten umgebende Gewebe formt (Madhavan and Madhavan, 1980) (Abbildung 1.4 A und B). Im Gegensatz zu den Zellen der Imaginalscheiben untergehen abdominale Histoblasten während der Larvalentwicklung keiner Proliferation, sondern sind mitotisch stillgelegt und in der G₂-Phase des Zellzyklus gefangen. In dieser Zeit vergrößert sich ihr Volumen um das 60-fache. Durch einen Puls des Steroidhormons Ecdyson wird die Metamorphose eingeleitet (Riddiford, 1993). Mit Beginn der Metamorphose fangen die Histoblasten an zu proliferieren und durchleben biphasisch regulierte Zellteilungen. In der prä-pupalen Phase (4-12h *After Pupa-rium Formation*, APF) untergehen die Zellen einer raschen synchronen Proliferation mit einer Verdopplungszeit von zwei Stunden. Das Zellwachstum setzt in dieser Phase aus. So wird die Zellgröße reduziert und die Zellzahl erhöht, wobei die Größe des gesamten Histoblastennests unverändert bleibt. Durch einen weiteren Ecdysonpuls wird die darauf folgende pupale Phase (15-36h APF) eingeleitet, in der sich die Zellteilung auf eine Verdopplungszeit von neun Stunden verlangsamt und das Zellwachstum wieder einsetzt. Die Zellteilung wird asynchron. In dieser Phase beginnen die Histoblastennester zu expandieren und in die Territorien der sie umgebenden polypoloiden larvalen Epidermiszellen (*larval epithelial cells*, LECs) zu dringen. Einzelne führende Histoblasten interkalieren dabei aktiv zwischen benachbarte LECs. Die darauf folgende Expansion des Histoblastennests ist zum größten Teil eine Konsequenz des Zellwachstums. Zwischen 15 und 18h APF fusionieren das anteriore und posteriore dorsale Histoblastennest eines Segments zu einem großen dorsalen Histoblastennest. Dieses fusioniert wiederum ab 18h APF mit den dorsalen Histoblastennestern benachbarter Segmente. Eine Fusion des ventralen und spirakalen Nests findet zwischen 18 und 22h APF statt und eine Fusion von dorsalem und spirakalen zwischen 22 und 24h APF. Die Entwicklung der dorsalen Epidermis ist mit der Fusion der rechten und linken dorsalen Nester an der dorsalen Mittellinie um 40-42h APF abgeschlossen. Die Expansion der Histoblastennester korreliert direkt mit der apikalen Konstriktion der LECs. Simultan mit der Nestexpansion extrudieren LECs und sterben unter dem Epithel ab. Der zweite Ecdyson Puls der Pupalentwicklung koordiniert die Expansion der Histoblastennester und die apikale Konstriktion der LECs. Nach der Extrusion der LECs werden diese umgehend in der basalen Lamina von Hämocyten phagozytiert. (gesamter Abschnitt: Madhavan and Madhavan, 1980; Ninov et al., 2007; Ninov et al., 2010).

Ab 24h APF sind erste Differenzierungsprozesse der dorsalen Histoblasten zu beobachten. Ab 32h APF bilden sich am posterioren Ende jedes Segments einzellige nach innen reichende Fortsätze, an denen dorsale longitudinale Muskelstränge des sich entwickelnden adulten Tieres befestigt sind. Mit fortschreitender Entwicklung verkürzen sich diese Muskelstränge und ziehen somit das posteriore

Ende des Segments nach innen, so dass sich eine Falte entwickelt, die unter die Tergite reicht. Diese Falte enthält die intersegmentale Membran und die Acrotergite der darauf folgenden Tergite (Abbildung 1.4 D). Nach 36h APF beginnt die Differenzierung Borsten sezernierender Zellen, die zwischen 48 und 72h APF die Cuticula, Borsten und Haare produzieren. Mit 90h APF setzt die Pigmentierung der Borsten und Haare ein. Das dunkle Pigmentband in der posterioren Tergite wird erst nach Schlüpfen des adulten Tieres sichtbar (Madhavan and Madhavan, 1980).

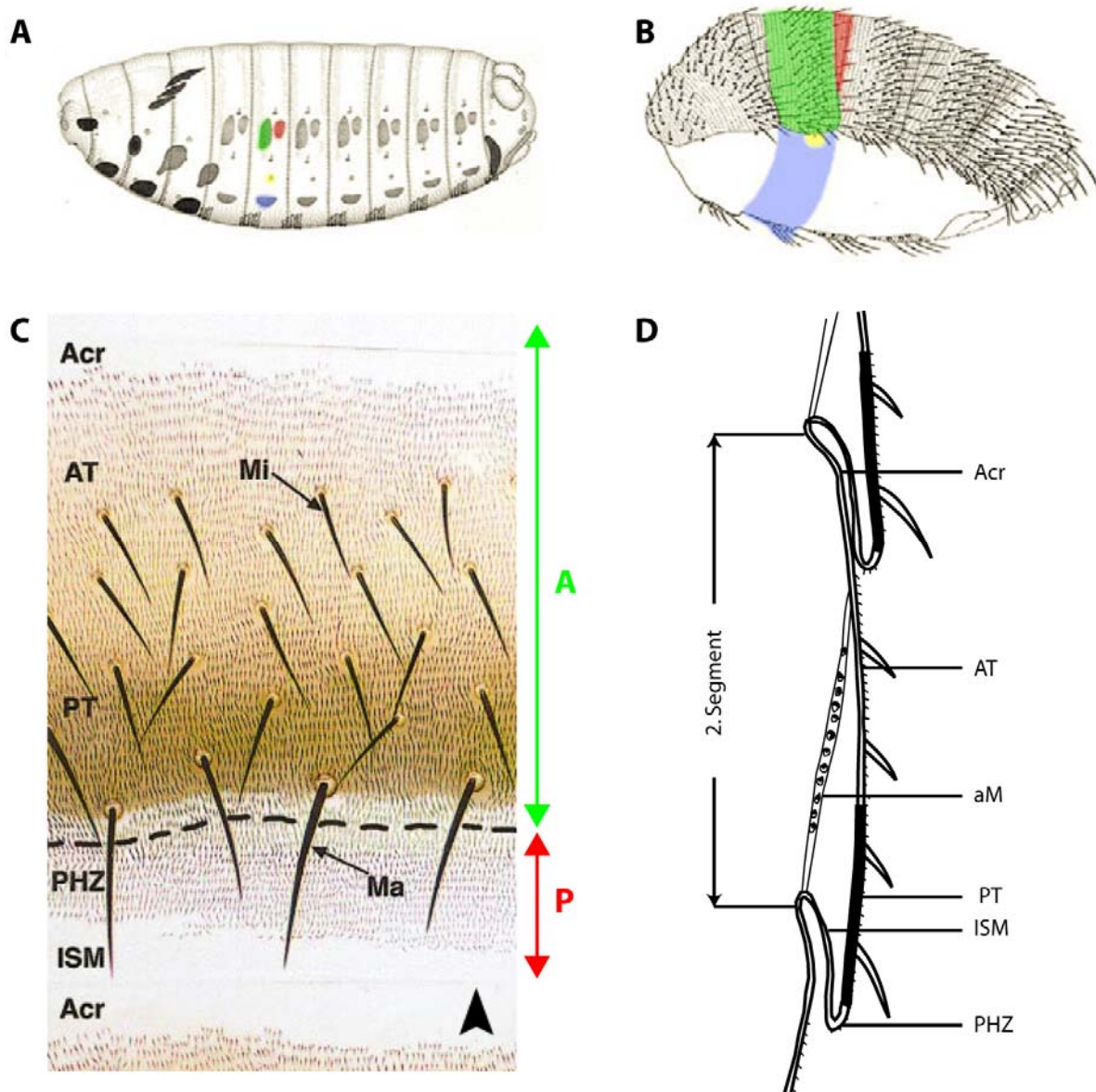


Abbildung 1.4: Entwicklung und Aufbau der adulten abdominalen Segmenten. (A) und (B) nach Ninov et al., 2007, (C) nach Kopp and Duncan, 2002, (D) leicht verändert nach Madhavan and Madhavan, 1980. (A) Organisation der Histoblastennestpaare in den abdominalen Hemisegmenten des Embryos: anteriores (grün) und posteriores (rot) dorsales Histoblastennest, ventrales Histoblastennestpaar (blau) und spirakale Histoblastennestpaar (gelb). Aus den Histoblastennestern entwickelt sich während der Metamorphose die adulte Tergite. (B) Aus dem anterioren Histoblastennest geht die Tergite (grün) und aus dem posterioren Histoblastennest die intersegmentale Membran (rot) hervor. Aus dem ventralen Histoblastennest entwickelt sich die Pleuriten und Sterniten (blau) und aus dem spirakalen die Spirakeln (gelb). (C) Dorsale Cuticula eines

wildtypischen adulten Segments. Der grüne Pfeil markiert das anteriore Kompartiment, der rote das posteriore. Die gestrichelte Linie stellt die Kompartimentgrenze dar, der Pfeilkopf markiert die Segmentgrenze. Acr: Acrotergite, AT: Anteriore Tergite, PT: Posteriore Tergite, PHZ: *Posterior hairy zone*, ISM: Intersegmentale Membran, Mi: Mikrochaete, Ma: Makrochaete. **(D)** Querschnitt des zweiten abdominalen Segments. aM: adulter longitudinaler Muskelstrang.

1.5 *optomotor-blind* in der Musterbildung des adulten Abdomens

Die Epidermis jedes Segments des adulten Abdomens ist, wie alle Segmente in *Drosophila*, in ein anteriores (A) und posteriores (P) Kompartiment unterteilt. Diese sind durch die Expression des Selektorgens *engrailed* (*en*) im posterioren Kompartiment definiert (Lawrence and Struhl, 1996). Durch die Expression von *en* in posterioren Kompartimenten wird die Expression des Morphogens Hedgehog (Hh) aktiviert (Lee et al., 1992). Daraufhin diffundiert Hh in das anteriore Kompartiment und aktiviert dort seine Zielgene, unter anderem den Transkriptionsfaktor *Cubitus interruptus* (*Ci*), den Hh-Rezeptor *patched* (*ptc*) und die Morphogene *decapentaplegic* (*dpp*) und *wingless* (*wg*) (Alexandre et al., 1996; Dominguez et al., 1996; Hepker et al., 1997; Ingham, 1993). Die Expression dieser Zielgene wird im posterioren Kompartiment durch *en* reprimiert (Sanicola et al., 1995). Hh und seine Zielgene werden in einem schmalen Streifen anteriorer Zellen, die an posteriore Zellen angrenzen, exprimiert. In der Flügelimaginalscheibe diffundieren von hier aus die Morphogene Dpp und Wg zu beiden Seiten der A/P-Grenze und aktivieren konzentrationsabhängig ihre Zielgene (Lawrence and Struhl, 1996). Im Abdomen grenzt das P-Kompartiment eines Segments an das A-Kompartiment des eigenen, und des darauf folgenden Segments. Das anteriore Kompartiment wird von der sklerotisierten Tergite und das posteriore Kompartiment von einer unpigmentierten und behaarten Region (*phz*: *posterior hairy zone*) sowie der intersegmentalen Membran gebildet (Abbildung 1.4 C und D). Hh diffundiert aus dem posterioren Kompartiment sowohl über die Kompartiments- als auch über die Segmentgrenze in das benachbarte anteriore Kompartiment (Kopp and Duncan, 2002). Dort agiert es direkt als Morphogen und spezifiziert Positionsinformation und Zellpolarität (Struhl et al., 1997). In der posterioren Tergite (PT, Abbildung 1.4 C und D) ist *omb* ein direktes Zielgen von Hh (Kopp and Duncan, 1997). Es wurde gezeigt, dass sowohl in *hh*⁻ wie auch in *omb*⁻ Mutanten Strukturen der posterioren Tergite durch anteriore Strukturen ersetzt wurden. Dementsprechend führte ektopische *omb* Expression in anterioren Bereichen des Segments zur Transformation von A zu P Strukturen. Ubiquitäre Hh Expression ergab ähnliche Phänotypen (Kopp and Duncan, 1997). *omb* Null-Mutationen hatten keinen Einfluss auf *hh* oder *en* Expression (Kopp and Duncan, 2002). Kopp et al., 1997 postulieren, dass anteriore Kompartimente des adulten Abdomens über einen *hh* unabhängigen grundlegenden Mechanismus verfügen, der

spiegelbildsymmetrisch anteriores Schicksal festlegt. Hh determiniert posteriores Schicksal und kehrt in Teilen des anterioren Kompartiments A in P Schicksal um. Diese Funktion wird von *omb* vermittelt. Die Musterbildung des adulten Abdomens wird während der ersten zwei Tage der Pupalentwicklung, einhergehend mit der Proliferation und Migration der Histoblastennester, festgelegt. Während dieser Zeit zeigen die Musterbildungsgene distinkte dynamische Expressionsmuster. Vor der Fusion des anterioren und posterioren dorsalen Histoblastennests (15-18h APF) wird *Omb* am posterioren Rand des anterioren und am anterioren Rand des posterioren Nestes exprimiert. Nach der Fusion zu einem dorsalen Histoblastennest wird *Omb* am stärksten auf der A/P-Grenze mit einem beidseitigen Gradienten exprimiert. Nach 40h APF wird die *Omb* Expression mit einer scharfen posterioren Grenze und einem nach anterior abfallenden Gradienten asymmetrisch (Kopp and Duncan, 2002).

1.6 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit werden hauptsächlich Aspekte der transkriptionellen Regulation von *omb* betrachtet. Dabei ist die Arbeit in zwei Hauptteile gegliedert.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Regulation von *omb* in der Entwicklung des adulten Abdomens und der Bedeutung von *Omb* in der Tergitenentwicklung. Bisher waren in *omb* keine Tergiten-spezifische regulatorische Sequenzen bekannt. Da Deletionen der *upstream* und der *downstream* gelegenen regulatorischen Regionen von *omb* keine abdominalen Defekte zeigten, wurde angenommen, dass abdominale *omb*-Expression durch intronische Sequenzen reguliert wird. In einem Enhancer-Reporter *screen* des *omb*-Locus soll der Tergiten-Enhancer identifiziert werden. Durch Identifikation der regulatorischen Sequenzen könnte die Anwesenheit von Bindestellen bestimmter Transkriptionsfaktoren Hinweise auf eine Abhängigkeit der *omb*-Expression von den entsprechenden Signaltransduktionskaskaden in der Tergitenentwicklung geben. Beispielsweise ist bekannt, dass *omb* in den Tergiten von der Hh-Signaltransduktionskaskade reguliert wird (Kopp and Duncan, 1997). Endogene Deletionen von identifizierten Tergiten-Enhancern sollten helfen die Notwendigkeit der regulatorischen Region zu beurteilen.

Die konservierte Größe der *up-* und *downstream* von *omb* gelegenen regulatorischen Regionen, sowie der intronischen Sequenzen innerhalb der 12 sequenzierten *Drosophila* Spezies geben einen Hinweis auf deren Notwendigkeit (Pflugfelder, 2009). Es wird vermutet, dass die morphologische Evolution zum großen Teil auf Veränderungen von regulatorischen Regionen beruht (Prud'homme et al., 2007). Da die Pigmentierung des Abdomens innerhalb der Familie der Drosophiliden äußerst polymorph ist, kann die Identifikation eines Tergiten-Enhancers einen Beitrag zur Evolutionsbiologie der abdominalen Pigmentierung liefern.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird zusätzlich zur räumlichen Aktivität der im ersten Teil identifizierten CRMs, deren zeitliche Aktivität analysiert. Die Aktivität der Tergiten-Enhancer Region und weiterer nicht-kodierender Sequenzen werden im Larvalstadium betrachtet und ein Zusammenwirken von Aktivator- und Repressor-Regionen untersucht. Desweiteren sollen Einflüsse auf die Expression von *omb*, wie der mögliche Einfluss von Polycomb/Trithorax Proteinen oder eine autoregulative Wirkung von Omb untersucht werden. Insgesamt soll diese Arbeit zum besseren Verständnis der Regulation des pleiotropen Gens *omb* beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Roth, Sigma-Aldrich und Biochemika bezogen.

2.1.2 Enzyme

2.1.2.1 Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen stammen von den Firmen NEB, Fermentas und Gibco. Für die entsprechenden Reaktionen wurden die Herstellerangaben befolgt.

2.1.2.2 Weitere Enzyme

Soweit nicht anders angegeben wurden die vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Puffer für die Reaktionen verwendet.

T4 DNA Ligase	invitrogen
RNaseA	Applichem
T4 Polynukleotidkinase	NEB
Phusion Polymerase	NEB
Pfu Ultra Polymerase	Stratagene
Taq Polymerase	QIAGEN
LongRange Polymerase	QIAGEN
QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Shrimp Alkaline Phosphatase	invitrogen
Bacterial Alkaline Phosphatase	invitrogen
Gateway LR Clonase Enzyme Mix	invitrogen

2.1.3 Bakterien

Es wurden folgende chemokompetente Bakterien verwendet.

One shot TOP10 Chemically competent <i>E. coli</i>	invitrogen
One shot TOP10 Chemically competent <i>E. coli</i>	selbst hergestellt
Library Efficiency DH5α Competent Cells	invitrogen

XL1-Blue supercompetent cells	Stratagene
XL 10-Gold Ultracompetent Cells	Stratagene

2.1.4 Lösungen und Puffer

2.1.4.1 Ethanolfällung

Natriumacetat Lösung	3M Natriumacetat (pH 7,0)
Ethanol	70% und 100%
TE-Puffer	10mM Tris-Cl (pH 8,0); 1mM EDTA

2.1.4.2 Phenol-Chloroform Extraktion

MaXtract High Desity Säulchen	QIAGEN
Phenol	Phenollösung
Natriumacetat Lösung	3M Natriumacetat (pH 7,0)
Chloroform/Isopentanol	24:1 Chloroform:Isopentanol
Ethanol	70% und 100%
TE-Puffer	10mM Tris-Cl (pH 8,0); 1mM EDTA

2.1.4.3 Isolierung genomischer DNA aus adulten Fliegen

Homogenisierungspuffer A	100mM NaCl; 100mM Tris-Cl (pH 7,5); 50mM EDTA; 0,5% SDS
Kaliumacetat-Lösung	8M Kaliumacetat
Natriumacetat-Lösung	3M Natriumacetat (pH 7,0)
LiCl/KAc-Lösung	1 : 2,5 (5M KAc : 6M LiCl)
TE-Puffer	10mM Tris-Cl (pH 8,0); 1mM EDTA

2.1.4.4 Plasmid Minipräparation (manuelle Labormethode)

GTE-Puffer	50mM Glucose, 25mM Tris, 10mM EDTA
P1 Puffer	(nach Angaben von Qiagen)
P2 Puffer	(nach Angaben von Qiagen)
P3 Puffer	(nach Angaben von Qiagen)
TE-Puffer	10mM Tris-Cl (pH 8,0); 1mM EDTA

2.1.4.5 Gelelektrophorese

5X Stop-Puffer (auch Gel-Ladepuffer)	15% Ficoll 400; 5% SDS; 0,05% Bromphenolblau; 0,05% Xylencyanol FF
--------------------------------------	--

10X TBE (Laufpuffer)	121,1g Tris; 61,8g Borsäure; 19,6g Na ₂ EDTA; auf 2 L mit dH ₂ O auffüllen
Agarose	0,6 – 0,8%ige Agarose Gele
Färbelösung	8 – 10 Tropfen wässrige Ethidiumbromidlösung (1mg/ml) pro 500ml dH ₂ O

2.1.4.6 Medien

LB- Medium	10g Tripton; 10g NaCl; 5g Hefeextrakt mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen
Agar-Platten	10g Tripton; 10g NaCl; 5g Hefeextrakt; 15g Agar mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen
S.O.C.-Medium	2% Tripton; 0,5% Hefeextrakt; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl ₂ ; 10mM MgSO ₄ ; 20mM Glucose
Carbenicillin	50mg/ml Carbenicillin-Stocklösung, Arbeitskonzentration 50µg/ml
Kanamycin	25mg/ml Kanamycin-Stocklösung, Arbeitskonzentration 50µg/ml
Spectinomycin	20mg/ml Spectinomycin-Stocklösung Arbeitskonzentration 100µg/ml

2.1.4.7 X-Gal Färbung

10XPBS	1,3M NaCl; 0,07M Na ₂ HPO ₄ ; 0,03M NaH ₂ PO ₄
PBTween	0,1% Tween20 in 1X PBS
Fixierlösung (Imaginalscheiben)	0,1M NaCacodylat Puffer pH 7,3; 0,75% Glutaraldehyd
Fixierlösung (pupale Abdomen)	PBTween (0,1% Tween20); 1% Glutaraldehyd
Färbelösung	1,5ml 50mM K ₄ (FeII(CN) ₆); 1,5ml 50mM K ₃ (FeIII(CN) ₆); 5ml 10XPBS; 42ml ddH ₂ O (ROTH);

50 µl 1M MgCl₂
 X-Gal Färbelösung Färbelösung + 1/30 Vol. X-Gal-DMF-
 Stammlösung (8%ig) (ROTH)
 Glycerol 50% und 70% Glycerol in 1XPBS

2.1.4.8 Antikörperfärbung an L3 Imaginalscheiben

PBT+BSA 1X PBS; 0,3% TritonX-100; 5%BSA
 Fixierlösung 4% Paraformaldehyd in 1XPBS
 Glycerol/Vectashild 1:1 (70% Glycerol in 1XPBS:Vectashild)

2.1.4.9 Antikörperfärbung an pupalen Abdomen

PBT 1X PBS; 0,1% TritonX-100
 PBTween 1X PBS; 0,1% Tween20
 PBT+BSA 1X PBS; 0,1% TritonX-100; 5%BSA
 Fixierpuffer 0,1M PIPES (pH 6,9); 1mM EDTA (pH 6,9);
 1% TritonX-100; 2mM MgSO₄
 Fixierlösung 1,85% Formaldehyd in Fixierpuffer
 Glycerol/Vectashild 1:1 (70% Glycerol in 1XPBS:Vectashild)

2.1.4.10 Antikörper

1. AK	Spezies	Firma	Verdünnung	2. AK	Spektrum	Verdünnung
α-Omb	Kanninchen	(Grimm and Pflugfelder, 1996)	1:1000	α-Kanninchen	Alexa488	1:250
α-βGal	Huhn	Abcam	1:1000	α-Huhn	Cy5	1:250
α-βGal	Maus	Promega	1:375	α-Maus	Cy3	1:250
α-Inv 4D9	Maus	DSHB	1:2-4	α-Maus	Cy3	1:250
α-repo	Maus	DSHB	1:5	α-Maus	Cy3	1:250

2.1.5 Kits

Hi Speed Plasmid Maxi Kit QIAGEN
 QIAprep Spin Miniprep Kit QIAGEN
 QIAquick PCR Purification Kit QIAGEN
 QIAquick Gel Extraction Kit QIAGEN
 QIAquick Nucleotide Removal Kit QIAGEN
 Fast Plasmid Mini Kit eppendorf

High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Quik Change II XL Site Directed	
Mutagenesis Kit	stratagene
pcR8/GW/TopoTA Cloning Kit	invitrogen
pCR XL Topo Cloning Kit	invitrogen

2.1.6 Oligonukleotide (Primer)

Alle verwendeten Primer wurden von Herrn Pflugfelder entworfen und von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Im Anhang sind alle Primer tabellarisch aufgelistet (siehe 7.2).

2.1.7 Laborgeräte

Kleine Laborgeräte, wie Thermoblöcke, Waagen, Vortexer, Glaswaren etc. wurden über die Firma Hartenstein bezogen.

Verbrauchsmaterialien, wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc. stammen von den Firmen Sarstedt, Eppendorf und Hartenstein.

2.1.7.1 PCR Gerät

Mastercycler Gradient	Eppendorf
-----------------------	-----------

2.1.7.2 Gelkammern für Gelelektrophorese

Elektro 4	Hybaid
Sub Cell® GT	Bio-Rad

2.1.7.3 Gel-Dokumentationssystem

Gel Jet Imager	Intas
----------------	-------

2.1.7.4 Pipetten

Labmate 100 – 1000µl	Abimed
Labmate 10 – 100µl	Abimed
Labmate 1 – 10µl	Abimed
Research 1 – 10µl	Eppendorf

2.1.7.5 Zentrifugen

Centrifuge 5424	Eppendorf
Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Rotina 35	Hettich
Sigma	B. Braun

2.1.7.6 Mikroskope und Binokulare

Konfokales Laser Mikroskop TCS SP2 (Leica)

Binokular MZ 10F (Leica)

Binokular M80 (Leica)

Mikroskop Axioplan 2 imaging (Zeiss)

2.1.7.7 Sonstige Laborgeräte

Mikrowellenofen Home Electric

2.1.8 Fliegenstämme

Stammnummer (nach GOP)	Genotyp	Bezeichnung	Herkunft/Referenz
47	y w omb- Gal4 ^{MD735} /FM7	ombP4	(Calleja et al., 1996)
55	y w omb ^{P3} /FM7	ombP3	(Calleja et al., 1996)
81	6252h/(FM7c)	ombP5	(Peter et al., 2002)
82	w P[lacW]X35	ombP1	(Sun et al., 1995)
83	w P[lacW]SY3-1 aka w omb ^{P2}	SY3-1	(Sun et al., 1995)
245	w; hh ^{ts2} /TM6B	hh ^{ts}	(Ma et al., 1993)
296	w; UAS-lacZ (II)	UAS-lacZ	von T. Raabe
297	w; UAS-lacZ (III)	UAS-lacZ	von T. Raabe
317	y w hs-GFP hs-flp FRT19/Y	hsp-HA-GFP-HA insert marked y+; all on X	von C. Dahmann
360	w1118; P[w+, UAS- lacZNLS] on II	UAS-lacZ (nucl)	von Y. Hiromi
427	y l(1)omb ^[282] f FRT19A/FM	y59b omb282 f36a FRT19A/FM6, line 2	(Kopp and Duncan, 1997)
451	l(1)omb[11];DpA1125/Gla		von A. Sen
492	y w hs-hid; hs-flp hs-l- Scel/TM3, hs-hid		(Huang et al., 2008)
504	w Gal4 ^{omb1} /FMO	ombP6	(Tang and Sun, 2002)
510	w 1.7k ⁵⁹ /?	omb-lacZ	(Tsai et al., 1997)
526	w/w	w ¹¹¹⁸	von R. Strauss
609	y w hs-hid; hs-flp hs-l- Scel/CyO, hs-hid		(Huang et al., 2008)
610	w; P[GawB] ^{477[w-]} ; TM2/TM6	Gal4-Linie	(Huang et al., 2008)

613	w; Pin/CyO; P[GawB] ^{221[w-]}	Gal4-Linie	(Huang et al., 2008)
631		SPE-B ombP9	(Peter et al., 2002)
632		SPE-C ombP9	(Peter et al., 2002)
633		SPE-D ombP11	(Peter et al., 2002)
698		hhMIR	(Kopp et al., 1997)
741	w omb[P7a]/FM7c	ombP7	(Tang and Sun, 2002)
851		QdFOR	
913	Cre; Sco/CyO		(Huang et al., 2008)
923	Cre; D/TM3,Sb		(Huang et al., 2008)
932	w; hs-flp ¹⁰		(Huang et al., 2008)
1042	l(1)omb[15]/FM-GFP	l(1)omb[15]	(Sen et al., 2010)
1067		ND674 ombP14	(Gerlitz et al., 2002)
1068		ND737 ombP14	(Gerlitz et al., 2002)
1069		S104 ombP15	(Gerlitz et al., 2002)
1070		ombP14	(Gerlitz et al., 2002)
1071		S44 ombP15	(Gerlitz et al., 2002)
1072		S46 ombP16	(Gerlitz et al., 2002)
1073		S570 ombP17	(Gerlitz et al., 2002)
1074		S7 ombP15	(Gerlitz et al., 2002)
V-239	w/w; CyO/Pm	CyO/Pm	O. Vef
V-796	w/w; TM3/TM6b	TM3/TM6	O. Vef

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Gelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese können DNA-Fragmente aufgetrennt, identifiziert und gereinigt werden. Hierfür wird ausgenutzt, dass DNA-Moleküle auf Grund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld wandern. Hauptladungsträger der DNA sind die negativ geladenen Phosphatgruppen des Rückgrates. Das Gel dient hierbei als Molekularsieb. Als Gelmatrix wurde für die Auftrennung von DNA in dieser Arbeit Agarose verwendet. Je nach Größe der aufzutrennenden Moleküle, wird die Agarosekonzentration und damit die Porengröße der Gelmatrix variiert. Moleküle, die im Vergleich zu den Poren der Matrix klein sind, wandern schneller im Gel als jene, die im Vergleich groß sind. Somit werden DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt und bilden auf dem Gel charakteristische Banden. In dieser Arbeit wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,6% bis 2% in 1X TBE Puffer, der gleichzeitig auch als Laufpuffer diente, verwendet.

Die Laufstrecke der DNA-Moleküle ist außerdem abhängig von der angelegten Feldstärke sowie der Konformation der DNA. Zirkuläre und lineare DNA-Moleküle gleichen Molekulargewichts haben unterschiedliche Laufeigenschaften durch die Gelmatrix. Bei niedrigen Spannungen ist die Laufstrecke der DNA proportional zur angelegten Spannung; höhere Spannungen haben eine unterschiedliche Wirkung auf die Mobilität großer DNA-Moleküle (Maniatis, 1982).

Vor dem Auftragen auf das Gel wurde der DNA-Lösung ein 5X Stop-Puffer zugesetzt. Dieser enthält unter anderem SDS, wodurch eventuelle in der Lösung oder an die DNA gebundene Proteine denaturiert werden und dadurch die Laufeigenschaften der DNA nicht beeinflusst werden. Um sicher zu gehen, dass alle Proteine und Enzyme denaturiert sind, wurde die DNA-Lösung vor dem Auftragen 3 Minuten bei 65°C inkubiert.

Nach Auftrennung der Fragmente wurde die DNA durch Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA. Die Menge des interkalierten Ethidiumbromids entspricht dabei der Masse des Moleküls. Ethidiumbromid wird unter UV-Licht angeregt und emittiert bei 590 nm. So können die fertigen Gele belichtet und fotografiert werden. Die Fragmentgrößen wurden anhand eines Molekulargewichtstandards (hier „MassRuler DNA Ladder Mix“ von Fermentas) bestimmt.

2.2.1.1 Gelextraktion

Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese können analytische wie auch präparative Zwecke haben. Nach der Auftrennung der Fragmente können bestimmte Banden durch eine Gelextraktion aus dem Gel extrahiert werden. Dazu wird die Bande unter UV-Licht aus dem Gel

ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ von Qiagen gereinigt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der selektiven DNA-Bindeeigenschaft einer Silica-Membran. Die gewünschten DNA-Fragmente binden bei einem bestimmten pH-Wert und einer bestimmten Salzkonzentration an die Membran. Unerwünschte Bestandteile wie Primer, Nukleotide, Proteine, Agarose usw. binden nicht an die Membran und werden entfernt. Salze werden durch Waschen mit einem ethanolhaltigen Puffer entfernt. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden in dieser Arbeit standardmäßig in 30µl TE-Puffer von der Membran eluiert.

2.2.2 Enzymreaktionen

2.2.2.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden können. Diese Erkennungssequenzen sind in der Regel 4 bis 8 Basenpaar lange palindromische Sequenzen und für jedes Enzym spezifisch. Restriktionsenzyme werden in drei Klassen eingeteilt. In der Gentechnologie werden Enzyme der Klasse 2 verwendet. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch einen versetzten Schnitt überhängende Enden kreieren. Durch die überhängenden Enden wird eine spätere Ligation erheblich erleichtert. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Restriktionsenzyme verwendet, die überhängende Enden produzieren und innerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden. Die Reaktionsbedingungen wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers gewählt.

Im folgenden ein Restriktionsansatz, wie er standardmäßig in dieser Arbeit durchgeführt wurde:

< 5µl DNA
2µl 10 X Enzympuffer
0,5µl Enzym

Mit ddH₂O auf 20µl auffüllen

Inkubiert wurde 1,5 Stunden bei 37°C.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Stopp-Puffer und je nach Enzym, durch Hitze, gestoppt.

2.2.2.2 Ligation

Bei einer Ligation werden zwei komplementäre Enden von doppelsträngigen DNA-Moleküle durch Bilden von kovalenten Bindungen miteinander verknüpft. Dabei werden von einer DNA-Ligase Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-Hydroxyl Ende des einen Moleküls und dem 5'-Phosphat Ende des anderen Moleküls gebildet. Somit können DNA-Fragmente unterschiedlicher Herkunft miteinander verknüpft werden. Beispielsweise können DNA-Fragmente mit einem Vektor ligiert werden um ein funktionstüchtiges Plasmid zu erhalten. Auf diese Weise können Abschnitte eines

Genoms in zirkuläre Vektoren einkloniert werden und durch Transformation (siehe 2.2.7) in Bakterienzellen vervielfältigt werden. Das molare Verhältnis von DNA-Fragment zu Vektor sollte bei der Ligation 3:1 betragen. So wird die Wahrscheinlichkeit einer Coligation erhöht. Zusätzlich wird die Selbstligation des Vektors durch Dephosphorylierung (siehe 2.2.2.3) der Enden des Vektors verhindert. Im Folgenden ein Ligationsansatz, wie er standardmäßig in dieser Arbeit für eine Coligation durchgeführt wurde:

- < 7µl DNA (davon 100ng Vektor-DNA)
- 2µl 5 X T4 DNA Ligase Puffer (Invitrogen)
- 1µl T4 DNA Ligase (Invitrogen)

Mit ddH₂O auf 10µl auffüllen

Inkubiert wurde über Nacht bei 18°C.

Eine weitere Anwendung der Ligation ist die Zirkularisierung eines linearen genomischen DNA-Fragments für die Durchführung einer iPCR (siehe 2.2.13.2). Um eine Selbstligation zu begünstigen wurde ein großes Volumen gewählt:

- 10µl verdaute genomische DNA
- 60µl 5 X T4 DNA Ligase Puffer (Invitrogen)
- 2µl T4 DNA Ligase (Invitrogen)

Mit ddH₂O auf 300µl auffüllen

Inkubiert wurde über Nacht bei 18°C.

2.2.2.3 Dephosphorylierung

Die Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung von 3'- und 5'-Phosphatgruppen von DNA, RNA und Nukleotiden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Enden von linearisierten Vektoren dephosphoryliert um deren Selbstligation zu verhindern. Dabei wurden die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) oder Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP) verwendet.

Die Enzyme wurden dabei in geeigneter Menge zum Restriktionansatz gegeben und 30 Minuten bei 37°C (SAP) oder 1 Stunde bei 65°C (BAP) inkubiert.

2.2.2.4 Phosphorylierung

Mit einer Polynukleotidkinase können 5'Enden von künstlich hergestellten Oligosnukleotiden phosphoryliert werden um anschließend miteinander ligiert zu werden. Die Phosphorylierungsreaktion wurde an einzelsträngigen Oligos durchgeführt und in ATP-haltigem Ligasepuffer durchgeführt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert:

10µl	Oligo (100µM)
4µl	5 X T4 DNA Ligase Puffer (Invitrogen)
1µl	T4 Polynukleotidkinase (Invitrogen)

Mit ddH₂O auf 20µl auffüllen

2.2.3 Annealing von Oligonukleotiden

Um Oligomere einer bestimmten Sequenz herzustellen und in ein Plasmid zu ligieren war es nötig zwei synthetische komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide zusammenzulagern. Um eine nachfolgende Ligation zu ermöglichen, mussten diese vorher an ihrem 5' Ende phosphoryliert werden (siehe 2.2.2.4). Durch Erhitzen auf 100°C wurden Komplexbildungen untereinander aufgelöst und während der anschließenden langsamen Abkühlung auf Raumtemperatur die Renaturierung der komplementären Einzelstränge zu Doppelsträngen ermöglicht. Durch anschließende Ligation der doppelsträngigen Oligonukleotiden konnten Oligomere hergestellt werden.

2.2.4 Ethanolfällung

DNA kann, beispielsweise nach Enzymreaktionen, durch eine Fällung mit Ethanol gereinigt und somit von störenden Salzen und Enzymen befreit werden. Vor der Fällung wird 1/10 des Volumens an 3M Natriumacetat und das 2,5-fache Volumen an Ethanol (abs.) zur DNA-Lösung gegeben. Durch die Zugabe von Natriumacetat wird das negative Rückgrat der DNA neutralisiert. Die Fällung der DNA erfolgt während einer 30 minütigen Inkubation bei -20°C. Dabei entzieht Ethanol der DNA die Hydrathülle, diese wird unlöslich und fällt aus. Um die DNA zu pelletieren wird die Lösung 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Um das Pellet zu waschen wird es erneut 1 Minute mit 500µl 70%igem Ethanol zentrifugiert. Das Pellet wird getrocknet und danach in TE-Puffer oder DEPC-behandeltem doppelt destilliertem H₂O gelöst.

2.2.5 Phenol-Chloroform Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen dient dem Entfernen von möglicherweise in späteren Reaktionen störenden Enzymen. Zur DNA-Lösung wird 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und 1 Volumen Phenol gegeben. Die Lösung wird 2 Minuten lang kräftig gevortext und danach 2 Minuten bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Lösung bildet nun 2 Phasen: eine obere wässrige Phase, in der die DNA enthalten ist und eine untere phenolhaltige Phase. Die untere Phase wird mit einer ausgezogenen Pasteurpipette entfernt. Zur wässrigen Phase wird erneut 1 Volumen des Gemischs Chloroform:Isopentanol (24:1) gegeben, kräftig gevortext und zentrifugiert. Die untere Phase wird verworfen. Dieser Schritt wird wiederholt. Nun wird eine Ethanolfällung der DNA aus der wässrigen Phase durchgeführt und die DNA danach in TE-Puffer gelöst.

Zur Vereinfachung wurden bei der Phenol-Chloroform Extraktion „MaXtract High Density“ Gefäße (QIAGEN) verwendet. Diese enthalten ein Gel, was basierend auf den unterschiedlichen Dichten die organische und wässrige Phase trennt. Die wässrige, Natriumacetat enthaltende DNA-Lösung wird in einem „MaXtract High Density“ Gefäß (QIAGEN) mit 1 Volumen Phenol und 1 Volumen Chloroform:Isopentanol (24:1) versetzt und wie oben beschrieben gevortext und zentrifugiert. Die organische Phase befindet sich nun unterhalb und die wässrige DNA-haltige Phase oberhalb des Gels. Die wässrige Phase wird abgenommen und zusammen mit 1 Volumen Chloroform:Isopentanol (24:1) zur Entfernung von Phenolresten in ein frisches „MaXtract High Density“ Gefäß (QIAGEN) gegeben und erneut gevortext und zentrifugiert. Anschließend wird die DNA aus der wässrigen Phase ethanolisch gefällt und in TE-Puffer oder H₂O gelöst.

2.2.6 Isolierung genomischer DNA aus adulten Fliegen

In dieser Arbeit wurden zur Isolierung genomischer DNA aus adulten Fliegen zwei verschiedene Protokolle angewandt. Zum einen eine Methode zur qualitativen Präparation von DNA (Labor-Methode) und eine schnellere zur Anwendung für die iPCR (nach Berkley Drosophila Genome Project, BDGP).

Labor-Methode:

- 50 adulte Tiere sammeln und bei -80°C einfrieren
- Homogenisierung im Mikrohomogenisator (Kontes) in 500µl Homogenisierungspuffer A
- Homogenisieren bis nur noch Reste der Cuticula erkennbar sind
- Homogenisat in 1,5ml Gefäß transferieren und 30min bei 68°C inkubieren
- 75µl 8M Kaliumacetat hinzugeben und invertieren
- 30min bei 0°C inkubieren
- 10min bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- 470µl des Überstands abnehmen und in ein frisches 1,5ml Gefäß transferieren
- 1ml 100% Ethanol hinzugeben, invertieren, hier können DNA-Schlieren sichtbar werden
- 5min bei RT inkubieren
- 5min bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- DNA sollte ein Pellet gebildet haben, Überstand entfernen
- Mit 500µl 70% Ethanol waschen, 2min zentrifugieren, Ethanol entfernen und Pellet trocknen
- In 360µl TE-Puffer 15min auf einem Schüttler lösen
- 1µl RNaseA (10mg/ml) hinzugeben, 10min 37°C
- 40µl 3M Natriumacetat hinzugeben und Phenol-Chloroform Extraktion durchführen
- In 50µl TE-Puffer auf einem Schüttler lösen

- Qualität der DNA auf einem 0,8%igen Agarosegel überprüfen

BDGP-Methode:

- 30 adulte Tiere sammeln und bei -80°C einfrieren
- Homogenisierung im Mikrohomogenisator (Kontes) in 200µl Homogenisierungspuffer A
- Weitere 200µl Homogenisierungspuffer A hinzugeben, Homogenisieren bis nur noch Reste der Cuticula erkennbar sind
- 30min bei 65°C inkubieren
- 800µl LiCl/KAc Lösung hinzugeben und mindestens 10min auf Eis inkubieren
- 15min bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- 1ml der Überstands in frisches 1,5ml Gefäß transferieren
- 600µl Isopropanol hinzugeben und 15min bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- DNA sollte ein Pellet gebildet haben, Überstand entfernen
- Mit 500µl 70% Ethanol waschen, 2min zentrifugieren, Ethanol entfernen und Pellet trocknen
- In 50-150µl TE-Puffer lösen

2.2.7 Transformation

Bakterienzellen besitzen die Fähigkeit fremde Plasmide aufzunehmen, in ihr Genom zu integrieren und zu replizieren. Dieses Phänomen wird als Transformation bezeichnet und beim molekulargenetischen Arbeiten zur Vervielfältigung von bestimmten Plasmiden ausgenutzt. Der Vorteil dieser Amplifikationsmethode liegt darin, dass sie sehr genau und effizient abläuft. Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten der Transformation: Transformation durch Hochspannungspuls (Elektroporation) und durch Hitzeschock (chemische Transformation). In dieser Arbeit wurde ausschließlich die chemische Transformation mit speziell angefertigten chemokompetenten Bakterien durchgeführt.

Zu den Aliquoten (40 bis 50µl) der chemokompetenten Zellen wurden 2 bis 5µl einer Ligationsreaktion hinzu gegeben und dann 30 Minuten auf feuchtem Eis inkubiert. Danach erfolgt bei 42°C für 30 Sekunden der Hitzeschock, wonach die Bakterien sofort wieder auf Eis platziert werden. Nach dieser Prozedur haben die Bakterienzellen das Plasmid aufgenommen. Nun werden die Zellen mit 250µl S.O.C.-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellen werden dann auf Agar-Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthalten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.8 „Topo-Klonierung“

Mit Hilfe der „Topo-Klonierung“ werden PCR-Produkte mit hoher Effizienz in einen Vektor kloniert. Hier wurden dazu das „Topo® XL PCR Cloning Kit“ und das „pCR®8/GW/Topo® TA Cloning® Kit“ von invitrogen verwendet.

PCR-Produkte, die von der Taq-Polymerase amplifiziert worden sind, besitzen an ihrem 3'-Ende ein überhängendes Adenosin. Der von diesen Kits bereitgestellte linearisierte Topo-Vektor ist mit 3' überhängenden Thymidin und einer kovalent gebundenen Vaccinia-Virus Topoisomerase I ausgestattet. Die Energie, die aus der Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats stammt wird in der kovalenten Bindung der Topoisomerase und des Vektors gespeichert. Diese Bindung kann durch Angriff des 5'-OH des PCR-Produktes zur Ligation in den Vektor genutzt werden. So können PCR-Produkte mit überhängendem 3'-Adenosin unspezifisch in den Vektor kloniert werden. Die Ligationsreaktion erfolgt in 5-20 Minuten und kann anschließend sofort in die mitgelieferten chemokompetenten Zellen transformiert werden. Alle Schritte dieser Cloning-Kits erfolgten nach Anweisungen des Herstellers.

Mit dem „Topo® XL PCR Cloning Kit“ können in den Topo-Vektor einklonierte DNA-Fragmente in Bakterienzellen amplifiziert werden und nach Plasmidpräparation durch bestimmte Restriktionsenzyme heraus geschnitten werden um für weitere Klonierungsschritte verwendet zu werden. Der Topo-Vektor des „Topo® XL PCR Cloning Kits“ ist mit dem Resistenzgen für Kanamycin und Zeozin ausgestattet. In dieser Arbeit wurde zur Selektion des Topo® XL PCR-Vektors mit Kanamycin gearbeitet.

Mit dem „pCR®8/GW/Topo® TA Cloning® Kit“ kann die „Topo-Klonierung“ mit der Gateway®-Technologie (invitrogen) kombiniert werden (siehe 2.2.9). Zur Selektion des pCR®8/GW/Topo®-Vektors wurde mit Spectinomycin gearbeitet.

2.2.9 „Gateway®-Technologie“

Die Gateway®-Technologie der Firma invitrogen ermöglicht, durch spezifische Rekombinationseigenschaften des Bakteriophagen Lambda (Landy, 1989), die schnelle und effiziente Klonierung von DNA-Abschnitten zwischen multiplen Vektor-Systemen. Hierbei findet ein Austausch des DNA-Fragments zwischen einem *entry vector* und einem *destination vector* durch Lambda-Rekombination statt. Lambda-Rekombination findet zwischen *attachment sites* (*att sites*) von Bakterien (*attB*) und Phagen (*attP*) mit Hilfe von Rekombinations-Proteinen statt. Dabei entstehen durch Rekombination von *attB* und *attP* sogenannte *attL* und *attR sites*. Diese *att sites* wurden für die Gateway®-Technologie so modifiziert, dass nur ein Austausch zwischen bestimmten *sites* stattfinden kann ($attL1 \rightarrow attR1$, $attL2 \rightarrow attR2$, $attB1 \rightarrow attP1$; $attB2 \rightarrow attP2$). Der *entry vector* zeichnet sich dadurch aus, dass das einklonierte DNA-Fragment von *attL1* und *attL2 sites* flankiert wird. Der *destination vector* trägt die dazu korrespondierenden *attR sites*, die eine das Zelltod Gen *ccdB*

enthaltende Kasette flankieren, so dass bei Zugabe eines Enzymmixes (hier „Gateway LR Clonase™ II Enzyme Mix“) das DNA-Fragment auf den *destination vector* und die *ccdB* Kasette auf den *entry vector* übertragen wird. Dieser Vorgang wird als LR-Rekombination bezeichnet. Das *ccdB* Gen dient nach Rekombination und Transformation der Negativselektion. Zur zusätzlichen Selektion tragen *entry* und *destination vector* unterschiedliche Antibiotika-Resistenz-Gene.

Als *entry vector* diente hier der Topo-Vektor des „pCR®8/GW/Topo® TA Cloning® Kits“ (Invitrogen) und als *destination vector* der Expressionsvektor pBPGUw (addgene) oder pGW-attB-lacZ (Hoffmann, 2011).

2.2.10 Bakterienkulturen

Zur weiteren Analyse von DNA ist es notwendig, diese in ausreichender Menge vorliegen zu haben. Bakterienstämme, die die relevante DNA durch Transformation aufgenommen haben, wurden in Übernachtskulturen vermehrt und anschließend präpariert. Je nach angestrebter Kultur wurde LB-Medium mit einigen µl der Bakterienkolonie versetzt. Zur Selektion der sich vermehrenden Bakterien wurde ein Antibiotikum (Carbenicillin oder Kanamycin; 50µg/ml) hinzugegeben und die Kultur bei 37°C geschüttelt.

2.2.11 Plasmidpräparationen

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurden mehrere Verfahren angewandt. Zur Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA, bei der die DNA nicht in einem sehr hohen Reinheitsgrad vorliegen musste, wurde eine manuelle Methode der Minipräparation angewandt. Um einen höheren Reinheitsgrad zu erlangen, wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) verwendet. Bei Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden die Midi und Maxi Kits der Firma QIAGEN verwendet. Der einzige Unterschied zwischen der manuellen Präparation und der der Kits besteht darin, dass die DNA nach der alkalischen Lyse bei der manuellen Methode nicht über Ionenaustauschersäulen von den restlichen Bestandteilen der Zellen, sondern nur durch Zentrifugation, abgetrennt wird.

2.2.11.1 Manuelle Plasmidpräparation

1,5 ml einer Bakterien Übernachtskultur werden durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 100 µl GTE-Puffer oder Qiagen P1 Puffer resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden 200 µl alkalische SDS-Lösung (Qiagen P2) hinzugegeben, durch intensives Fingerschnippen gemischt und 5 Minuten bei 0°C inkubiert. Als nächstes werden 150 µl saure Kaliumacetat-Lösung (Qiagen P3) zur Probe gegeben, kräftig gevortext und dann 2 Minuten bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Aus dem erneut abgetrennten Überstand wird eine Ethanol-Fällung der DNA durchgeführt und die DNA anschließend in 30-50 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.11.2 Plasmidpräparation nach verschiedenen Kits

Die Plasmidpräparation erfolgte nach Angaben der Hersteller.

2.2.12 Sequenzierung

Sequenzierungen von in dieser Arbeit hergestellten Plasmiden wurden von der Firma Starseq durchgeführt.

2.2.13 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Amplifikationsverfahren, mit dem von einer Matrizen-DNA selektiv viele identische Kopien hergestellt werden können. Der zu amplifizierende DNA Bereich ist durch zwei begrenzende Oligonukleotidsequenzen definiert. Anhand dieser Sequenzen werden komplementäre Primer (18-30 Basen lange Oligonukleotid-Moleküle) chemisch hergestellt, die dann in gegenläufiger Orientierung an die Matrize hybridisieren. Von hier aus erfolgt die DNA-Synthese. Für die Hybridisierung mit den Primern muss die Matrizen-DNA einzelsträngig vorliegen. Dies wird durch Erhitzen der DNA erreicht. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind im Anhang (siehe 7.2) aufgeführt.

Die PCR erfolgt in drei Anschnitten:

1. Denaturierung der Matrizen-DNA bei 90-95°C
2. Hybridisierung der Primer an die komplementäre Sequenz der Matrize bei 50-60°C (Annealing), wobei jeder Primer eine optimale Annealingtemperatur besitzt
3. DNA-Synthese ausgehend vom 3'OH-Ende der Primer entlang der Matrize durch die hitzestabile Taq-Polymerase bei etwa 70°C (Elongation)

Nach der Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige Matrizen-DNA wird durch eine hitzestabile DNA-Polymerase und zusätzliche dNTPs ein komplementärer DNA-Strang in 3'-Richtung an den Primer synthetisiert, wodurch ein neuer doppelsträngiger DNA-Abschnitt entsteht. Durch wiederholtes Erhitzen wird dieser Strang denaturiert. Die Primer können erneut binden und der DNA-Abschnitt wird synthetisiert. Dieser Zyklus wird 30 bis 40 Mal wiederholt, wodurch die Anzahl des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts exponentiell ansteigt.

2.2.13.1 Standard PCR/Long-Range PCR

Je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments wurde die jeweilige Polymerase ausgewählt. Fragmente, mit einer Größe von bis zu 2kb, wurden mit der Taq-Polymerase (QIAGEN) oder mit der Phusion Polymerase (NEB) amplifiziert. Für längere Fragmente wurde das LongRange Kit (QIAGEN) verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers gewählt. Im

Folgendes ist ein Beispiel eines Ansatzes aufgeführt, wie er für die Amplifikation mit der Taq-Polymerase durchgeführt wurde.

- 1µl Template DNA (50-500ng genomische DNA oder 1-10ng Plasmid DNA)
- 5µl 10X PCR Puffer (QIAGEN)
- 2µl dNTP Mix (10mM)
- 1µl Primer A (20µM)
- 1µl Primer B (20µM)

Mit H₂O auf 50µl auffüllen

Je nach Versuchsziel und Polymerase wurden die Reaktionsbedingungen gewählt. Im Folgenden ein PCR-Programm, wie es standardmäßig für eine Amplifikation mit der Taq-Polymerase durchgeführt wurde.

1	Initiale Denaturierung	3 min	94°C
2	Denaturierung	45 sec	94°C
3	Annealing	45 sec	T _m Primer – 5°C
4	Elongation	1 min/kb DNA	72°C
Schritt 2 – 4		30-35X wiederholen	
5	Finale Elongation	10 min	72°C
6	Ende	--	4°C

2.2.13.2 Inverse PCR

Die inverser PCR (iPCR) wurde zur Bestimmung des Insertionsortes von P-Elementen oder von unspezifischen Rekombinationsereignissen durchgeführt. Dazu wird die isolierte genomische DNA des zu untersuchenden Fliegenstamms mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut. Meist wird ein Restriktionsenzym mit einer 4bp langen Erkennungssequenz verwendet, das einmal im P-Element in der Nähe der invertierten Enden und einmal in einer unbekanntem Distanz in der benachbarten genomischen DNA schneidet. Die Wahrscheinlichkeit einer Schnittstelle in der Nähe des Insertionsortes wird durch die kurze Erkennungssequenz erhöht. Standardmäßig wurden hier die Restriktionsenzyme Sau3A I und HinP1 I verwendet. Nach Hitzeinaktivierung der Enzyme wird eine Ligation der verdauten genomischen DNA angesetzt. Dabei entstehen ringförmige DNA-Fragmente, von denen eines das P-Element Endfragment und seine benachbarte genomische DNA enthält. Nun wird eine PCR mit Primern durchgeführt, die am P-Element Ende binden. Einer dieser Primer bindet kurz vor dem invertierten Ende des P-Elements und ist nach außen gerichtet, der zweite Primer bindet kurz von der Schnittstelle des Restriktionsenzym und hat eine umgekehrte Orientierung zum ersten Primer. Eine Auflistung der verwendeten Primerpaare findet sich in Tabelle 2.1. Durch

Amplifikation des ringförmigen DNA-Fragments entsteht ein Amplifikat, das von P-Elementsequenzen flankiert wird und die bis zur Schnittstelle des jeweiligen Restriktionsenzym benachbarte genomische DNA enthält. Durch Sequenzieren des Amplifikats und anschließenden abgleich mit der Genomdatenbank kann der Insertionsort bestimmt werden. Zur besseren Sequenzierung wurde das Amplifikat in den pCR-XL-Topo Vektor kloniert.

Tabelle 2.1: Für inverse PCR verwendete Primerpaare

Primerpaar	Bindeort	Oligonummer
Plac4/Plac1	5' P-Element Ende	580/451
Pry4/Pry1	3' P-Element Ende	477/1151
Pry2/Pry1	3' P-Element Ende	1152/1151
dsh1/dsh2	dsh Δ ombTU10-1	1312/1313
ush1/ush2	ush Δ ombTU10-1	1314/1315

2.2.13.3 Site-directed Mutagenesis

Mit der *site-directed Mutagenesis*, auch Mutagenese PCR, können bestimmte Sequenzen einer Matrizen-DNA so mutiert werden, dass einige Basen durch andere ausgetauscht werden. So werden beispielsweise Schnittstellen von Restriktionsenzymen in einem Plasmid zerstört oder modifiziert. Hierfür werden mutagene Primer synthetisiert, die die gewünschte Mutation enthalten und in entgegengesetzter Orientierung an den komplementären Strängen der zu mutierenden Sequenz binden. Von den mutagenen Primern ausgehend wird das Plasmid amplifiziert und ein neues, die Mutationen enthaltende Plasmid generiert. Um nach der PCR das mutante Plasmid zu selektieren, wird der Ansatz mit der Endonuklease DpnI behandelt. DpnI verdaut methylierte und hemimethylierte DNA, wie sie nach Amplifikation durch *E.coli* vorliegt. Als Folge wird die aus Bakterien isolierte Matrizen-DNA verdaut, das während der PCR entstandene Plasmid jedoch nicht. Durch anschließende Transformation wird das neu synthetisierte Plasmid in Bakterien aufgenommen und vervielfältigt.

2.2.13.4 Pool PCR

Die *Pool PCR* ist eine Methode mit der viele Bakterienkolonien nach einer Transformation auf ein bestimmtes Ereignis überprüft werden können. Sie wurde für die Überprüfung von seltenen Ereignissen, beispielsweise der Ligation eines Vektors mit Oligomeren, angewandt. Hierfür wurden 5-10 Bakterienkolonien „gepoolt“, das heißt eine Flüssigkultur wurde mit 5-10 Einzelkolonien beimpft. Vor dem Beimpfen wurden die Einzelkolonien auf einer Agarplatte, die das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausgestrichen und nummeriert, so dass die Einzelkolonien dem jeweiligen *Pool* zuzuordnen waren. Nach Plasmidpräparation wurde eine PCR mit Primerpaaren, die das neu

eingefügte oder manipulierte DNA-Stück flankieren, durchgeführt. Die PCR wurde durch Gelelektrophorese überprüft und anhand der Höhe der Banden auf dem Gel der Erfolg der vorhergehenden Ligation festgestellt. Waren in einem PCR Ansatz eines Pools Banden der erwarteten Größe zu sehen, wurde jede Einzelkolonie des Pools überprüft und so das positive Ereignis ermittelt.

2.2.14 Anhängen von A-Überhängen an PCR-Produkte (A-Tailing)

Für die Ligation eines PCR-Produktes mit dem Topo-Vektor werden A-Überhänge am PCR-Produkt benötigt. Bei Amplifikation mit der Phusion Polymerase (NEB) entstanden PCR-Produkte mit stumpfen Enden, denen A-Überhänge versehen werden mussten. Dazu wurde das gereinigte PCR-Produkt unter Zugabe von Taq-Puffer, dATPs und Taq-Polymerase für 15 min bei 70°C inkubiert und danach für die Topo-Klonierung eingesetzt.

2.2.15 Herstellung von *enhancer-reporter* Konstrukten für die Transgenese

Um genomische DNA-Sequenzen auf *enhancer* Aktivität zu testen, wurden diese in *enhancer-reporter* Vektoren kloniert und mittels Keimbahntransformation in das Genom von *Drosophila* integriert. Als *enhancer-reporter* Vektoren dienen Expressionsvektoren, die ein artfremdes Reportergen tragen, das unter der Kontrolle eines schwachen Promotors steht. Die Transkription des Reportergens wird erst durch die Anwesenheit eines Enhancer-Elements in der in den Expressionsvektor einklonierten genomischen Sequenz merklich aktiviert. Diese Reportergenexpression kann nun über histologische oder immunohistologische Methoden sichtbar gemacht werden.

Hier wurden definierte Abschnitte des *omb*-Locus von *Drosophila melanogaster* mittels PCR amplifiziert und in einen Topo-Vektor subkloniert (siehe 2.2.8). Der verwendete Topo-Vektor richtete sich nach Art des Expressionsvektors. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Vektorsysteme verwendet (Abbildung 2.1). Als konventioneller P-Elementvektor diente der pHPelican (Barolo et al., 2000). pHPelican trägt als Reportergen das *lacZ*-Gen, das aus *E. coli* stammend für β -Galaktosidase kodiert und unter Kontrolle des Hsp70 Promotors steht. DNA-Fragmente, die in den pHPelican kloniert wurden, wurden im pCR-XL-Topo Vektor subkloniert und über Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor gebracht. Als zweites wurden die Gateway® (siehe 2.2.9) kompatiblen *destination* Vektoren pBPGUw (addgene) und pGW-attB-lacZ (Hoffmann, 2011) verwendet. Ein Vorteil dieser Methode ist die Restriktionsenzym-freie Klonierung des DNA-Fragments aus dem pCR8/GW/Topo-Vektor in den Zielvektor durch LR-Rekombination. pBPGUw besitzt als Reportergen das aus der Hefe stammende *Gal4*-Gen, das unter der Kontrolle des *Drosophila synthetic core promoters* steht. Gal4 kodiert für einen transkriptionellen Aktivator, der die Expression eines weiteren Reportergens durch binden an eine stromaufwärts gelegene *upstream activating sequence* (UAS) aktiviert (Gal4/UAS System; (Brand and Perrimon, 1993)). Im pGW-attB-lacZ ist die *Gal4*-Kassette des pBPGUw durch das *lacZ*-Gen ersetzt und kann somit direkt Reportergenexpression

treiben. Ein weiterer Vorteil dieser Vektoren ist die gerichtete Insertion ins *Drosophila* Genom durch Anwesenheit einer *attB* site im Vektor und *attP* sites im Genom bestimmter Injektionslinien mit Hilfe der ϕ C31 Integrase (siehe 2.3.1.2). Tabelle 3.9 im Kapitel 3.2.1 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und untersuchten *enhancer-reporter* Konstrukte.

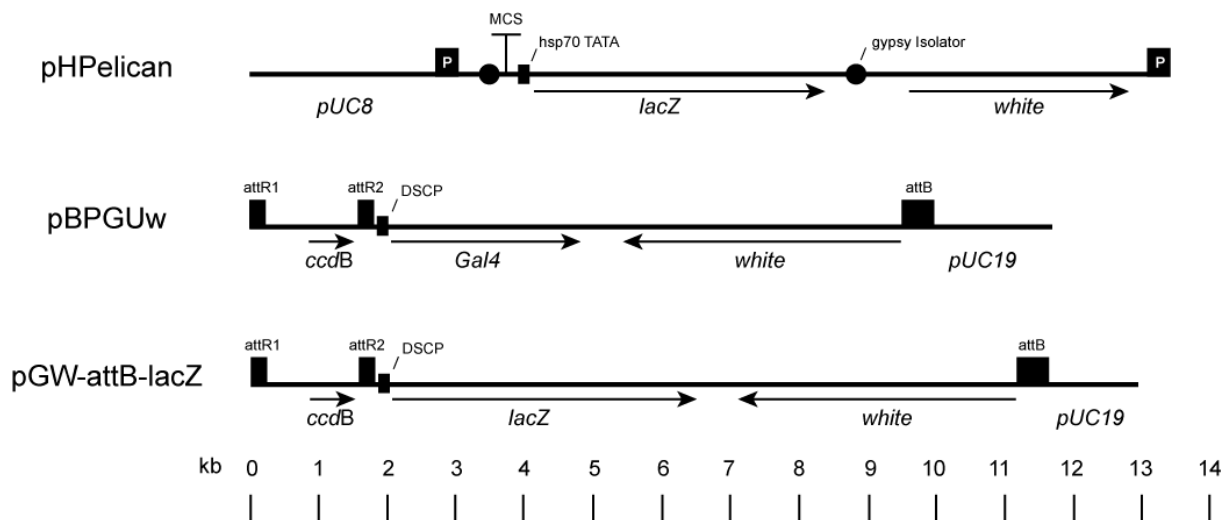


Abbildung 2.1: In dieser Arbeit verwendete Expressionsvektoren. Der P-Element Vektor pHPelican trägt *white* als Markergen und *lacZ* unter Kontrolle des schwachen Promotors Hsp70 als Reportergen. Vor den Hsp70 Promotor können DNA-Fragmente über die *Multiple Cloning Site* (MCS) in den Vektor kloniert werden. Einklonierte Fragmente und *lacZ* werden von Isolatoren aus dem transposablen Element *gypsy* flankiert. Die schwarzen mit ‚P‘ markierten Boxen stellen die P-Element Enden dar. Durch seinen *pUC8*-Anteil besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz. Die Gateway® destination Vektoren pBPGUw und pGW-attB-lacZ besitzen *white* als Markergen. pBPGUw trägt *Gal4* und pGW-attB-lacZ *lacZ* unter der Kontrolle des *Drosophila synthetic core promoters* (DSCP) als Reportergen. Über LR-Rekombination zwischen *attR1* und *attR2* des jeweiligen destination Vektors und *attL1* und *attL2* des pCR8/GW/Topo Vektors (hier nicht abgebildet) können DNA-Fragmente in den Vektor gebracht werden, wobei die das Zelltodgen *ccdB* enthaltene Kasette auf den Topo-Vektor übertragen wird. Die *attB* site dient der gerichteten Insertion ins *Drosophila* Genom. Durch ihren *pUC19* Anteil besitzen beide Vektoren Ampicillin-Resistenz. Pfeile geben die Richtung der Transkription an.

2.2.16 Herstellung von Deletionskonstrukten für die homologe Rekombination

Zur Erzeugung endogener Deletionen durch homologe Rekombination wird eine extrachromosomale Donorkassette benötigt. Der genaue Vorgang der Erzeugung einer endogenen Deletion wird im Kapitel 2.3.2 beschrieben. Die extrachromosomale Donorkassette entstammt einem durch P-Element Transformation ins Genom gelangtem Deletionskonstrukt. Hier wurde der von Huang et al. entworfene Vektor pGX-attP verwendet (Huang et al., 2009) (Abbildung 2.2). Dabei handelt es sich um einen P-Element Vektor, der die durch Flippase mobilisierbare Donorkassette trägt. In der Kasette sind zwei multiple Klonierungsstellen (5' und 3' MCS) enthalten. In diese werden zur genomischen Sequenz homologe Sequenzen, die die Zielsequenz proximal und distal flankieren, kloniert. In diesen Homologiearmen soll die homologe Rekombination stattfinden. Diese flankieren

den Bereich, der durch homologe Rekombination ins Genom gelangt und die zu deletierende Zielsequenz ersetzt. Darin enthalten sind eine *attP* site und ein durch loxP flankiertes *white*-Markergen. Zusätzlich besitzt der Vektor zur Negativselektion von nicht-gezielten Rekombinationsereignissen das Zelltodgen *reaper* (*rpr*) mit davor liegender UAS-Sequenz, so dass es bei Anwesenheit von Gal4 aktiviert werden kann.

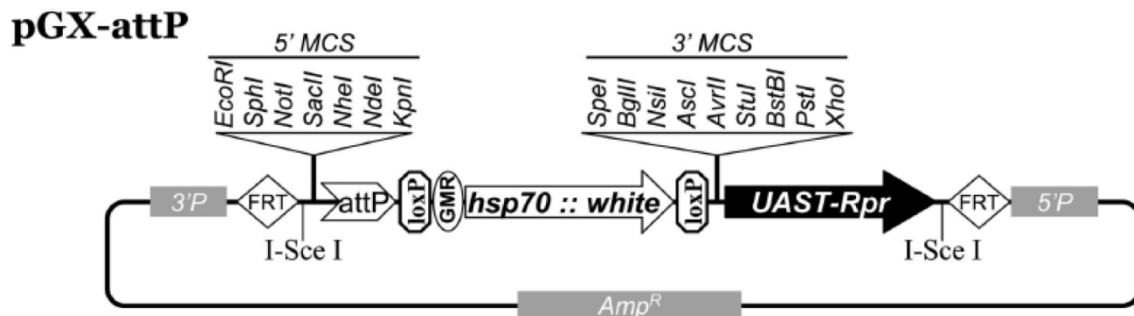


Abbildung 2.2: Deletionsvektor pGX-attP (Huang et al., 2009)

Zur Klonierung des Deletionskonstrukts wurde eine dreistufige Strategie verfolgt (Abbildung 2.3):

- 1) *Amplifikation der proximal und distal die Zielsequenz flankierende Bereiche (im Folgenden *ush* = „upstream homology“ und *dsh* = „downstream homology“ genannt)*

Zur Amplifikation der Homologie-Regionen *ush* und *dsh* wurden *linker*-Primer verwendet, die die gewünschten Restriktionsschnittstellen entsprechend der gewählten Schnittstelle der jeweiligen MCS des pGX-attP an das PCR-Produkt anhängen. In Abbildung 2.3 steht „Primer A“ für den *linker*-Primer mit der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym A, usw. Bei der Wahl der Enzyme war darauf zu achten, dass die Enzyme weder in den Homologie-Sequenzen selbst noch im pGX-attP außerhalb der MCS schneiden. Die PCR wurde mit der LongRange Polymerase (QIAGEN) durchgeführt.

- 2) *Subklonierung der *ush* und *dsh* im pCR-XL-Topo Vektor (invitrogen)*

Nach Gelextraktion wurden die Homologie-Regionen in den pCR-XL-Topo kloniert und nach Analyse und Maxipräparation mit den jeweiligen, durch die *linker*-Primer angefügten Restriktionsenzymen präparativ isoliert.

- 3) *Klonierung der *ush* und *dsh* in den pGX-attP Deletionsvektor*

Die aus dem Topo-Vektor isolierten Homologie-Regionen wurden sequentiell in den pGX-attP Deletionsvektor ligiert. Dieser musste durch Restriktionsverdau mit den jeweiligen Enzymen linearisiert werden. Welche der Homologie-Regionen in welche MCS des Vektors kloniert wurde, wurde durch die später gewünschte Orientierung der *attP* site im Genom nach erfolgreicher homologer Rekombination bestimmt.

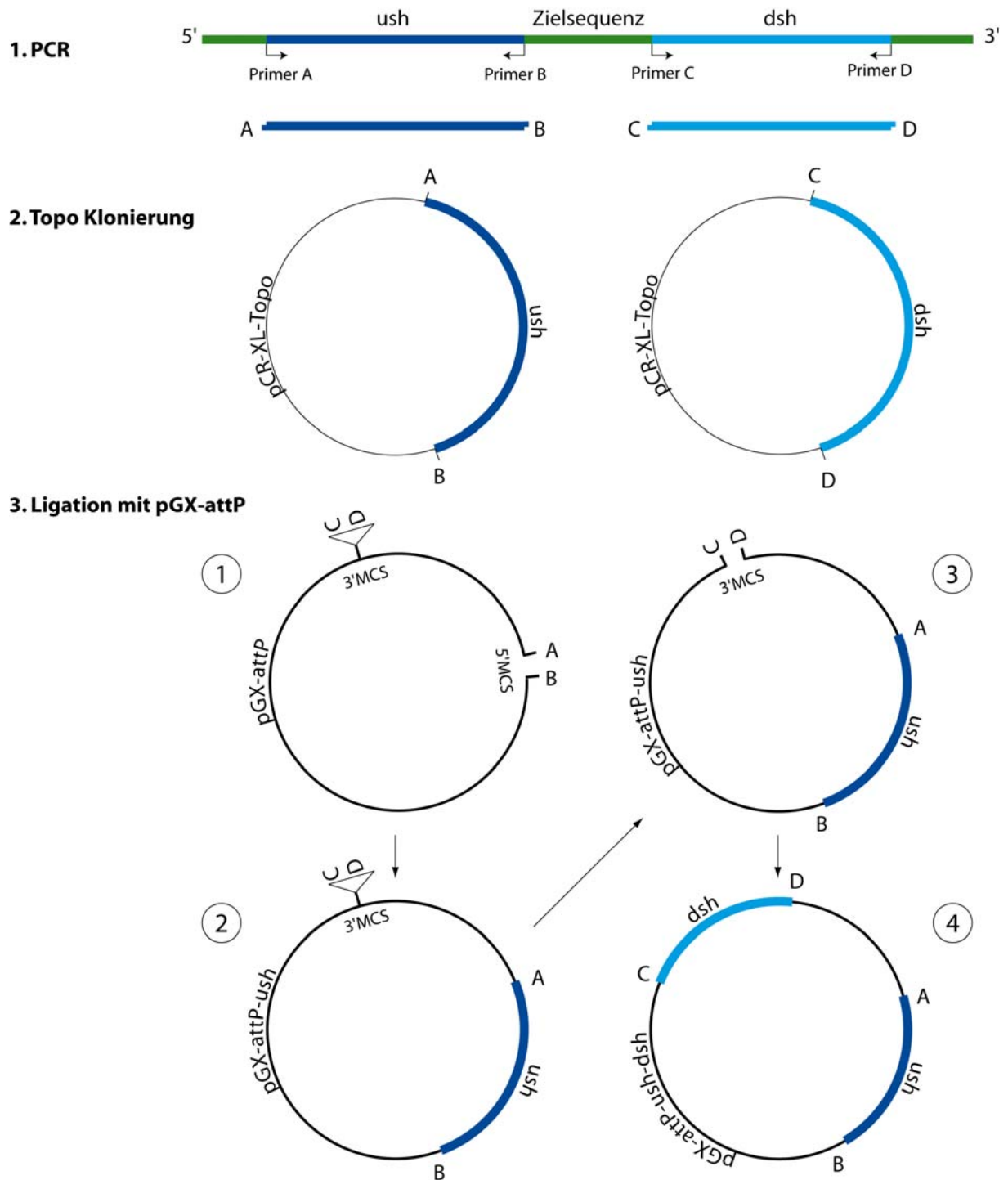


Abbildung 2.3: Klonierungsstrategie zur Herstellung der Deletionskonstrukte. Die Zielsequenz stellt die zu deletierende Region im Genom dar, *ush* (*upstream homology*) und *dsh* (*downstream homology*) sind proximal und distal liegende Regionen in denen die homologe Rekombination stattfinden soll. Primer A, B, C, und D sind *linker*-Primer, an die Schnittstellen der Restriktionsenzyme A, B, C und D angehängt sind. Entstandene PCR-Produkte haben an ihren Enden die Schnittstellen der Enzyme A, B, C und D, über die sie nach Subklonierung im pCR-XL-Topo Vektor, in die jeweilige MCS des pGX-attP Deletionsvektors kloniert werden sollen.

2.3 Genetische Methoden

2.3.1 Transgenese

Die Herstellung transformanter Fliegen mittels Mikroinjektionsverfahren wurde von der Firma *Rainbow Transgenic Flies* oder von Sebastian Jansen in Mainz durchgeführt.

2.3.1.1 P-Element Insertionen

Durch Injektion von P-Elementvektoren zusammen mit einem für die Transposase kodierenden Helferplasmid in das Keim- bzw. Polplasma des posterioren Endes eines *Drosophila* Embryos ist es möglich transgene Fliegen herzustellen. Aus dem Keimplasma am posterioren Ende des Embryos entstehen die Polzellen aus denen in der späteren Entwicklung der Fliege die Keimzellen hervorgehen. Mit Hilfe der Transposase kann das injizierte P-Element im Keimplasma in die späteren Keimzellen integriert werden. Das P-Element inseriert dabei zufällig ins Genom.

2.3.1.2 ϕ C31 Integration

Mit ϕ C31 Integrationssystem können gezielte Insertionen im Genom von *Drosophila* erlangt werden (Bischof et al., 2007). Das System basiert auf der Sequenz-spezifischen Rekombination des Bakteriophagen ϕ C31 zwischen der bakteriellen Erkennungssequenz (*attB*) und der Erkennungssequenz des Phagen (*attP*). Durch eingefügte *attP sites* im Genom von *Drosophila* und Anwesenheit von *attB sites* im Plasmid können Transgene gezielt ins Genom inserieren. In dieser Arbeit wurde die Injektionslinie 58A (Bischof et al., 2007), die Insertionen auf dem zweiten Chromosom ermöglicht, verwendet.

2.3.1.3 Identifikation transgener Fliegen

Die von der Firma *Rainbow Transgenic Flies* erhaltenen transgenen Embryonen (im Weiteren als G0 Fliegen bezeichnet) wurden nachdem sie geschlüpft waren mit w^- Fliegen (weißäugig) gekreuzt. In der F1-Generation kann durch Ausprägung des Markergens, in diesem Falle *white*, festgestellt werden, welche Fliegen das P-Element enthalten. Die Ausprägung des Markergens kann vom Insertionsort abhängig sein. Deshalb kann bei P-Elementinsertionen die Augenfarbe von hellorange bis dunkelrot variieren. Transgene, die durch ϕ C31 Integration entstanden sind, haben eine einheitliche Augenfarbe. Aus den Kreuzungen der G0 und der w^- Fliegen werden alle orange- und rotäugigen Fliegen gesammelt. Aus diesen transgenen Tieren sollen nach Bestimmung der Lokalisation der P-Elementinsertion Stämme etabliert werden.

2.3.1.4 Balancer-Kreuzungen

Balancerchromosome sind Chromosome, die durch künstlich erzeugte Inversionen keine Rekombination mit ihren homologen Chromosomen untergehen können. Als Segregationsmerkmal tragen sie rezessive, letale Merkmale, so dass nur heterozygote Tiere überleben können.

Zur Bestimmung des Insertionsortes wurden die transgenen Fliegen mit Stämmen verschiedener Balancerchromosomen (Balancerstämme) gekreuzt. Da die hier verwendeten Balancerstämme dominante Mutationen tragen, können in der F1-Generation durch Segregation der verschiedenen Merkmale Rückschlüsse auf autosomale oder gonosomale P-Element Insertionsstellen geschlossen werden. Erhält man bei einer Kreuzung eines G0 Männchens mit einem Weibchen eines zweit- oder drittchromosomalen Balancerstamms in der F1-Generation ausschließlich w^- Männchen, kann man davon ausgehen, dass die P-Elementinsertion auf dem X-Chromosom liegt. Befinden sich in der F1-Generation auch rotäugige Männchen, liegt die Insertionsstelle auf dem 2. oder 3. Chromosom. Um diese zu lokalisieren wurden Fliegen der F1-Generation *inter se* gekreuzt und durch die Verteilung der verschiedenen Merkmale in der F2-Generation Rückschlüsse bezüglich der Insertionsstelle gezogen. Mit allen transgenen Fliegen wurden Balancerkreuzungen mit X-, II- und III-chromosomalen Balancern angesetzt und durch entsprechende Folgekreuzungen stabile Stämme erzeugt.

Balancerkreuzungen:

1) X-Chromosomaler Balancer:

$$\text{♀ } \frac{w^- X35l(1)omb}{w^- FM7a} \times \frac{P}{y} \text{ ♂}$$

2) Balancer für Chromosom 2:

$$\text{♀ } \frac{w^-; CyO}{w^-; Sco} \times \frac{w^-; P}{y; +} \text{ ♂}$$

3) Balancer für Chromosom 3:

$$\text{♀ } \frac{w^-; TM3, Sb}{w^-; TM6B, Tb} \times \frac{w^-; P}{y; +} \text{ ♂}$$

Abbildung 2.4: Durchgeführte Balancerkreuzungen mit X-, II- und III-chromosomalen Balancerstämmen.

2.3.2 Herstellung endogener Deletionen durch homologe Rekombination

Zur Herstellung endogener Deletionen wurde die von Huang et al. entwickelte Methode des ‚genomic engineering‘ angewandt (Huang et al., 2009; Huang et al., 2008). Diese besteht aus drei Kreuzungsschritten: ‚targeting‘-, ‚screening‘- und ‚mapping‘-Kreuzung, die im Folgenden beschrieben werden. Als Vorabtest wurde der Toxizitätstest durchgeführt.

2.3.2.1 Toxizitätstest

Der Toxizitätstest dient als Vorabtest und soll durch Kreuzung der erhaltenen Donorlinien mit ubiquitären Gal4-Stämmen die durch UAS-*rpr* verursachte Letalität prüfen. Die Transkription von UAS-*rpr* und die dadurch verursachte Sterblichkeit ist abhängig von dem Insertionsort des Donorkonstrukts im Genom. Für den Toxizitätstest wurden 10 Jungfrauen der Donorstämme mit je 5 Männern der ubiquitären Gal4-Treibenlinien GOP 610 und GOP 613 gekreuzt. Die Donorstämme enthalten die *w*⁺-markierte Donorkassette inklusive UAS-*rpr*. In der F1-Generation sollten, je nachdem ob die in der Kreuzung eingesetzten Jungfrauen homozygot oder heterozygot waren, keine oder nur weißäugige und das Balancerchromosom enthaltende Nachkommen entstehen. In manchen Fällen wurde UAS-*rpr* nicht aktiviert und es entstanden rotäugige Nachkommen. Donorlinien, für die dies der Fall war, sollten nicht für das folgende ‚Targeting‘-Experiment eingesetzt werden, da die falsch positiven Ereignisse in der ‚Screening‘-Kreuzung schlechter eliminiert werden.

2.3.2.2 ‚Targeting‘-Kreuzung

In der ‚Targeting‘-Kreuzung werden Jungfrauen des Donorstamms mit Männchen eines *hs-FLP*, *hs-ISceI* tragenden Stammes gekreuzt (Abbildung 2.5). Je nach Insertionsort des Deletionskonstrukts im Donorstamm (II.- oder III.-Chromosom) wurde ein zweit- oder drittchromosomaler *hs-FLP*, *hs-ISceI* Stamm verwendet (GOP 609: II-chromosomal; GOP 492: III-chromosomal). Zur Vereinfachung der späteren Arbeit tragen die *hs-FLP*, *hs-ISceI* Stämme auf dem Y-Chromosom und ihrem Balancerchromosom ein *hs-hid* Transgen (Huang et al., 2008). Ubiquitäre Expression des Zelltodgens *hid*, durch einen Hitzeschock induziert, führt zu starker Letalität. Die F1-Generation dieser Kreuzung wurde 24-48h nach Eiablage einem Hitzeschock unterzogen (75min, 38°C). Dabei wurden alle männlichen und die weiblichen Nachkommen, die *hs-hid* auf ihrem Balancerchromosom tragen, eliminiert. So bleiben nur P[donor]^{rpr+*}/ *hs-FLP hs-ISceI* Weibchen, die nun die extrachromosomale linearisierte Donorkassette enthalten. Diese Fliegen besitzen aufgrund ihrer Flippase-Aktivität „Mosaik-Augen“. Durch die zellautonome Aktivierung der Flippase findet die erfolgreiche Mobilisierung der Donorkassette nicht in allen Zellen statt. In den Vorläuferzellen mancher Ommatidien wird das *white*-Gen entfernt und bildet im adulten Fliegenauge weiße Klone. Die Exzision der Donorkassette und die anschließende homologe Rekombination sollte auch in den

Vorläuferzellen der Keimzellen stattfinden. Dies lässt sich nur durch weitere Kreuzungen überprüfen (siehe 2.3.2.3).

Aufgrund der hohen Letalität der F1 Generation wurden pro ,*Targeting*'-Kreuzung standardmäßig 50 – 100 Jungfrauen eines Donorstamms und eine ähnliche Anzahl *hs-FLP hs-I-SceI* Männchen eingesetzt. Die Anzahl der Männchen war hierbei der limitierende Faktor, da nur junge, frische Männchen verwendet werden sollten. Die Kreuzungen wurden bei 22°C gehalten und alle zwei Tage auf frische Röhrcchen passagiert. Die Röhrcchen der zweitages-Ablage wurden für 24h bei 25°C gehalten, bis sie dem Hitzeschock unterzogen wurden. Danach wurden sie, bis alle Mosaik-Augen Jungfrauen geschlüpft waren, auf 25°C gehalten und täglich abgesammelt. Es wurden parallel 5 – 8 ,*Targeting*'-Kreuzungen angesetzt.

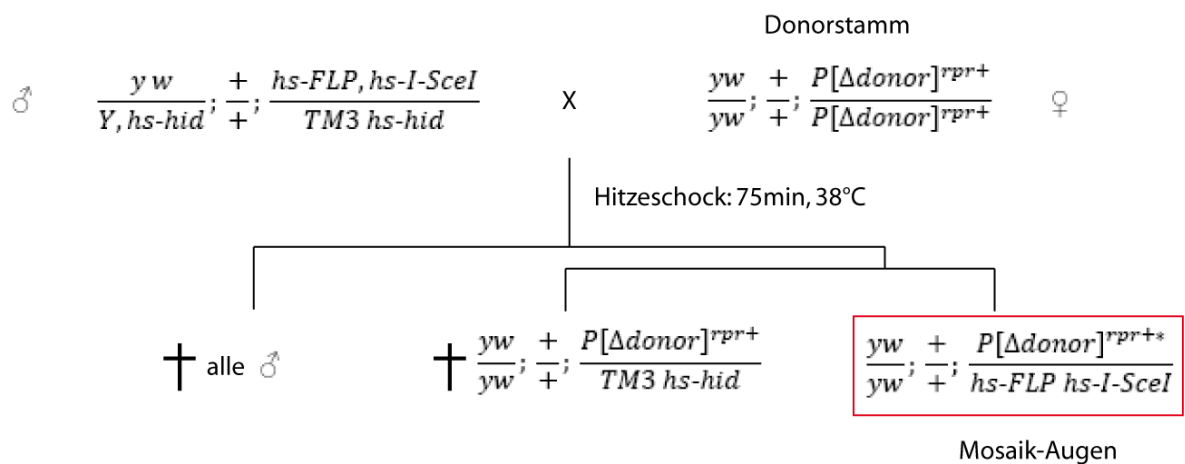


Abbildung 2.5: Kreuzungsschema einer ,Targeting'-Kreuzung mit drittchromosomaler Donorlinie. Jungfrauen der drittchromosomale Donorlinie $P[\Delta donor]^{rpr+}$ werden mit der drittchromosomalen *hs-FLP hs-I-SceI* Linie (GOP 492) gekreuzt. † Kennzeichnen die Genotypen der F1 Generation, durch den Hitzeschock eliminiert werden. Die Mosaik-Augen Nachkommen (rot umrandeter Genotyp $P[\Delta donor]^{rpr+*}$) tragen die mobilisierte Donorkassette. * markiert die mobilisierte Donorkassette.

2.3.2.3 ,Screening'-Kreuzung

In der ,*Screening*'-Kreuzung werden die aus der ,*Targeting*'-Kreuzung stammenden Mosaik-Augen Jungfrauen mit ubiquitären Gal4-Treiberlinien gekreuzt, um gegen nicht-gezielte Rekombinationsereignisse oder nicht mobilisierte Donorkassetten zu selektieren. Bei erfolgreicher homologer Rekombination geht das in der Donorkassette befindliche Zelltodgen *reaper* verloren. Wird die Donorkassette in den Keimzellen der Mosaik-Augen Fliegen jedoch nicht mobilisiert, oder findet eine nicht-gerichtete Rekombination statt, befindet sich *UAS-rpr* noch im Genom und wird durch Gal4 aktiviert. So werden Fliegen mit dem Genotyp $P[donor]^{rpr+}/Gal4$ in der F1 Generation der ,*screening*'-Kreuzung eliminiert (Abbildung 2.6). Übrig bleiben in der F1 Generation weißäugige Fliegen mit dem Genotyp *hs-FLP hs-I-SceI/Gal4* und Fliegen, in denen die gewünschte homologe

Rekombination stattgefunden hat ($\Delta omb/yw$). Insertionen des *white*-Gens in *omb* äußern sich durch einen Streifenaugen-artigen Phänotyp und lassen sich so leicht identifizieren. In manchen Fällen überleben Fliegen des Genotyps $P[\text{donor}]^{rpr+}/Gal4$ oder Fliegen, die nicht-gerichtete Rekombinationen tragen. Diese hatten in der Regel die Augenfarbe der Donorlinie und wurden auch für die ‚*Mapping*‘-Kreuzung eingesetzt.

Standardmäßig wurden jeweils 10 Mosaik-Augen Jungfrauen einer ‚*Targeting*‘-Kreuzung mit 5 Männchen des jeweiligen Gal4-Stammes gekreuzt. Nach 3-4 Tagen wurden die Adulten auf frische Röhren passagiert, um möglichst viele Nachkommen zu erhalten. Eine Kreuzung wurde drei Mal passagiert. Die Kreuzungen wurden bei 25°C gehalten und ab dem Schlüpfen der F1-Generation täglich abgesammelt.

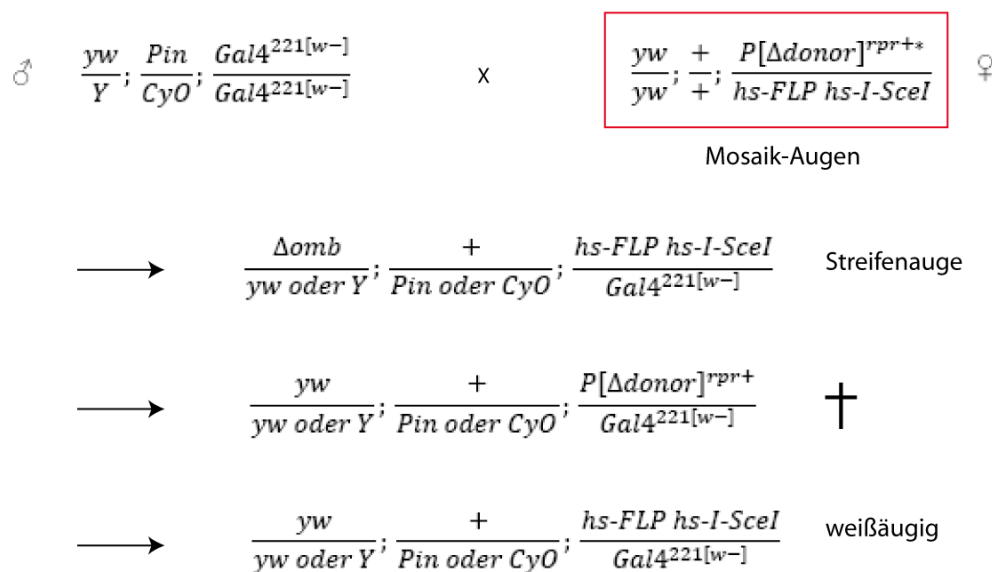


Abbildung 2.6: ‚*Screening*‘-Kreuzung. Die Mosaik-Augen Fliegen Jungfrauen aus der F1-Generation der ‚*targeting*‘-Kreuzung werden mit Männchen einer ubiquitären Gal4-Treiberlinien gekreuzt. Die verwendeten Gal4 Stämme (GOP 610 und 613) wurden von Huang et al. so konstruiert, dass sie auf dem nicht Gal4-tragendem Chromosom Balancerchromosomen besitzen (hier *CyO/Pin*). Diese können hier vernachlässigt werden. Fliegen des Genotyps $P[\Delta donor]^{rpr+}/Gal4$ werden eliminiert (\dagger). Fliegen, die die erwünschte homologe Rekombination tragen (Δomb) haben Streifenaugen.

2.3.2.4 ‚*Mapping*‘-Kreuzung und Etablierung eines stabilen Deletionsstammes

Um sicher zu gehen, dass die Rekombination auf dem X-Chromosom in *omb* stattgefunden hat, werden zum einen die männliche Streifenaugen-Fliegen aus der ‚*Screening*‘-Kreuzung mit *white*-Jungfrauen und zum anderen weibliche Streifenaugen-Fliegen mit einem X-chromosomalen Balancerstamm, zur Etablierung eines stabilen Stammes, gekreuzt. Die Verteilung der Streifenaugen-Fliegen der F1-Generation der *white*-Kreuzung gibt Aufschluss über das Chromosom auf dem die Rekombination stattgefunden hat. Gibt es nur Streifenaugen-Weibchen und weißäugige Männchen

kann man davon ausgehen, dass die Rekombination auf dem X-Chromosom stattgefunden hat. Das Kreuzungsschema zur Etablierung eines stabilen Stammes befindet sich in Abbildung 2.7.

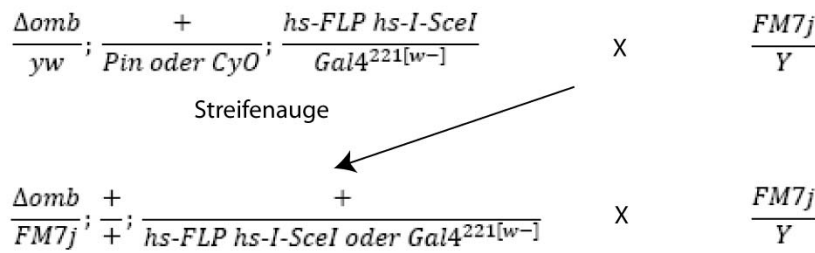


Abbildung 2.7: Etablierung eines stabilen Deletionsstammes. Streifenaugen-Jungfrauen werden mit Männchen eines weißäugigen X-chromosomalen Balancerstammes (hier FM7j) gekreuzt.

2.3.3 Einführung von *enhancer-reporter* Linien in *hh^{ts}* Hintergrund

Die Expression einiger *enhancer-reporter* Linien sollten im *hh*-mutanten Hintergrund angeschaut werden. Dafür war es nötig die *lacZ*-Stämme in *hh*-temperatursensitiven (*hh^{ts}*) Hintergrund zu bringen. Es wurde nach folgender Strategie vorgegangen (Abbildung 2.8). Die hergestellten stabilen Stämme wurden bei 16°C gehalten. Bei Beginn des L3-Stadiums wurden die Stämme 1,5 bis 2 Tage bei 29°C gehalten, dann präpariert und analysiert. Die zweitchromosomalen *enhancer-reporter* Stämme ombTU10 4-1A und ombTU12 6-1aA wurden in den *hh^{ts}* Hintergrund gekreuzt.

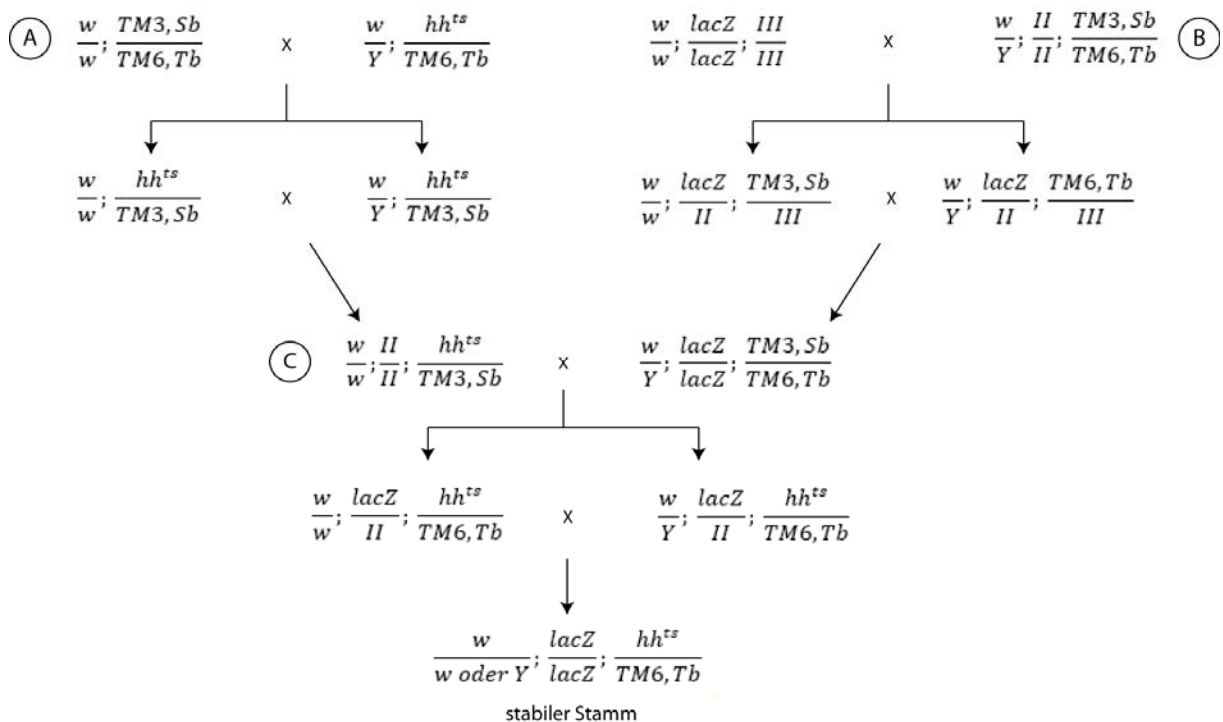


Abbildung 2.8: Kreuzungen zur Einführung von *enhancer-reporter* Linien in *hh^{ts}*-Hintergrund. Kreuzungen A und B können parallel angesetzt werden. Es folgt jeweils eine inter se Kreuzung der F1-Generation, um die gewünschten Genotypen für Kreuzung C zu erhalten.

2.3.4 Einführung von *enhancer-reporter* Linien in *omb*-mutanten Hintergrund

Enhancer-reporter Linien, die im *omb*-mutanten Hintergrund analysiert werden sollten wurden mit einem *omb*⁰-Allel gekreuzt. Hierfür wurden Männchen des zu untersuchenden Stammes mit *omb*¹⁵/*FM-GFP*;+;+ (GOP 1042) Jungfrauen gekreuzt. Aus der F1-Generation ließen sich *omb* mutante männliche Larven aufgrund der fehlenden grünen Fluoreszenz identifizieren und analysieren. Als Kontrolle dienten immer fluoreszierende (*FM-GFP*) männliche Larven.

2.3.5 Generierung *omb*-mutanter Klone durch FRT-FLP

Zur Generierung *omb*-mutanter Klone wurde das *omb*-Nullallel *l(1)omb*²⁸² (Sen et al., 2010) und das FRT-FLP System verwendet (Golic, 1991; Xu and Rubin, 1993). Die Kreuzung wurde wie folgt durchgeführt und die Nachkommen im L1/L2-stadium für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Adulte Abdomen wurden einige Tage nach dem Schlüpfen der Tiere präpariert.

y l(1)omb^[282] *f* FRT19A/*FM* (GOP 427) × *y w* *hs-GFP* *hs-flp* FRT19/*Y* (GOP 317)

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Präparation von L3-Larven

Männchen und Weibchen der L3-Larven wurden getrennt voneinander behandelt. Die Männchen wurden durch die Hodenbläschen identifiziert und von den Weibchen getrennt. Die Larven der jeweiligen Stämme wurden in einer kleinen Schale mit gekühltem PBS präpariert. Dabei wurde die Larve mit einer feinen Pinzette in der Mitte gepackt und mit der zweiten Pinzette der hintere Teil entfernt. Danach wurde der vordere Teil festgehalten und mit der Pinzettenspitze in den Mundhaken gegangen. Nun wurde das vordere Ende der Larve umgestülpt. An dem umgestülpten vorderen Teil der Larve, der das Gehirn und die Imaginalscheiben enthält, wurde die X-Gal Färbung durchgeführt.

2.4.2 Präparation pupaler Abdomen

Puppen verschiedener Entwicklungsstadien wurden von der Wand eines gut angegangenen Röhrchens gelöst. Dafür wurde die Wand des Röhrchens mit ein wenig Wasser befeuchtet und etwa zwei Minuten gewartet. Nun konnten die Puppen mit einem feinen Spatel abgesammelt werden. Danach wurden sie vorsichtig mit Wasser in einem Sieb gewaschen. Die Puppen wurden durch externe Merkmale (Madhavan and Madhavan, 1980) in verschiedene Entwicklungsstadien eingeordnet und diese getrennt voneinander behandelt. Für die Präparation wurden die Puppen lateral auf einem Objektträger mit doppelseitigem Klebeband befestigt und mit einer Rasierklinge entlang der anteriorposterioren Achse halbiert. Die dorsale Hälfte (Epidermis zusammen mit pupaler Cuticula bei Stadien <50h APF) wurde mit einer Pinzette in ein mit PBTween gefülltes Blockschälchen

überführt. Die Epidermis wurde mit einer Pinzette am Thorax festgehalten und vorsichtig mit einer 10µl-Pipette, die auf 5µl eingestellt war, im PBTween gespült um Fettkörper und interne Organe zu entfernen. Nun war die Epidermis zur Fixierung bereit.

2.4.3 Präparation adulter Abdomen

Adulte Fliegen wurden kurz bei -80°C eingefroren oder mit Diethylether begast. Abdomen wurden mit einer Pinzette vom Thorax entfernt. Je nach gewünschter Ansicht wurden die Abdomen an der dorsalen oder an der ventralen Mittellinie mit einer Rasierklinge geöffnet. Bei Präparaten mit dorsalem Schnitt wurden die Tergiten wie bei einem Fächer auf einem Objektträger ausgebreitet und zusammen mit einem Tropfen 1%iger KOH von einem Deckgläschen bedeckt. Bei einem ventralen Schnitt wurden die dorsale Hälfte des Abdomens in einem Tropfen 1%iger KOH unter einem Deckgläschen gequetscht. Die so bereiteten Objektträger wurden zwei Stunden auf einem 50°C warmen Heizblock gelegt. Danach wurden die Präparate mit deionisiertem Wasser von den Objektträgern gespült und in Isopropanol dehydriert. Die präparierten Abdomen wurden in einem Tropfen Canada Harz (Euparal „Vert“) eingedeckelt.

2.4.4 Xgal-Färbung

2.4.4.1 Xgal-Färbung von L3-Imaginalscheiben

Die präparierten Larven wurden in eisgekühltem 1XPBS gesammelt. Nach entfernen der 1XPBS-Lösung wurden die Larven mit Fixierlösung (0,1 M NaCacodylat Puffer pH 7,3 mit 0,75% Glutaraldehyd) 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler fixiert. Nach der Fixierung erfolgte ein dreimaliger 5-minütiger Waschschrift mit 1XPBS. Gleichzeitig wurde die Xgal-Färbelösung vorbereitet. Dazu wurden zu der Färbelösung 1/30 des Volumens 8%iges Xgal in DMF (ROTH) zugesetzt. Die Lösung wurde für 10 min im Wasserbad bei 37°C aufgewärmt und dann 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert um die Bildung von Xgal Kristallen während der Farbreaktion zu vermeiden. Nach dem Waschen der Präparate wurde PBS durch 300 µl Xgal-Färbelösung ersetzt. Die Färbung lief bei RT und völliger Dunkelheit über Nacht auf einem Horizontalschüttler. Die Reaktion wurde unterbrochen, indem die Färbelösung durch 1XPBS ersetzt wurde. Zur vollständigen Entfernung der Färbelösung wurden die Präparate drei Mal 5 min in 1XPBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Präparate mit 50% Glycerol/PBS versetzt und einige Stunden bei RT inkubiert. Die 50%ige Glycerol/PBS-Lösung wurde dann durch 70%ige ersetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Imaginalscheiben wurden in 70% Glycerol/PBS frei präpariert und auf einem Objektträger eingedeckelt.

2.4.4.2 Xgal-Färbung von pupalen Abdomen

Ca. 8 bis 10 präparierten Abdomen wurden in 500µl eisgekühltem PBTween gesammelt und nach folgendem Protokoll gefärbt.

- 10min in 500µl Fixierlösung (PBTween + 1% Glutaraldehyd) fixieren (dabei nicht schütteln)
- 1X mit 500µl PBTween spülen
- 3X 5min in 500µl PBTween auf dem Horizontalwippschüttler waschen
- Währenddessen Xgal-Färbelösung wie in 2.4.4.1 beschrieben vorbereiten
- PBTween durch Xgal-Färbelösung ersetzen
- Je nach Stärke der Färbung 20min bis 12h bei RT und in völliger Dunkelheit auf dem Horizontalwippschüttler inkubieren
- 1X mit 500µl PBTween spülen
- 3X 5min in 500µl PBTween auf dem Horizontalwippschüttler waschen
- Präparate in 70% Glycerol/PBS überführen und bis zur Präparation bei 4°C aufbewahren

2.4.5 Antikörperfärbung

2.4.5.1 Antikörperfärbung an L3-Imagialscheiben

Die umgestülpten Larven (siehe 2.4.1) wurden in eisgekühltem PBT+BSA gesammelt und nach folgendem Protokoll behandelt.

- 30min in 500µl 4% Paraformaldehyd auf einem Horizontalwippschüttler fixieren
- 3X in 500µl PBT+BSA spülen
- 1h in 500µl PBT+BSA bei RT auf einem Horizontalwippschüttler inkubieren
- PBT+BSA komplett entfernen und durch primäre Antikörper-Lösung ersetzen (Verdünnung je nach Antikörper ansetzen)
- Über Nacht bei 4° C auf einem Schüttler inkubieren
- Primären Antikörper entfernen (dieser kann aufbewahrt und je nach Antikörper mehrmals verwendet werden)
- 3X in 500µl PBT+BSA spülen
- 1h in 500µl PBT+BSA bei RT auf einem Horizontalwippschüttler inkubieren
- PBT+BSA komplett entfernen und durch sekundäre Antikörper-Lösung ersetzen (Verdünnung je nach Antikörper ansetzen)
- 1-2h bei RT unter Ausschluss von Licht auf einem Horizontalwippschüttler inkubieren
- 3X in 500µl PBT spülen
- 1h in 500µl PBT bei RT auf einem Horizontalwippschüttler inkubieren

- PBT durch 70% Glycerol/PBS:Vectashild (1:1) ersetzen
- Bis zur Präparation bei 4°C aufbewahren

2.4.5.2 Antikörperfärbung an pupalen Abdomen

Ca. 8 bis 10 präparierten Abdomen wurden in 500µl eisgekühltem PBTween gesammelt und nach folgendem Protokoll behandelt.

- 10min in 500µl Fixierlösung (siehe 2.1.4.9) auf einem Horizontalwippschüttler fixieren
- 3X in 500µl PBT+BSA spülen
- 1h in 500µl PBT+BSA bei RT auf einem Horizontalwippschüttler inkubieren
- PBT+BSA komplett entfernen und durch primäre Antikörper-Lösung ersetzen (Verdünnung je nach Antikörper ansetzen)
- Über Nacht bei 4° C auf einem Schüttler inkubieren
- Primären Antikörper entfernen (dieser kann aufbewahrt und je nach Antikörper mehrmals verwendet werden)
- 3X in 500µl PBT+BSA spülen
- 1h in 500µl PBT+BSA bei RT auf einem Horizontalwippschüttler inkubieren
- PBT+BSA komplett entfernen und durch sekundäre Antikörper-Lösung ersetzen (Verdünnung je nach Antikörper ansetzen)
- 1-2h bei RT unter Ausschluß von Licht auf einem Horizontalwippschüttler inkubieren
- 3X in 500µl PBT spülen
- 1h in 500µl PBT bei RT auf einem Horizontalwippschüttler inkubieren
- PBT durch 70% Glycerol/PBS:Vectashild (1:1) ersetzen
- Bis zur Präparation bei 4°C aufbewahren

3 Ergebnisse

3.1 Abdominale Expression und Regulation von *omb*

3.1.1 Omb in der Pigmentierung des adulten Abdomens

Im Wildtyp bildet sich nach dem Schlüpfen des Tieres in der posterioren Tergite jedes abdominalen Segments ein dunkles Pigmentband mit einer Reihe Makrochaeten und ein bis zwei Reihen Mikrochaeten (Abbildung 3.1 A) (Madhavan and Madhavan, 1980). Die posteriore Tergite entsteht aus der posterioren Hälfte des anterioren dorsalen Histoblastennestes (Ninov et al., 2007), in dem zu jedem Zeitpunkt der Pupalentwicklung *Omb* exprimiert wird (siehe 3.1.2). *Omb* ist in der posterioren Tergite ein direktes Zielgen von *hh* und vermittelt das von *hh* determinierte posteriore Schicksal (Kopp and Duncan, 1997). Abbildung 3.1 C zeigt das stark hypermorphhe *hh* Allel *hh^{Mirabile}* (*hh^{Mir}*). Hier war die anteriore Tergite durch eine gespiegelte Duplikation der posterioren Tergite ersetzt. Der geschwungene Pfeil deutet die Symmetrieachse an. Die Klasse der hypermorphhen *omb*-Allele *Quadroon* (*Qd*) zeigt einen zum Anterioren hin expandierten Pigmentstreifen. In Abbildung 3.1 B ist das Allel *Quadroon^{Fortini}* (*Qd^{FOR}*) abgebildet. Hier zog sich der Pigmentstreifen über die komplette anteriore Tergite bis zur Acrotergite hin. Die pigmentierte Region war von kleinen unpigmentierten Flecken durchzogen (Pfeile). Auf Makro- und Mikrochaeten hatte dieses Allel keinen Einfluss. Das Allel *Qd^{FOR}* wurde von Marc Fortini isoliert und enthält ein hochmobiles transposables Foldback Element, von dem bisher nur die Endsequenzen bekannt sind (Dorner, 2008). Ein weiteres bekanntes *Quadroon* Allel (*Qd^{FAB}*) zeigt starke Störungen in der Polarität sowie Formation der Borsten und weist einen *hh^{Mir}*-ähnlichen Phänotyp auf (Kopp and Duncan, 1997).

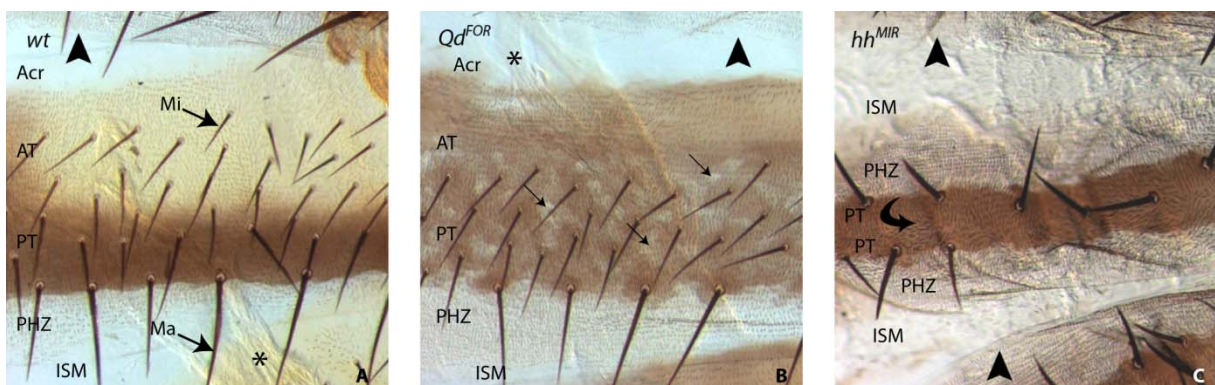


Abbildung 3.1: Abdominale Phänotypen. In A – C sind Fotografien des jeweils vierten abdominalen Segments eines adulten Weibchens abgebildet. Jedes Segment besteht aus einer Tergite, die in folgende Regionen unterteilt wird: Der unbehaarten sklerotisierten Acrotergite (Arc), einer Mikrochaeten (Mi) enthaltende anterioren Tergite (AT), die das dunkle Pigmentband und Makrochaeten (MA) enthaltende posteriore Tergite (PT), der unpigmentierten und behaarten *posterior hairy zone* (PHZ) und die Tergiten verbindende intersegmentale Membran (ISM). Pfeilköpfe markieren die Segmentgrenzen. Asteriske in A und B markieren

unterhalb der Epidermis liegende adulte dorsale Muskelstränge. In **(A)** ist ein wildtypisches Segment abgebildet. **(B)** zeigt ein Segment des *omb*-Allels *Qd^{FOR}*, bei dem das Pigmentband bis zur Acrotergite hin ausgedehnt ist, aber von unpigmentierten Flecken durchzogen ist (Pfeile). In **(C)** ist ein Segment des *hh*-Allels *hh^{MIR}* abgebildet. Hier sind anteriore Strukturen durch eine gespiegelte Duplikation der posterioren Strukturen ersetzt. Der geschwungene Pfeil markiert die Spiegelachse. In A – C liegt die dorsale Mittellinie links.

Die Induktion von *omb*-mutanten Klone während der Pupalentwicklung zeigte, dass *Omb* für die Pigmentierung der posterioren Tergite der adulten Segmente notwendig ist (Abbildung 3.2 A – C). Den Klone, die in diesem Bereich lagen, fehlte die dunkle Pigmentierung und sie wiesen anterioren Charakter auf. Die Klone trugen keine Makrochaeten, jedoch war die Polarität der Borsten nicht beeinträchtigt. Klone, die im zentralen Bereich der Tergite (Abbildung 3.2 D und E) oder im anterioren Bereich (Abbildung 3.2 F) lagen, hatten keinerlei Auswirkung auf die Pigmentierung der anterioren Tergite.

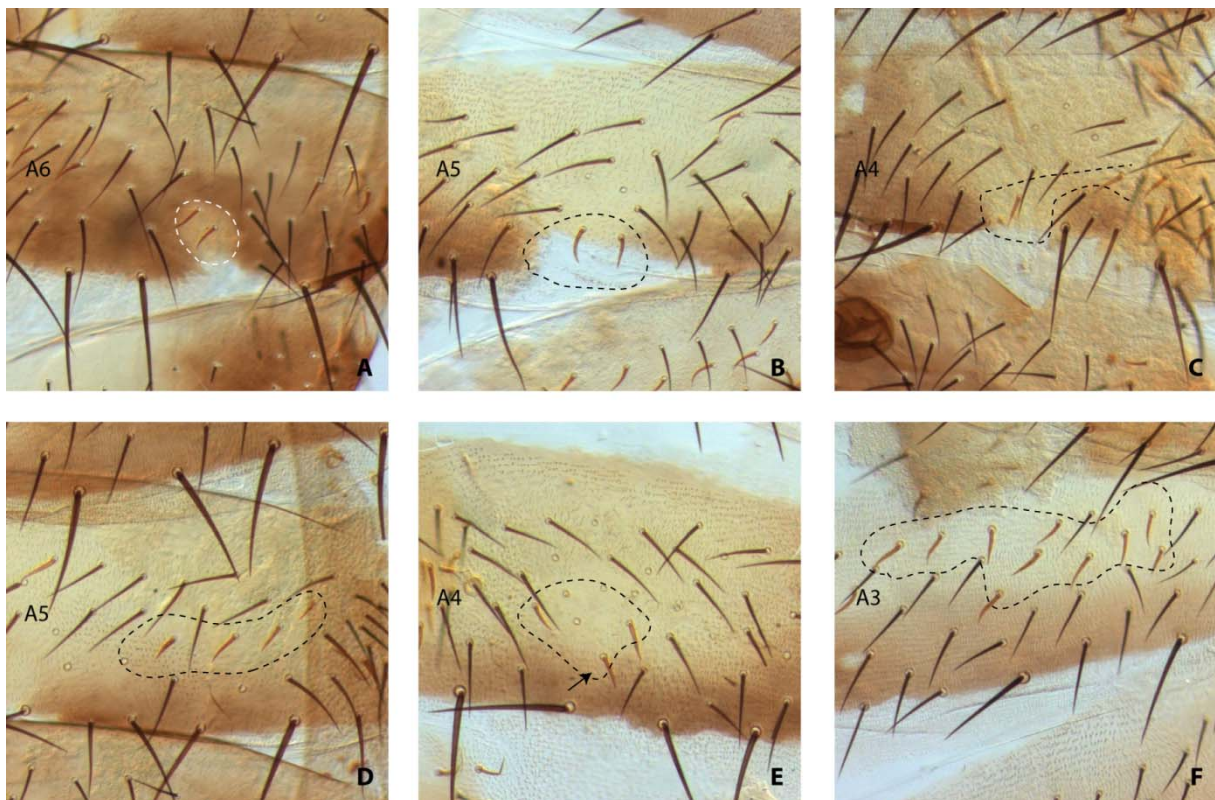


Abbildung 3.2: I(1)*omb*²⁸²-mutante Klone im adulten Abdomen. In A – C sind *omb*-mutante Klone, die in der posterioren Tergite adulter Weibchen liegen, abgebildet. Die gestrichelten Linien markieren die ungefähre Grenze der Klone, die durch die *forked*-markierten Borsten identifiziert wurden. Das Segment A6 besitzt ein breiteres Pigmentband als die weiter anterior liegenden Segmente. In **(A)** ist ein schwach pigmentierter *omb*⁻ Klon von dem Pigmentband umschlossen. In **(B)** und **(C)** sind Klone in den Segmenten A5 und A4 gezeigt. Hier unterbrechen die Klone den Pigmentstreifen. In **(D)** und **(E)** sind *omb*⁻ Klone im zentralen Bereich des Segments abgebildet. Hier ist die Pigmentierung im Vergleich zu angrenzenden Bereichen unverändert. In **(E)** ragt ein kleiner Teil des Klons in das Pigmentband hinein. Hier ist die Pigmentierung reduziert (Pfeil). Klone im anterioren Bereich der Tergite zeigen wildtypische Pigmentierung **(F)**. In A – F befindet sich die dorsale Mittellinie links.

3.1.2 Omb Expression in der Entwicklung des adulten Abdomens

Omb zeigt während der Pupalentwicklung ein distinktes dynamisches Expressionsmuster. Bei Beginn der Pupalentwicklung besitzt jedes Segment ein anteriores und ein posteriores dorsales Histoblastennest. Diese beginnen zu proliferieren, expandieren und verdrängen dabei larvale Epidermiszellen (*larval epidermal cells* = LECs) und bilden schließlich das Epithel des adulten Abdomens. Vor Fusion des anterioren und posterioren Histoblastennests wird Omb am posterioren Rand des anterioren und am anterioren Rand des posterioren Nestes exprimiert. (15-18h APF, Kopp and Duncan, 1997). Nach Fusion der Histoblastennester eines Segments ist die Omb Expression an der A/P-Kompartimentgrenze am stärksten und fällt mit einem zweiseitigen Gradienten in anteriore und posteriore Richtung ab (18-24h APF, Kopp and Duncan, 2002). Nach 30h APF fangen die dorsalen Histoblastennester der aufeinander folgenden Segmente an zu fusionieren. Diese werden vor der Fusion von einer letzten Reihe LECs voneinander isoliert. Diese spezialisierte ‚Grenz‘-LECs sind in diesem Entwicklungsstadium am posterioren Ende jedes Segments lokalisiert sind (in Abbildung 3.3 A' und A'' durch Asteriske markiert). Durch die Extrusion der ‚Grenz‘-LECs von der Oberfläche können die Histoblastennester der benachbarten Segmente fusionieren. Antikörperfärbungen gegen Omb und Inverted (Inv) als posterioren Marker zeigten, dass die Omb-Expression bei einem Alter von 32-34h APF im posterioren Kompartiment abnahm. Die Omb-Expression war weiterhin an der A/P-Grenze am höchsten, und fiel mit einem schwachen Gradienten in die posteriore Hälfte des anterioren Kompartiments hinein ab (Abbildung 3.3 A). Die Expression von Inv war in diesem Stadium innerhalb des posterioren Kompartiments des Histoblastennests uniform (Abbildung 3.3 A'), jedoch nahm die Zelldichte von anterior nach posterior ab. Die Zelldichte innerhalb des anterioren Kompartiments schien uniform. Mit einem Alter von 40-42h APF war die Fusion der Histoblastennester abgeschlossen. Jetzt wurde die Zelldichte innerhalb des posterioren Kompartiments uniform (Abbildung 3.3 B') und Inv positive Zellen überlappte in ein bis zwei Zellreihen an der A/P Grenze mit Omb positiven Zellen (Abbildung 3.3 B''). Hier war die Omb Expression am stärksten und fiel mit einem steileren Gradienten als zuvor nach anterior hin ab (Abbildung 3.3 B).

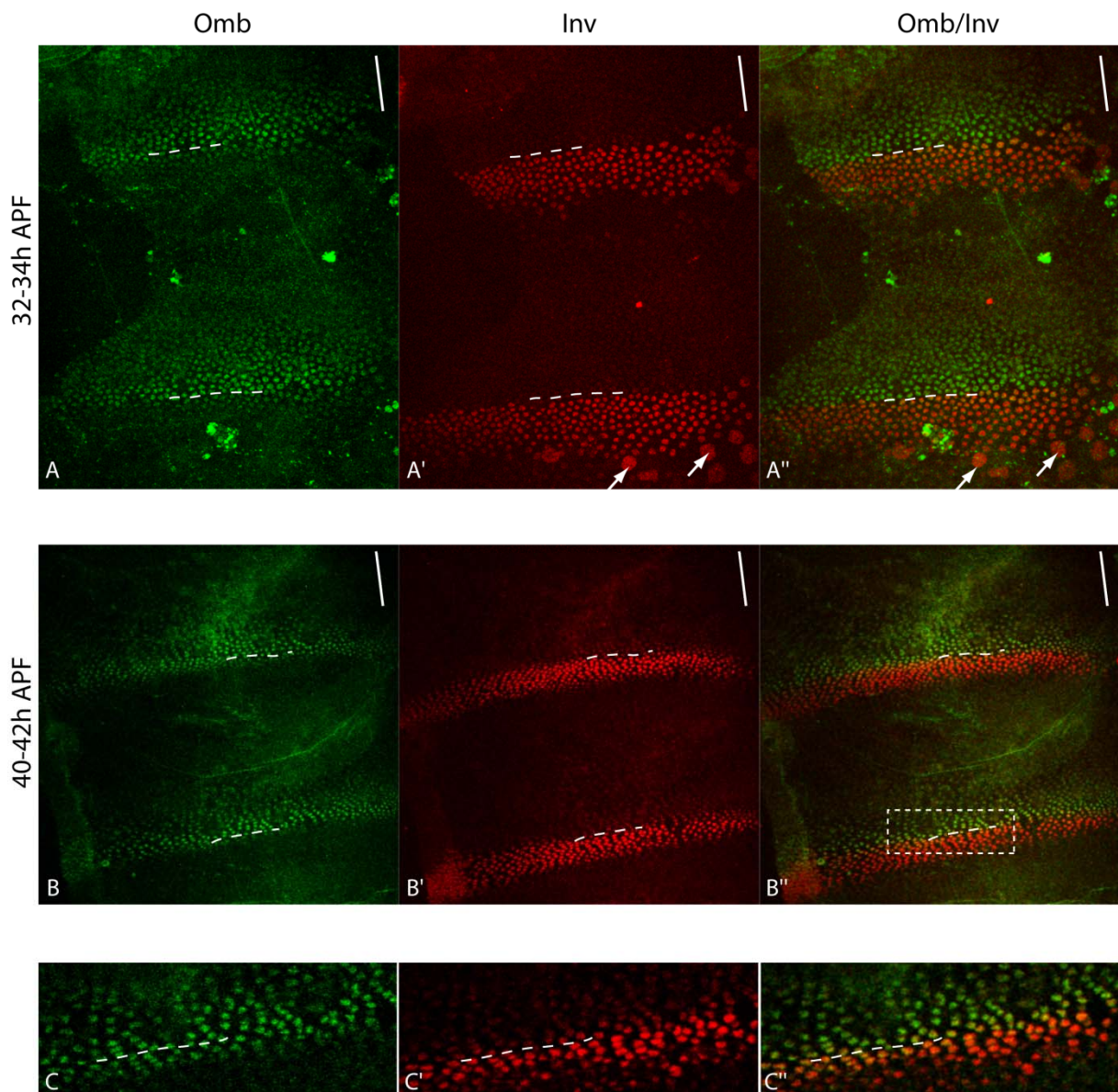


Abbildung 3.3: *omb*-Expression in den pupalen Tergiten. Dargestellt ist die Maximum Projektion konfokaler Aufnahmen einer Antikörperfärbung gegen Omb (grün) und Inv (rot) in den pupalen Tergiten zweier Entwicklungsstadien. Es sind jeweils zwei Segmente (A2/A3 oder A3/A4) des pupalen Abdomens zu sehen. Anterior ist oben, die weiße gestrichelte Linie markiert die A/P-Kompartimentgrenze. Der weiße Balken zeigt Lage und Neigung der dorsalen Mittellinie an. **(A – A'')** Omb und Inv bei 32-34h APF. Omb- und Inv-Expression sind an der A/P-Grenze am stärksten. Omb wird schwach im posterioren Kompartiment exprimiert und überlappt dort mit Inv. Die Omb-Expression fällt mit einem Gradienten in die posteriore Hälfte des anterioren Kompartiments ab. Inv wird im posterioren Kompartiment exprimiert. Dabei nimmt die Zelldichte von anterior nach posterior ab. Einzelne spezialisierte LECs, ‚Grenz‘-Zellen (Pfeile) sind noch zu sehen. Im posterioren Kompartiment exprimieren diese Inv. **(B – B'')** Omb und Inv bei 40-42h APF. Die Omb-Expression ist an der A/P-Grenze am stärksten. Nach Anterior hin fällt sie mit einem steileren Gradienten als zuvor ab. Die Inv-Expression wird innerhalb des posterioren Kompartiments uniform und überlappte an der A/P-Grenze in ein bis zwei Zellreihen mit Omb. In **C – C''** ist eine vergrößerte einzelne Sektion des in B'' markierten Bereichs abgebildet. Die Überlappung der Omb und Inv positiven Zellen an der A/P-Grenze und im posterioren Kompartiment ist zu sehen.

3.1.3 Identifikation des *omb* Tergiten-Enhancers

Die 3' Region der *omb* Transkriptionseinheit (TU) wurde erstmals in dieser Arbeit in einem Enhancer-Reporter *screen* auf regulatorische Eigenschaften, insbesondere auf Expression in der Entwicklung der abdominalen Tergiten untersucht. Abdominale Enhancer wurden innerhalb der TU vermutet, weil Defizienzen im *up-* bzw. *downstream* Bereich von *omb* keinen abdominalen Phänotyp aufwiesen. Abbildung 3.4 zeigt die Unterteilung der 3' *omb*TU in die hier untersuchte Fragmente. Die Fragmente *omb*TU8 bis *omb*TU11 enthalten ausschließlich intronische Sequenzen. In *omb*TU12 sind Exon V, VI und VII und Teile von Exon VIII enthalten. Der Tabelle 3.9 im Kapitel 3.2.1 sind die genaue Position und Größe der in dieser Arbeit hergestellten Enhancer-Reporter Konstrukte zu entnehmen. Nachdem für jedes Enhancer-Reporter Konstrukt mehrere unabhängige transgene Linien etabliert worden waren, wurden Xgal-Färbungen an pupalen Abdomen und L3 Imaginalscheiben durchgeführt (Imaginalscheiben siehe 3.2.1.1). Die lacZ Expression, der durch P-Element Insertion ins Genom gelangten Enhancer-Reporter Konstrukte, kann auch regulatorischen Eigenschaften von Enhancern am Insertionsort unterliegen. Durch Vergleich der Expressionsmuster der Linien eines Enhancer-Reporter Konstrukts wurde das consensus Expressionsmuster des jeweiligen Fragments identifiziert.

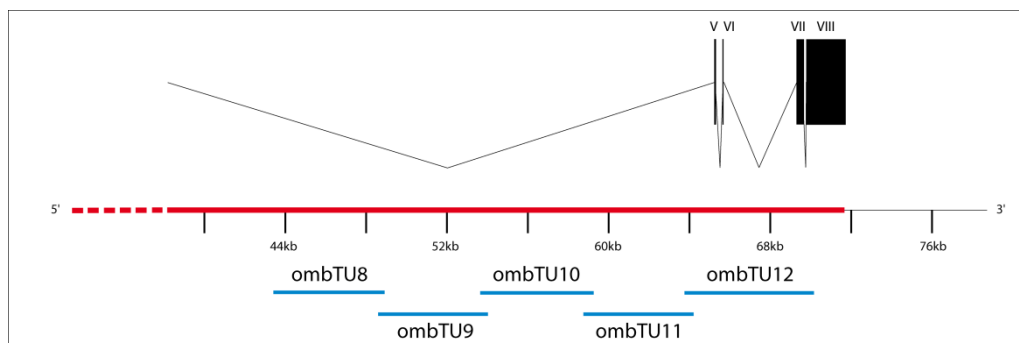


Abbildung 3.4: Auf Enhancer-Aktivität untersuchte Fragmente der 3' *omb*TU. Das 3' Ende des *omb* Locus ist hier abgebildet. Die Skala gibt den Abstand vom Transkriptionsstartpunkt von *omb* in kb an. Rot stellt die 3'Region der *omb*TU dar. Oberhalb der Skala ist die Exon-Intron Struktur dieses Bereichs mit Exon V - VIII abgebildet. Die Fragmente *omb*TU8 bis *omb*TU12 wurden als überlappende Fragmente auf Enhancer-Aktivität untersucht.

3.1.3.1 Expression der Enhancer-Reporter Konstrukte der 3' *omb*TU in den Tergiten

Die Fragmente *omb*TU8 und *omb*TU9 trieben in den sich entwickelnden Tergiten keine Reporterexpression. Die Fragmente *omb*TU10, *omb*TU11 und *omb*TU12 zeigten charakteristische Expression, die im Folgenden beschrieben wird.

ombTU10

Das Fragment ombTU10 zeigte eine starke Expression während der Entwicklung des adulten Abdomens. Vier der neun erhaltenen ombTU10-transgenen Linien wurden auf Expression in den Tergiten untersucht. Alle vier Linien zeigten ein vergleichbares Expressionsmuster. Mit einem Alter von 24-30h APF, bei dem die anterioren und posterioren Histoblastennester zu einem großen Nest verschmolzen sind, trieb ombTU10 lacZ-Expression auf der A/P-Grenze der Segmente (in Abbildung 3.5 A durch eine gestrichelte weiße Linie angedeutet) mit einem abfallenden Gradienten in beide Kompartimente hinein. Hierbei reichte die Expression im Anteriores bis zur Hälfte des anterioren Kompartiments im Histoblastennest. Im posterioren Kompartiment reichte die Expression bis an die posteriore Grenze des Histoblastennests. Die Histoblastennester benachbarter Segmente waren durch eine Reihe LECs voneinander getrennt (Abbildung 3.5 A Pfeil). Die LECs zeigten eine ubiquitäre lacZ-Expression. Zwischen 40-42h APF haben die Histoblasten alle LECs verdrängt. Die Antikörperfärbung gegen β Gal und Inv als posterioren Marker (Abbildung 3.6 A'') zeigte, dass bei einem Alter von 40-42h APF lacZ in einem schmalen Streifen im posterioren Kompartiment (Pfeil Abbildung 3.6 A'') und in der posterioren Hälfte des anterioren Kompartiments mit einem nach anterior abfallenden Gradienten exprimiert wurde. In diesem Stadium überlappte die β Gal-Expression mit der Omb-Expression und ragte in anteriore und posteriore Richtung über sie hinaus (Abbildung 3.6 B''). Im anterioren Kompartiment sind einige größere Zellen zu sehen, die weder β Gal noch Omb exprimieren (Asteriske Abbildung 3.6 A, B-B''). Hierbei könnte es sich um Borsten-Vorläuferzellen handeln, die ab 36h APF beginnen sich aus Zellen des anterioren Histoblastennestes zu differenzieren und ab 41h APF trichogene und tormogene Zellen bilden (Madhavan and Madhavan, 1980). In Abbildung 3.5 B sind die Tergiten eines Abdomens mit einem Alter von ca. 45h APF zu sehen. Dies ist daran erkennbar, dass die Faltung der Epidermis begonnen hat und longitudinale adulte Muskel zu sehen sind (aM). Hier war fast im ganzen Segment, bis auf einen schmalen Streifen am anterioren Ende, eine Blaufärbung zu sehen. In den Stadien zwischen 50 und 60h APF schien die Expression über das gesamte Segment, bis auf einen schmalen Rand am anterioren Ende des Segments, zu reichen (Abbildung 3.5 C). In diesem Entwicklungsstadium hat sich bereits ein Teil des anterioren Kompartiments, aus dem später die Acrotergite hervorgeht, unter den posterioren Rand des darüber liegenden Segments gefaltet (Kopp et al., 1997). Der ungefärbte Rand in Abbildung 3.5 C deutet darauf hin, dass ombTU10 in diesem Bereich keine lacZ-Expression treibt. Das Expressionsmuster blieb bis in die späten pupalen Stadien mit einer kompletten Färbung bis auf den anterioren Rand des Segments konstant (Abbildung 3.5 D).

ombTU11

Beide der erhaltenen transgene Linien wiesen ein identisches Expressionsmuster auf. Nachdem das anteriore und posteriore Histoblastennest eines Segmentes verschmolzen waren (nach 20h APF), trieb *ombTU11* eine starke *lacZ*-Expression an der A/P Grenze des Histoblastennests (weiße gestrichelte Linie in Abbildung 3.5 E). Die Färbung fiel in einem parallelen Gradienten nach beiden Seiten ab. In diesem Stadium (24-30h APF, Abbildung 3.5 E) waren die Histoblastennester benachbarter Segment durch bis zu drei Reihen LECs voneinander getrennt (weiße Pfeile in Abbildung 3.5 E). Die *lacZ*-Expression in den LECs war an der A/P-Grenze am stärksten (Asterisk in Abbildung 3.5 E), schien generell jedoch sehr variabel. In diesem Stadium bewegen sich die LECs zusammen mit den expandierenden Histoblastennestern in Richtung der dorsalen Mittellinie, bevor sie Apoptose untergehen und apikal extrudiert werden. Auch LECs, die nicht im direkten Kontakt mit Histoblastenzellen stehen können Apoptose untergehen (Bischoff and Cseresnyes, 2009). Durch diese Zellbewegungen könnte das variable Expressionsmuster der LECs zustande gekommen sein.

Zwischen 40 und 42h APF wurden die meisten LECs von Histoblasten verdrängt. Einzelne LECs, die nicht extrudiert worden sind, waren noch zu sehen (weiße Pfeile in Abbildung 3.5 F). Die Färbung der Histoblasten war in einem breiten Streifen über der A/P-Grenze am stärksten (in Abbildung 3.5 F durch eine weiße gestrichelte Linie angedeutet). In anteriore Richtung fiel die Färbung mit einem schwachen Gradienten bis etwa zur Mitte des Kompartiments ab. Im posterioren Kompartiment des Segments folgten auf die starke Expression an der A/P-Grenze etwa drei Zellreihen, die eine schwächere Färbung zeigen. Die restlichen Zellen des posterioren Kompartiments waren ungefärbt (Abbildung 3.5 F). Mit zunehmendem Alter der Puppe breitete sich die Färbung innerhalb eines Segments anterior weiter aus. Auch das posteriore Kompartiment war bis zum angrenzenden anterioren Kompartiment des benachbarten Segments komplett gefärbt, jedoch zeigten einzelne Zellen entlang der A/P-Grenze die stärkste Färbung (Abbildung 3.5 G). In den Stadien zwischen 70 und 80h APF war die Färbung am posterioren Rand des Segments am stärksten und fiel bis über die Mitte des Kompartiments nach anterior in einem unregelmäßigen Gradienten ab.

ombTU12

Vier der sieben für *ombTU12* etablierten transgenen Linien wurden auf Expression in den Abdomen untersucht und zeigten ein ähnliches Expressionsmuster nach Xgal-Färbung. In den Histoblastennestern, die zwischen 24-30h APF expandieren, war an der A/P-Grenze in einem sehr schmalen Streifen eine Färbung zu sehen (Abbildung 3.5 I, Pfeile). In Abbildung 3.5 I waren die Nester der benachbarten Segmente durch ein bis zwei Reihen von LECs getrennt. Die LECs waren ebenfalls, bis auf einen Streifen an der A/P-Grenze jedes Segments (Abbildung 3.5 I, Asterisk), ungefärbt.

Antikörperfärbungen gegen β Gal, Inv und Omb an Histoblastennestern mit einem Alter von 32-34h APF verdeutlichten, dass die lacZ-Expression in einem schmalen Streifen anterior der A/P-Grenze verläuft (Abbildung 3.7 A-A''), die sich mit der Omb Expression deckt (Abbildung 3.7 B-B''). Die Expressionsdomänen von β Gal und Inv überlappten nicht. In diesem Entwicklungsstadium hat noch keine Fusion der Histoblastennester an der dorsalen Mittellinie stattgefunden und demnach wurden noch nicht alle LECs von den Histoblasten verdrängt. ombTU12 trieb hier keine Expression in den LECs, posteriore LECs exprimierten Inv. In einem Alter von 40-45h APF war ein breiter und ein schmaler Expressionsstreifen in jedem Segment zu sehen (Abbildung 3.5 J). Der breite Expressionsstreifen lag anterior der A/P-Grenze des Segments und wurde zum Anterioren hin schwächer. Der schmale Expressionsstreifen lag jeweils posterior zur Segmentgrenze in einer Reihe anteriorer Zellen des anterioren Kompartiments des darauffolgenden Segments, so dass der breite und schmale Expressionstreifen jeweils das posteriore Kompartiment eines Segments abgrenzten (Abbildung 3.5 I, Abbildung 3.7 C-C''). In diesem Stadium entsprach das ombTU12 Expressionsmuster dem *patched (pct)*-Expressionsmuster, welches die Aktivierung durch Hh widerspiegelt (Struhl et al., 1997). *ptc* wird vor Fusion der dorsalen Histoblastennester in einem schmalen Streifen anterior der A/P-Grenze mit einer scharfen Grenze nach posterior und einem Gradienten nach anterior exprimiert. Die Histoblastennester benachbarter Segmente werden bis kurz vor deren Fusion an der dorsalen Mittellinie an den Segmentgrenzen von einer Reihe spezialisierter ‚Grenz‘-LECs voneinander getrennt (Madhavan and Madhavan, 1980; Bischoff and Cseresnyes, 2009). Nach Fusion der Histoblastennester der aufeinanderfolgenden Segmente und der Extrusion der ‚Grenz‘-LECs treten die P-Zellen eines Segments mit den A-Zellen des darauffolgenden Segments in direkten Kontakt und Morphogene können über die Segmentgrenze diffundieren. Durch die Hh Diffusion über die Segmentgrenze wird *ptc* nun in den anteriorsten Histoblasten des A-Kompartiments exprimiert. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die ‚Grenz‘-LECs die anterioren Histoblasten von der Hh-Expression des benachbarten posterioren Segments isolieren (Kopp and Duncan, 2002). Mit zunehmendem Alter (50h APF) verschwand der schmale Expressionsstreifen von ombTU12 am anterioren Rand des A-Kompartiments. Die breitere Expression anterior der A/P-Grenze blieb erhalten (Abbildung 3.5 K). Dies könnte an der einsetzenden Faltung der Epidermis liegen. Der breite Streifen war bis zum Ende der Pupalentwicklung zu sehen (Abbildung 3.5 L).

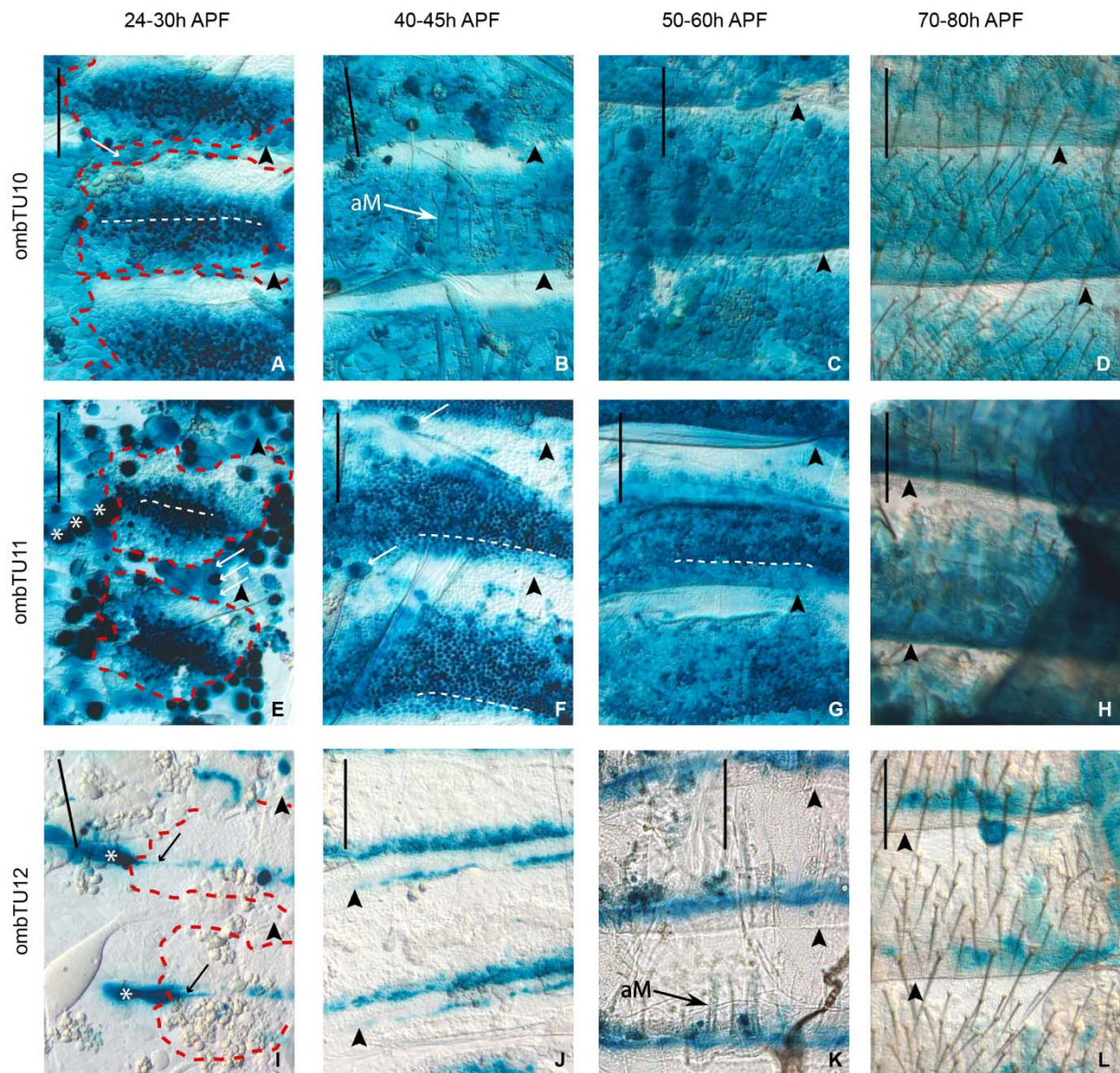


Abbildung 3.5: ombTU10, ombTU11 und ombTU12 Expression während der Entwicklung des adulten Abdomens. In A-L sind Xgal-Färbungen verschiedener Entwicklungsstadien von pupalen Abdomen zu sehen. Abgebildet ist jeweils ein komplettes Segment mit benachbarten anterioren und posterioren Segmenten. Anterior ist oben. Es handelt sich hierbei um die abdominalen Segmente A2-A4. Der schwarze Balken in jedem Bild deutet die Lage und Neigung der dorsalen Mittellinie im Bezug zum Bildausschnitt an. A-D zeigt Färbungen der Enhancer-Reporter Linie ombTU10 2-2A; E-G ombTU11 2-2D und H ombTU11 1-1D; I und L ombTU12 5-2A und J und K ombTU12 1-1C. Rote gestrichelte Linien markieren die Histoblastennester in frühen Entwicklungsstadien. Weiß gestrichelte Linien deuten die Lage der A/P-Grenze. Pfeilköpfe deuten die Segmentgrenzen an, die anhand der Lage der ‚Grenz‘-LECs, Form der Histoblastenzellen oder Faltung der Epidermis bestimmt wurden. Asteriske in E und I markieren LECs an der A/P-Kompartimentgrenze. Weiße Pfeile in E und F markieren einzelne LECs. aM = adulte longitudinale Muskel
Die Linien ombTU10 und ombTU11 wurden für 1h und ombTU12 für 2h in Xgal gefärbt.

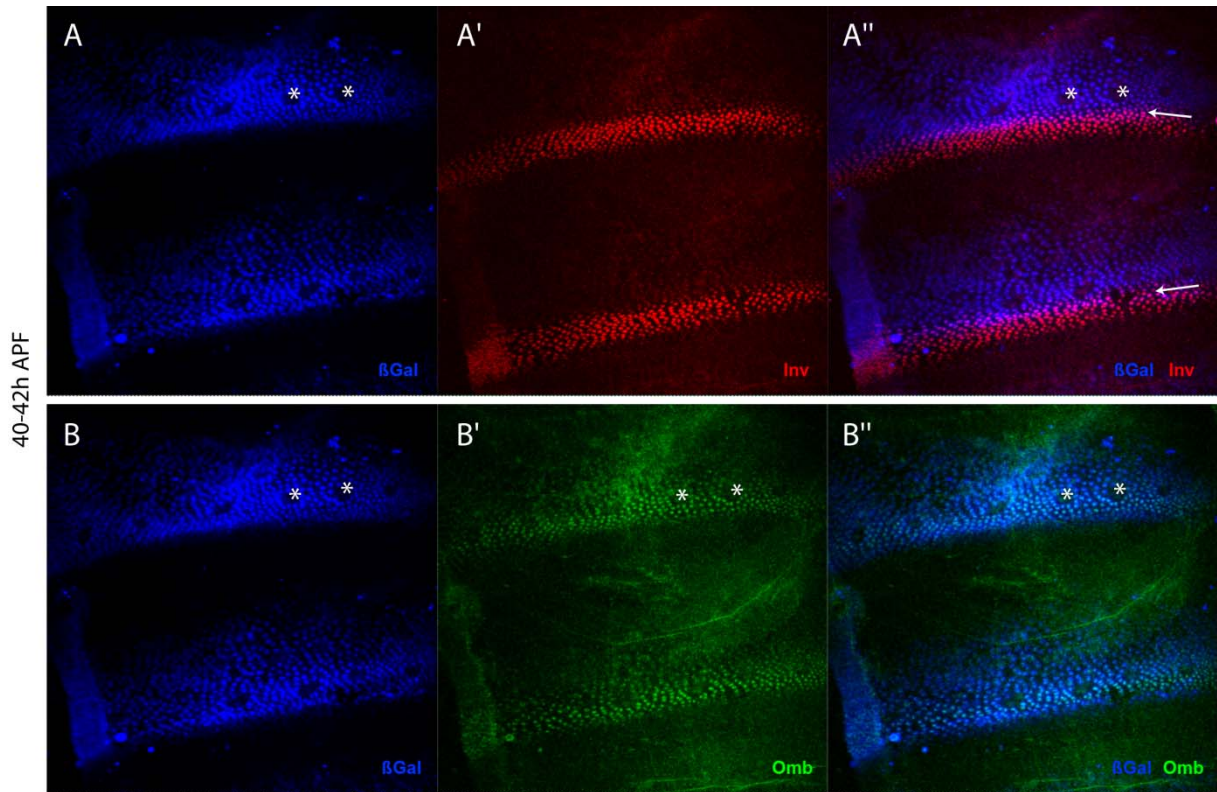


Abbildung 3.6: Konfokale Aufnahme der Antikörperfärbung gegen β -Galactosidase (β Gal), Invested (Inv) und Omb des transgenen Stammes ombTU10 (40-42h APF). In A-A'' ist die Doppelfärbung von β Gal und Inv zu sehen. Inv wird im kompletten posterioren Kompartiment exprimiert und dient als posteriorer Marker. Die Expressionsdomänen von β Gal und Inv überlappen in einem schmalen Streifen (Pfeil in A''). ombTU10 wird am stärksten an der A/P-Grenze, in einem schmalen Streifen im P Kompartiment und in der posterioren Hälfte des A Kompartiments mit einem abfallenden Gradienten exprimiert. Dabei reicht die Expressionsdomäne über die von Omb hinaus (B-B''). Asteriske markieren Zellen, die weder β Gal noch Omb exprimieren und Borsten-Vorläufer Zellen sein könnten. Anterior ist oben. Die Maximum Projektion ist hier abgebildet.

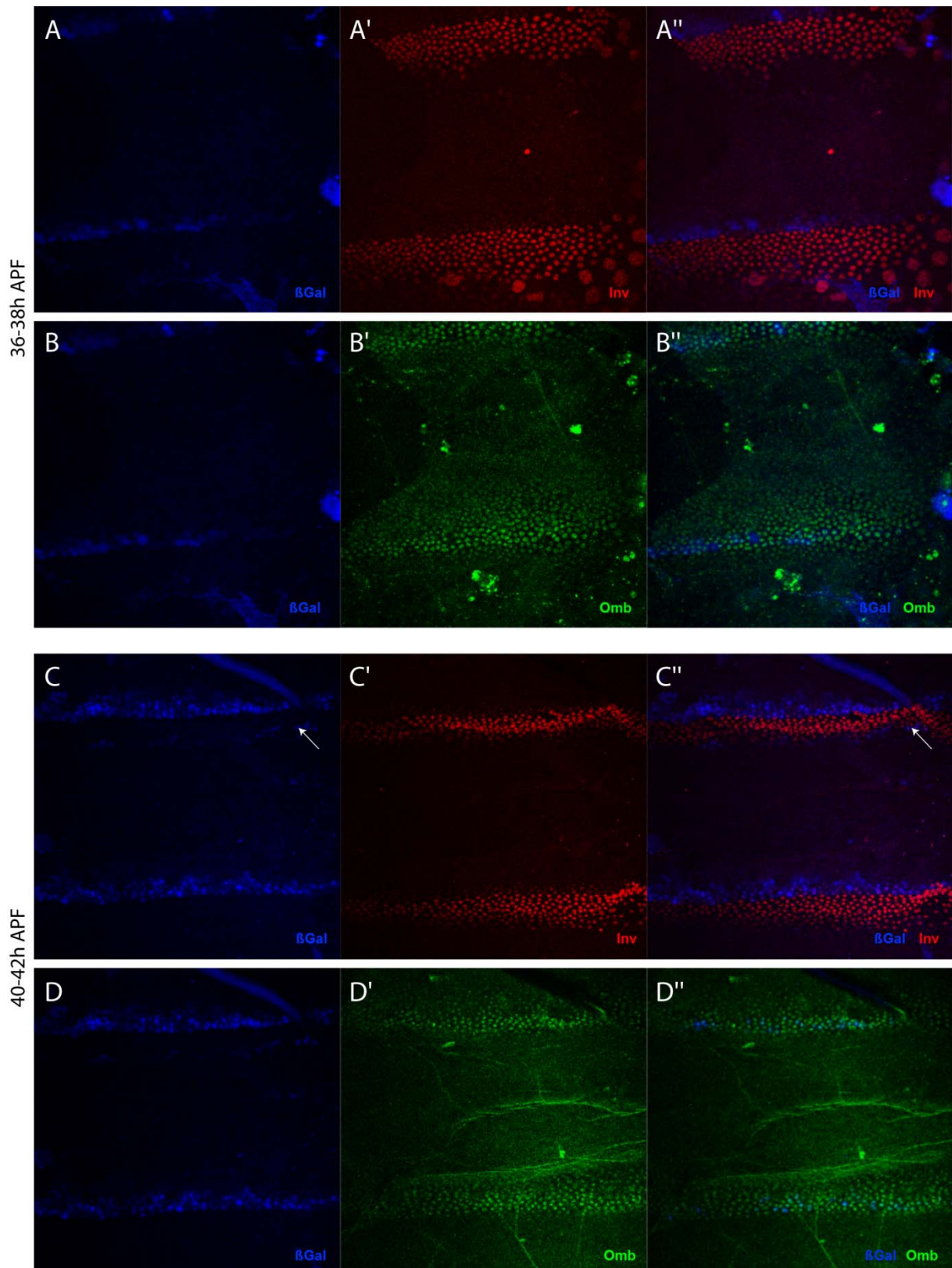


Abbildung 3.7: Konfokale Aufnahme der Antikörperfärbungen gegen β -Galactosidase (β Gal), Invested (Inv) und Omb in zwei Entwicklungsstadien (36-38h APF und 40-42h APF) des transgenen Stammes ombTU12. A-A'' und B-B'' zeigen Doppelfärbungen (β Gal und Inv; β Gal und Omb) an 36-38hAPF alten Abdomen. ombTU12 treibt lacZ-Expression in einem schmalen Streifen anterior der A/P-Grenze (A''). Inv wird im gesamten posterioren Kompartiment in Histoblasten und LEC exprimiert. Die β Gal-Expression überlappt mit der Omb-Expressionsdomäne (B-B''). Mit einem Alter von 40-42h APF treibt ombTU12 lacZ-Expression in einem breiten

Streifen oberhalb und in einem schmalen Streifen (Pfeil) unterhalb des posterioren Kompartiments (C-C''). Der breite Streifen liegt dabei innerhalb der *omb*-Expressionsdomäne (D-D''). Die Maximum Projektion ist hier abgebildet.

3.1.3.2 Subfragmente von *ombTU10* und *ombTU12*

Die Expressionsmuster der Fragmente *ombTU10*, 11 und 12 in den Tergiten zeigten, dass in dieser Region Sequenzen liegen, die möglicherweise die *omb*-Expression im Abdomen regulieren. Um die Grenzen der regulatorischen Region genauer abzustecken, wurden Subfragmente von *ombTU10* und *ombTU12* hergestellt und diese auf ihre Expression während der Entwicklung des adulten Abdomens untersucht. Aus Zeitgründen konnte *ombTU11* nicht in Subfragmente kloniert werden. In Abbildung 3.8 sind die Positionen der Subfragmente relativ zur *ombTU* abgebildet (genaue Positionen siehe Tabelle 3.9). Die Fragmente wurden in die Vektoren pBPGUw oder pGW-attB-lacZ kloniert und durch ϕ C31 Integration in den Locus 58A integriert. Alle Subfragmente von *ombTU10* zeigten Expression in den pupalen Tergiten. *ombTU10A* trieb eine schwache Expression in frühen Stadien, *ombTU10B* und *10C* zeigten eine starke Expression in der gesamten Pupalentwicklung. Insgesamt reflektieren die Expressionsmuster von *ombTU10B* und *ombTU10C* das von *ombTU10*. Von den Subfragmenten von *ombTU12* zeigte ausschließlich *ombTU12A* Expression in den Tergiten und gab das charakteristische Expressionsmuster von *ombTU12* wieder. Ein multiples Sequenzalignment der 12 sequenzierten *Drosophila* Spezies zeigte, dass im Subfragment *ombTU12A* eine hochkonservierte *Cubitus interruptus* (Ci) Bindestelle enthalten war (Abbildung 3.8). Der Transkriptionsfaktor Ci ist eine wichtige Komponente der Hh-Signaltransduktionskaskade, der die Transkription von Hh-Zielgenen aktiviert (Alexandre et al., 1996).

ombTU10A

Es wurden zwei unabhängige Linien des Fragments *ombTU10A* erhalten. *ombTU10A* trieb ein schwaches Expressionsmuster in frühen Stadien der Pupalentwicklung. Vor der Fusion der Histoblastennester war die Expression auf einen lateralen Bereich jedes Segments, der posterior der A/P-Grenze zu liegen schien, begrenzt (Pfeile Abbildung 3.9 A). Dieser dehnte sich zwischen 30-40h APF in einem schmalen Streifen, auf und anterior der A/P-Grenze gelegen, in Richtung der dorsaler Mittellinie aus (Abbildung 3.9 B). In späteren Stadien war keine Expression mehr zu sehen. Die gepunktete Färbung in Abbildung 3.9 D zeigte eine unspezifische Färbung, die bei der über-Nacht Färbung verschiedener Linien zu sehen war.

ombTU10B

Das Expressionsmuster von ombTU10B teilte das Expressionsmuster von ombTU10 in etwas diskreterer Form. Vor der Fusion der Histoblastennester an der dorsalen Mittellinie trieb ombTU10B lacZ-Expression in den Histoblastennestern, sowie in den LECs, auf der A/P-Grenze mit einem beidseitigem Gradienten (Abbildung 3.9 E). Zwischen 30-40h APF expandierte die Expression im anterioren Kompartiment in lateralen Bereichen weit nach anterior, während zur dorsalen Mittellinie hin die Expression in einem begrenzteren Bereich anterior und posterior der A/P-Grenze zu sehen war (Abbildung 3.9 F). Dieses Expressionsmuster blieb während der weiteren Entwicklung erhalten (Abbildung 3.9 G und H). Die Antikörperfärbung gegen β -Gal und Inv zeigte, dass bei einem Alter von 40-42h APF die β -Gal Expression ein bis zwei Zellreihen in das posteriore Kompartiment hineinreicht und mit Inv überlappt (Abbildung 3.10).

ombTU10C

Das Fragment ombTU10C zeigte eine sehr starke Expression in den pupalen Tergiten. Während der Expansion der Histoblastennester war die lacZ-Expression auf der A/P-Grenze am stärksten. Zum Anterioren hin wurde die Expression mit einem Gradienten schwächer (Pfeil Abbildung 3.9 I), im posterioren Kompartiment waren wenige Zellreihen stark gefärbt. Die restlichen Zellen der Histoblastennester wiesen eine ubiquitäre Färbung auf (Abbildung 3.9 I). Um 30-40h APF war fast das komplette Segment, bis auf einen schmalen Streifen am anterioren Rand des Segments gefärbt (Pfeil Abbildung 3.9 J). In späteren Stadien fiel die lacZ-Expression mit einem Gradienten von posterior nach anterior, bis über die Hälfte des anterioren Kompartiments hin ab und wurde mit zunehmenden Alter schmaler (Abbildung 3.9 K und L).

ombTU12A

Das Subfragment ombTU12A spiegelte das charakteristische Expressionsmuster des Fragments ombTU12 wieder (vergleiche Abbildung 3.5 I-L). Vor der Fusion der Histoblastennester an der dorsalem Mittellinie wurde ombTU12A in einem schmalen Streifen anterior der A/P-Grenze exprimiert (Abbildung 3.11 A und Abbildung 3.12 A). In den LECs zeigte ombTU12A eine ubiquitäre Färbung. Sobald die Histoblasten der benachbarten Segmente nicht mehr durch die ‚Grenz‘-LECs (Pfeil Abbildung 3.12 A‘) getrennt wurden, konnte man einen schmalen Streifen lacZ-Expression in den anterioren Zellen des Segments erkennen (geschwungener Pfeil Abbildung 3.11 A). In Abbildung 3.11 A waren noch letzte ‚Grenz‘-LECs zu sehen (weiße Pfeile). Nachdem diese extrudiert worden waren, war anterior der A/P-Grenze ein breiterer Streifen und in einem schmalen Streifen posterior der Segmentgrenze eine Färbung zu sehen (Abbildung 3.11 B und Abbildung 3.12 B). Die beiden Streifen umrandeten somit das posteriore Kompartiment. Der schmale Streifen, der etwa einer

Zellreihe am anterioren Ende des A Kompartiments entsprach, war in älteren Stadien nicht mehr zu sehen, was jedoch auch an der beginnenden Faltung der Epidermis liegen könnte und dadurch vom breiten Streifen, anterior der A/P-Grenze, überdeckt wurde (Abbildung 3.11 C und D).

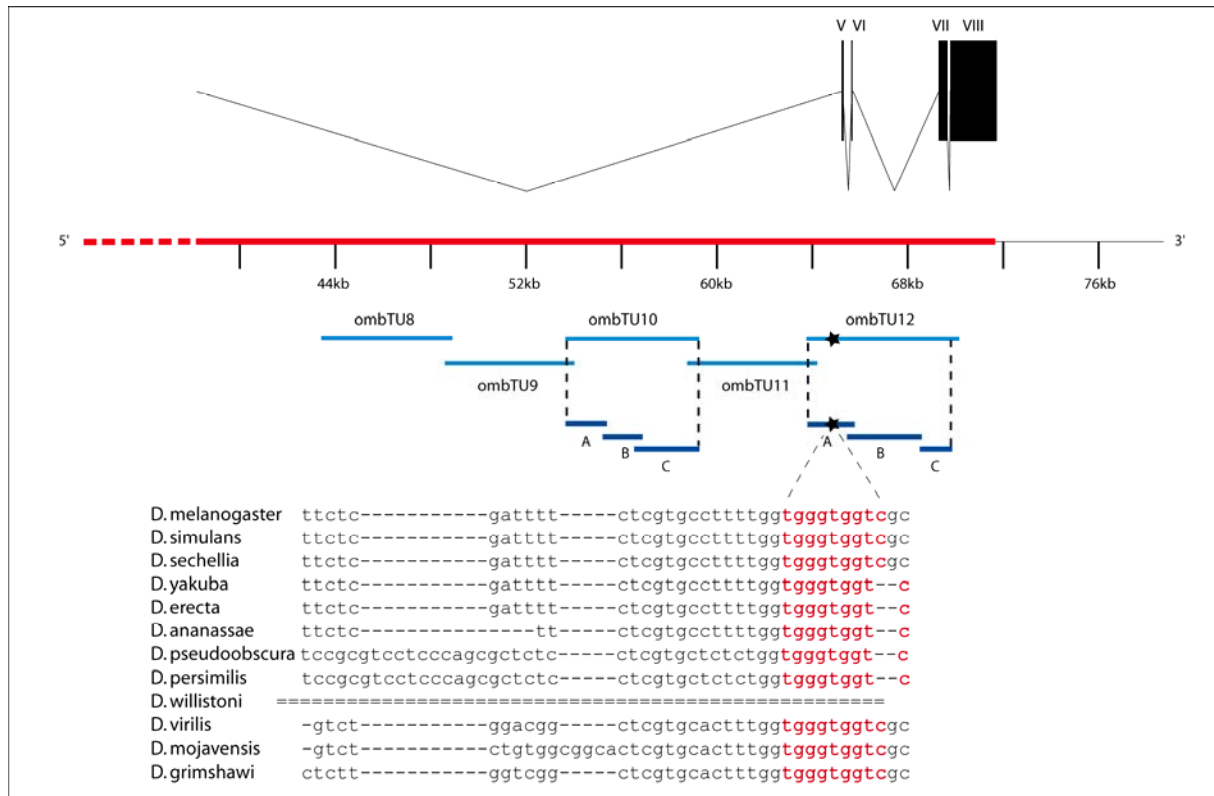


Abbildung 3.8: Positionen der Subfragmente von ombTU10 und ombTU12. Im Subfragment ombTU12A wurde eine hochkonservierte Cubitus interruptus (Ci) Bindedomäne identifiziert (Stern). Das multiple Sequenzalignement der Familie der Drosophilidae eines Abschnitts von ombTU12A ist hier abgebildet. Die rot markierten Basen entsprechen der Ci-Bindedomäne.

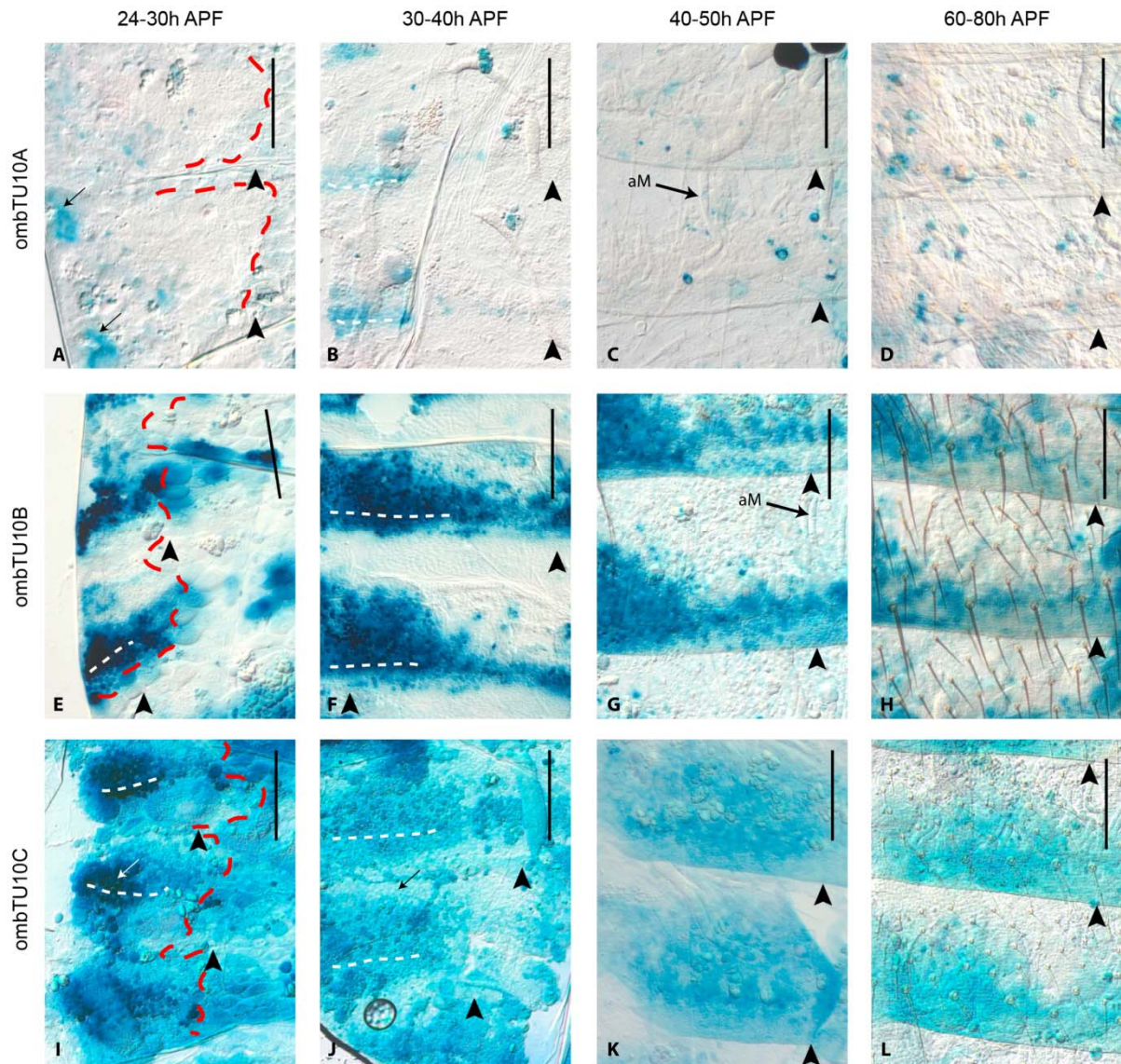


Abbildung 3.9: Expressionsmuster der Subfragmente ombTU10A, ombTU10B und ombTU10C in der Entwicklung des adulten Abdomens. In A-L sind Xgal-Färbungen verschiedener Entwicklungsstadien von pupalen Abdomen zu sehen. Abgebildet ist jeweils ein komplettes Segment mit benachbarten anterioren und posterioren Segmenten. Anterior ist oben. Es handelt sich hierbei um die abdominalen Segmente A2-A4. Der schwarze Balken in jedem Bild deutet die Lage und Neigung der dorsalen Mittellinie im Bezug auf den Bildausschnitt an. Rote gestrichelte Linien markieren die Histoblastennester in frühen Entwicklungsstadien. Weiß gestrichelte Linien geben die Lage der A/P-Grenze an. Pfeilköpfe deuten die Segmentgrenzen an, die anhand der Lage der ‚Grenz‘-LECs, Form der Histoblastenzellen oder Faltung der Epidermis bestimmt wurde. In A-L ist das Expressionsmuster des Fragments ombTU10A Linie 1-1B, in E-H das Expressionsmuster ombTU10B Linie 766 und in I-L ombTU10C Linie 4B zusehen. aM = adulter longitudinaler Muskel

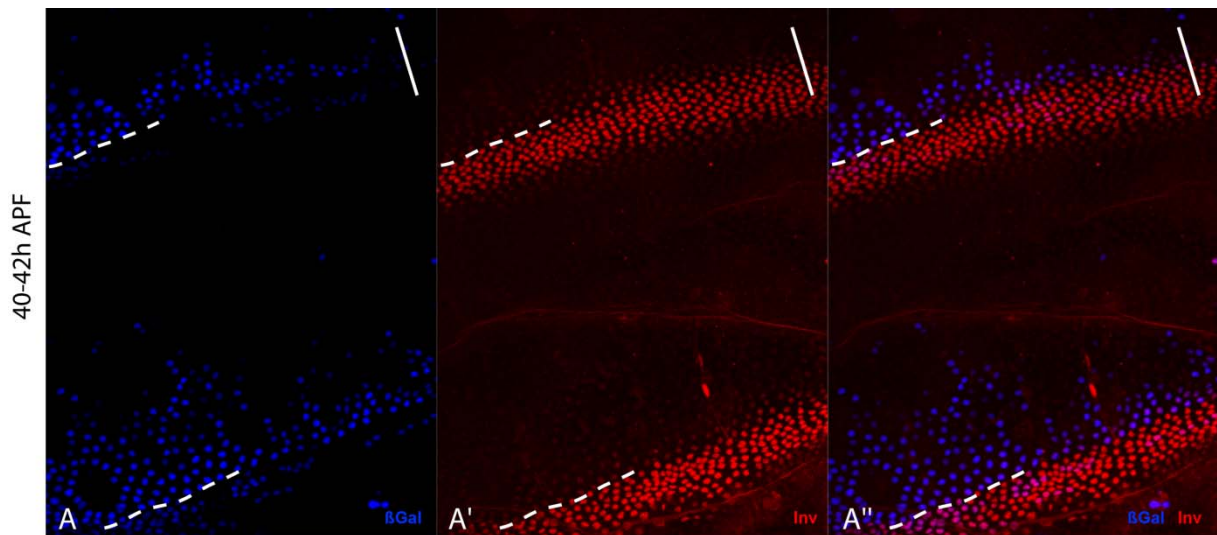


Abbildung 3.10: Konfokale Aufnahme der Antikörperfärbung gegen β -Galactosidase (β Gal) und Inverted (Inv) des transgenen Stammes ombTU10B. In A-A'' ist eine Doppelfärbung gegen β Gal und Inv zu sehen. Inv wird im kompletten posterioren Kompartiment exprimiert und dient als posteriorer Marker. Der weiße Balken gibt Lage und Neigung der dorsalen Mittellinie an. Die Expressionsdomänen von β Gal und Inv überlappen in einem schmalen Streifen. ombTU10B wird durchgängig an der A/P-Grenze und in einem schmalen Streifen im P Kompartiment exprimiert. Die Dichte der β Gal exprimierenden Zellen nimmt in anteriore Richtung hin ab und reicht in lateralen Bereichen des A Kompartiments weiter nach anterior als in Bereichen nahe der dorsalen Mittellinie. Die Maximum Projektion ist hier abgebildet.

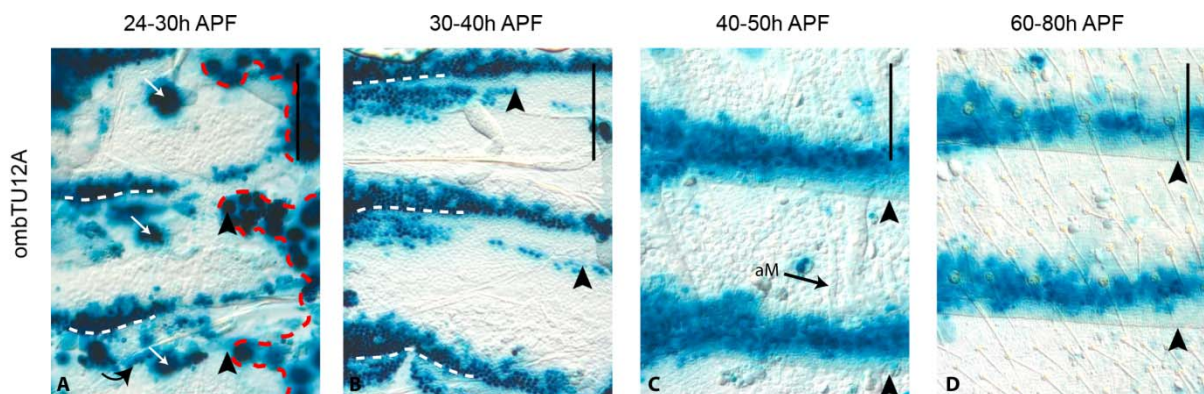


Abbildung 3.11: Expression des Subfragments ombTU12A in der Entwicklung des adulten Abdomens. In A-L sind Xgal-Färbungen verschiedener Entwicklungsstadien von pupalen Abdomen zu sehen. Abgebildet ist jeweils ein komplettes Segment mit benachbarten anterioren und posterioren Segmenten. Anterior ist oben. Es handelt sich hierbei um die abdominalen Segmente A2-A4. Der schwarze Balken in jedem Bild deutet die Lage und Neigung der dorsalen Mittellinie im Bezug auf den Bildausschnitt an. Rote gestrichelte Linien markieren die Histoblastennester in frühen Entwicklungsstadien. Weiß gestrichelte Linien geben die Lage der A/P-Grenze an. Pfeilköpfe deuten die Segmentgrenzen an, die anhand der Lage der ‚Grenz‘-LECs, Form der Histoblastenzellen oder Faltung der Epidermis bestimmt wurde. Hier ist die ombTU12A Linie 1-1A abgebildet. Weiße Pfeile in A markieren letzte ‚Grenz‘-LECs, der geschwungene Pfeil deutet die einsetzende Färbung der anterioren Zellen des anterioren Kompartiments an. aM = adulte longitudinaler Muskel

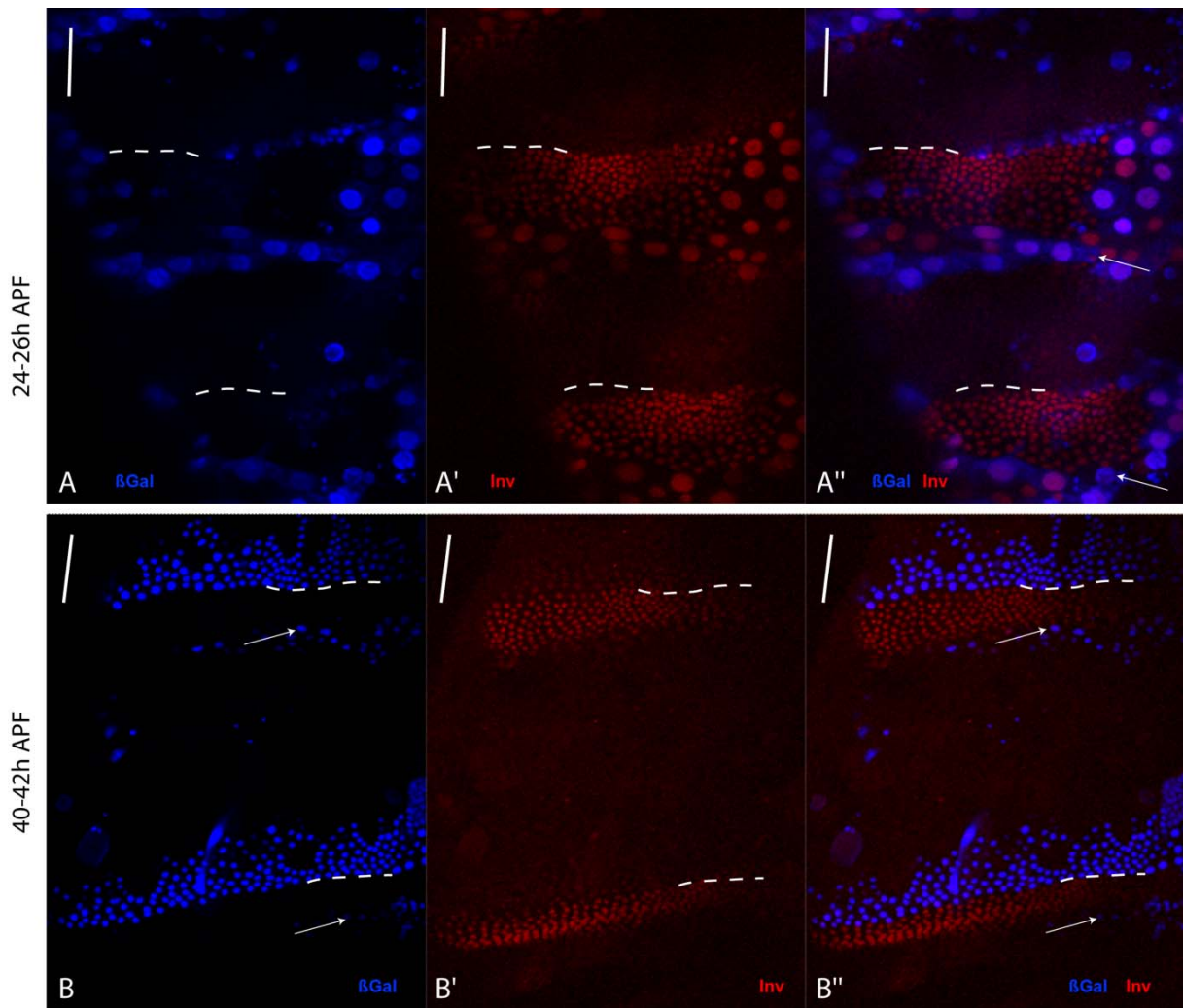


Abbildung 3.12: Konfokale Aufnahme der Antikörperfärbung gegen β -Galactosidase (β Gal) und Inverted (*Inv*) an zwei verschiedenen Stadien des transgenen Stammes *ombTU12A*. A-A'' und B-B'' zeigen Doppelfärbungen (β Gal und *Inv*) an 24-26h APF und 40-42h APF alten Abdomen. (A) *ombTU12A* treibt lacZ-Expression in einem schmalen Streifen anterior der A/P-Grenze. *Inv* wird im gesamten posterioren Kompartiment in Histoblasten und LEC exprimiert. Pfeile in A'' markieren „Grenz“-LECs. (B) Mit einem Alter von 40-42h APF treibt *ombTU12A* lacZ-Expression in einem breiten Streifen oberhalb und in einem schmalen Streifen unterhalb des posterioren Kompartiments (Pfeil B und B''). Die Maximum Projektion ist hier abgebildet.

3.1.4 Hedgehog-Abhängigkeit des *omb* Tergiten-Enhancers

Durch ein multiples Sequenzalignment der Familie der Drosophilidae wurde in ombTU12 eine hoch konservierte *Cubitus interruptus* (Ci) Bindedomäne identifiziert (Abbildung 3.8). Der Transkriptionsfaktor Ci ist eine wichtige Komponente der Hh-Signaltransduktionskaskade und aktiviert im Embryo und in der Flügelimaginalscheibe die Expression von Hh-Zielgenen (Hepker et al., 1997). In der Pigmentierung der posterioren Region des anterioren Kompartiments der Segmente des adulten Abdomen spielt das sezernierte Hh-Protein eine Schlüsselrolle. Es wurde gezeigt, dass *omb* als Mediator der Hh-abhängigen Pigmentierung des adulten Abdomen fungiert (Kopp and Duncan, 1997). Für spätere Stadien der Pupalentwicklung (40h APF) wurde gezeigt, dass die Omb-Expression im *hh*-mutanten Hintergrund stark reduziert bis eliminiert wurde. Dagegen hatte die Abwesenheit von *hh* in früheren Stadien (24h APF), in denen Omb mit einem beidseitigen Gradienten an der A/P-Grenze exprimiert wird, nur wenig Auswirkung auf die Omb-Expression (Kopp and Duncan, 2002). Die konservierte Ci-Bindestelle in ombTU12 könnte einen Hinweis darauf geben, dass Hh die Transkription von *omb* über Ci aktiviert. Außerdem zeigte ombTU12 und dessen Subfragment ombTU12A ein für Hh-Zielgene charakteristisches Expressionsmuster.

Hier wurde die Hh-Abhängigkeit der Enhancer-Reporter Stämme ombTU10 und ombTU12 getestet. In diese Stämme wurde ein TM6,Tb balanciertes *hh^{ts}*-Allel eingekreuzt und unter der permissiven Temperatur von 17°C gehalten. Bei Beginn der Pupalentwicklung wurden die Tiere auf die nicht-permissive Temperatur von 29°C transferiert und bis zur Präparation dort gehalten.

Das Fragment ombTU10 zeigte im *hh*-mutanten Hintergrund keine Veränderung des Expressionsmusters. In jungen, wie in alten Stadien war keine Veränderung des ombTU10-Expressionsmusters zu sehen. Als Beispiel ist hier das Entwicklungsstadium 32-34h APF aufgeführt, das die charakteristische starke lacZ-Expression bis weit ins anteriore Kompartiment hinein zeigt (Abbildung 3.13).

In ombTU12; *hh^{ts}* Tieren war eine deutliche Reduktion der lacZ-Expression zu sehen. Im *hh*-mutanten Hintergrund war in Stadien um 18h APF keine Färbung in den LECs an der A/P-Grenze des Segments bzw. nur eine schwache Färbung einzelner Zellen, im Gegensatz zu den stark gefärbten LEC des Wildtyps, zu sehen (Abbildung 3.14). Auch in späteren Stadien war die Expression anterior der A/P-Grenze drastisch reduziert bis nicht zu sehen. Die Aktivität von ombTU12 ist daher Hh-anhängig, möglicherweise vermittelt durch die Ci-Bindestelle.

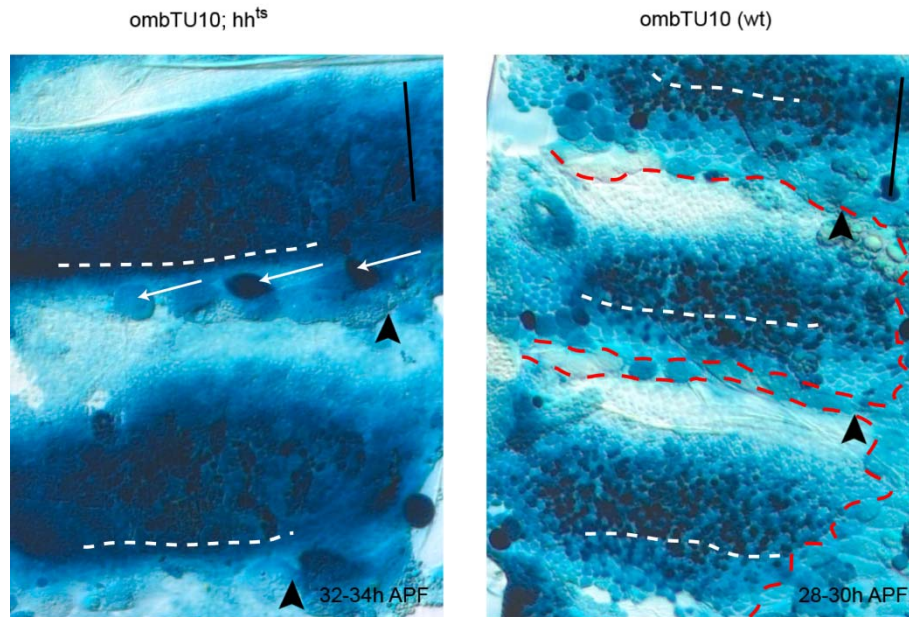


Abbildung 3.13: Expression des Fragments ombTU10 im hh^{ts} -Hintergrund. Xgal Färbung des hh -mutanten Abdomens mit dem Genotyp $ombTU10/ombTU10; hh^{ts}/hh^{ts}$, 32-36hAPF. Die Tiere wurden von Beginn des L3-Larvenstadiums bis zur Präparation (55h) auf 29°C gehalten. Das in der Abbildung angegebene Alter entspricht dem entwicklungsbiologischen Alter. Als Kontrolle diente ombTU10 im wildtypischen Hintergrund, 28-30h APF. Die Pfeilköpfe deuten die Segmentgrenzen an, der schwarze Balken gibt Lage und Neigung der dorsalen Mittellinie an, weiße Pfeile markieren die ‚Grenz‘-LECs, weiße gestrichelte Linie markiert die A/P-Grenze und die rote gestrichelte Linie die Histoblastennester.

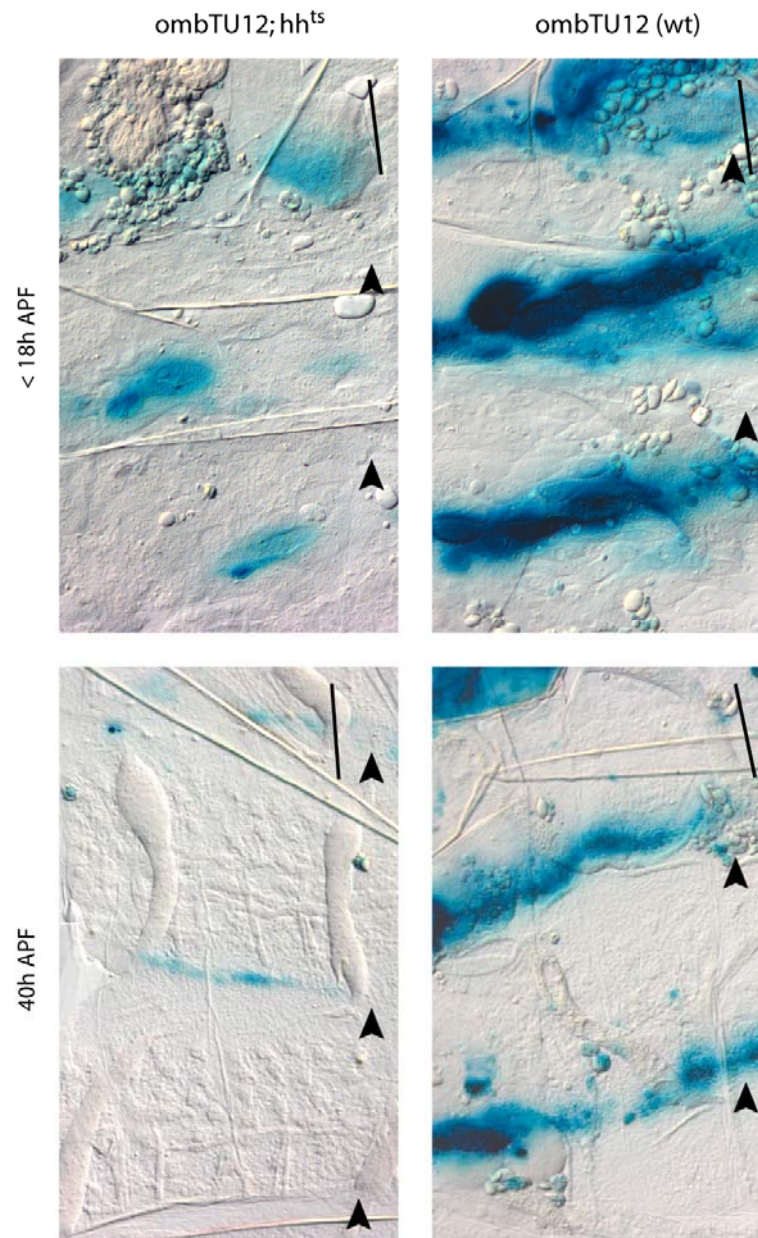


Abbildung 3.14: Expression des Fragments ombTU12 im hh^{ts} -Hintergrund. Xgal Färbung des hh -mutanten Abdomens mit dem Genotyp $ombTU12/ombTU12; hh^{ts}/hh^{ts}$. Die Tiere wurden von Beginn des L3-Larvenstadiums bis zur Präparation (53h) auf 29°C gehalten. Das in der Abbildung angegebene Alter entspricht dem entwicklungsbiologischen Alter. Als Kontrolle diente der wildtypische Enhancer-Reporter Stamm ombTU12, der der gleichen Behandlung unterlag wie der hh -mutante Stamm. Die Pfeilköpfe deuten die Segmentgrenzen an, der schwarze Balken gibt Lage und Neigung der dorsalen Mittellinie an.

3.1.4.1 Analyse des Subfragments ombTU12A

Das Subfragment ombTU12A enthält die letzten 1,5kb des Introns IV sowie die ersten 400bp des Exons V. Durch multiple Sequenzalignments von ombTU12A der Familie der Drosophilidae wurden konservierte und nicht-konservierte Sequenzen identifiziert. Zur besseren Charakterisierung des in ombTU12A enthaltenen Enhancers wurde ein Minimalfragment ombTU12Amin hergestellt. Diesem

Fragment fehlen die nicht-konservierten 5' gelegenen 250bp von ombTU12A, sowie 200bp 3' gelegene nicht-konservierte intronische Sequenz und die 400bp des Exons V. Zusätzlich zur oben beschriebenen hoch-konservierten Ci-Bindedomäne (siehe 3.1.3.2 Abbildung 3.8; von nun an Ci22) wurde eine weitere hoch-konservierte Ci-Bindedomäne (Ci21) identifiziert (Abbildung 3.15). Die Sequenz der hoch-konservierten Domäne Ci22 entspricht der von (Von Ohlen et al., 1997) identifizierten Ci-Bindesequenz im *wg*-Promotor. Dieses Sequenzmotiv ist ebenfalls in der hoch-konservierten und hoch-affinen Ci-Domäne des *patched (ptc)*-Enhancers enthalten (Parker et al., 2011). Ci21 trägt an Position zwei, im Vergleich zu Ci22, ein Basenaustausch (G nach T). Im Enhancer des Hh-Zielgens *decapentaplegic (dpp)* sind drei Ci-Bindedomänen enthalten, die je zwei bis drei Basenaustausche enthalten. Diese werden für die korrekte Expression von *dpp* in Regionen niedriger Hh Konzentration benötigt und wurden von Parker et al. (2011) als niederaffin und weniger konserviert charakterisiert.

Zusätzlich zu den zwei beschriebenen Ci-Bindestellen enthält ombTU12Amin ein *Tbx binding element* (TBE) (Abbildung 3.15 TBE20). Dieses wurde in einer bioinformatischen Suche identifiziert (Binbas, 2009). TBEs binden Tbx-Proteine wie den Transkriptionsfaktor Omb (Sen et al., 2010). In wieweit Omb an seiner eigenen Regulation im pupalen Abdomen beteiligt ist, ist bisher nicht bekannt.

Im distalen Bereich von ombTU12Amin wurde eine Bindestelle des Effektors Mothers against Dpp (Mad) der *dpp*-Signaltransduktionskaskade lokalisiert (Abbildung 3.15). Mad gehört zur Familie der extrazellulären Smad-Proteine, die in ihrer aktivierten Form in den Nukleus translozieren und dort als Transkriptionsfaktor fungieren. In der Flügelimaginalscheibe wird *omb* durch Dpp reguliert (Grimm and Pflugfelder, 1996).

Um den Einfluss der verschiedenen Bindestellen auf das Expressionsmuster von ombTU12Amin zu untersuchen, wurden Subfragmente hergestellt, in denen eine oder mehrere Bindestelle nicht enthalten waren. Das Konstrukt ombTU12Amin-delTBE20 enthält alle Bindestellen, außer TBE20. In ombTU12Amin-delTBE20,Ci21 fehlen TBE20 und Ci21. In einem weiteren Subkonstrukt ombTU12Amin-delMad fehlt die Mad-Bindestelle (Abbildung 3.15). Alle Subfragmente wurden in derselben Orientierung in den Expressionsvektor pGW-attB-lacZ (Hoffmann, 2011) kloniert und in den Locus 58A integriert. Von jedem Konstrukt wurden transgene Linien etabliert und heterozygote Tiere auf die abdominale Expression mittels Xgal-Färbung untersucht.

Das Minimalfragment ombTU12Amin zeigte das charakteristische Expressionsmuster des Fragments ombTU12A (Abbildung 3.16 A und A'; vergleiche mit Abbildung 3.11). In Stadien vor der Fusion der dorsalen Histoblastennester der benachbarten Segmente wurde ombTU12Amin in einem schmalen Streifen anterior der A/P-Grenze exprimiert (Abbildung 3.16 A). Die Expression in den LECs war schwach aber ubiquitär, mit verstärkter Expression in den ‚Grenz‘-LECs (Pfeil Abbildung 3.16 A). Nach Fusion der Histoblastennester und der Extrusion der ‚Grenz‘-LECs war ein schmaler Streifen in den

anteriorsten Zellen des anterioren Kompartiments zu sehen (Abbildung 3.16 A'). Somit wurde das posteriore Kompartiment von einem breiten Streifen oberhalb der A/P-Grenze und einem schmalen Streifen unterhalb der Segmentgrenze umrandet. Dieses ‚Doppelstreifen‘-Expressionsmuster war typisch für ombTU12A sowie ombTU12. Die Subfragmente von ombTU12Amin zeigten in beiden Entwicklungsstadien das gleiche Expressionsmuster mit dem schmalen Streifen anterior der A/P-Grenze vor Fusion der Histoblastennester (Abbildung 3.16, B: ombTU12Amin-delTBE20, C: ombTU12Amin-delTBE20,Ci21, D: ombTU12Amin-delMad) und dem ‚Doppelstreifen‘-Expressionsmuster nach der Fusion der Histoblastennester (Abbildung 3.16, B': ombTU12Amin-delTBE20, C': ombTU12Amin-delTBE20,Ci21, D': ombTU12Amin-delMad). Diese Ergebnisse zeigen, dass weder TBE20, noch die Bindedomäne-Ci21, noch Mad ausschlaggebend für das charakteristische ‚Doppelstreifen‘-Expressionsmuster des Fragments ombTU12Amin sind.

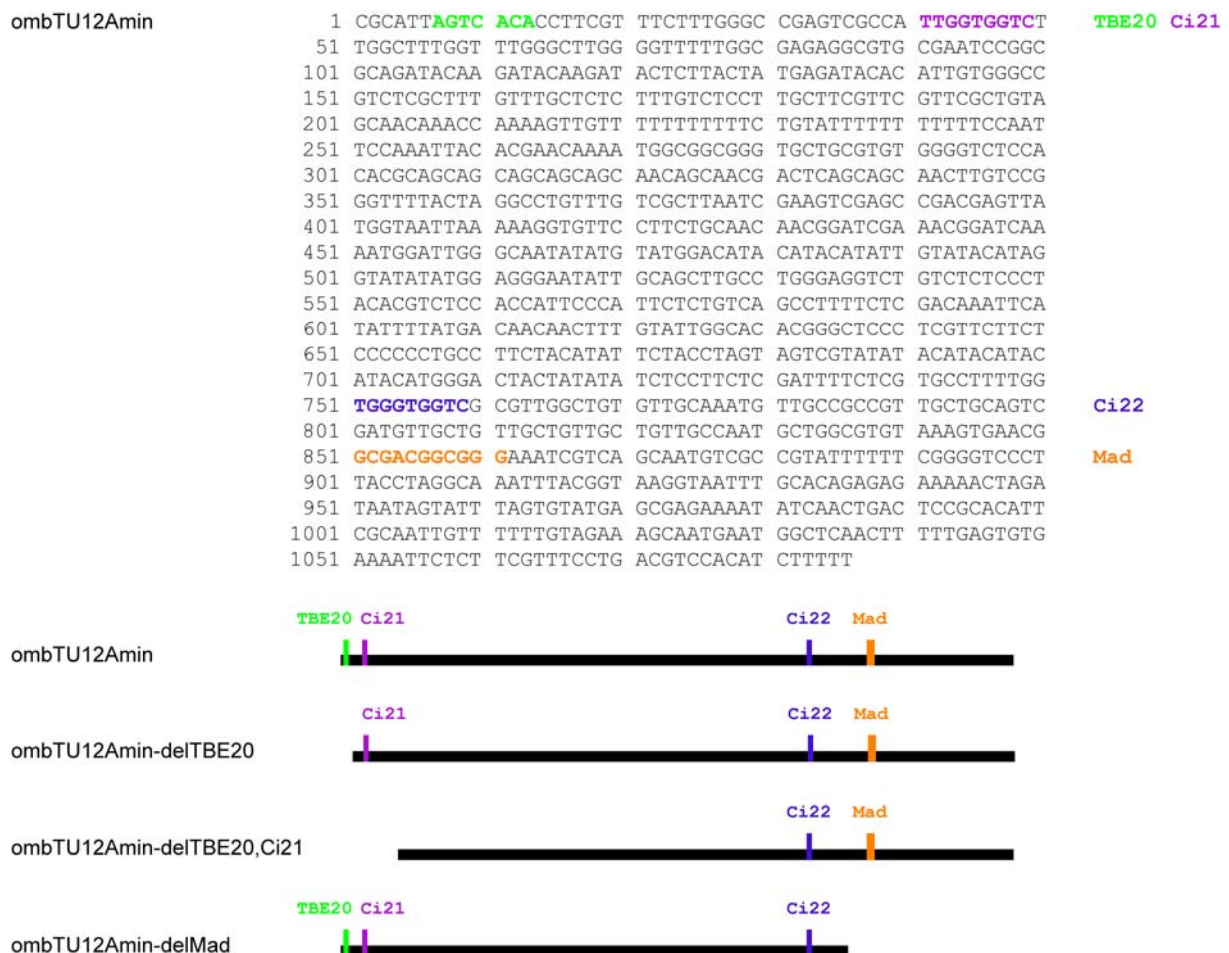


Abbildung 3.15: ombTU12Amin und seine Subfragmente. Die Sequenz des Minimalfragments ombTU12Amin und die identifizierten Bindestellen sind abgebildet. In grün TBE20, in lila Ci21, in blau Ci22 und in orange Mad. Das Minimalfragment sowie seine Subfragmente sind unterhalb der Sequenz schematisch dargestellt.

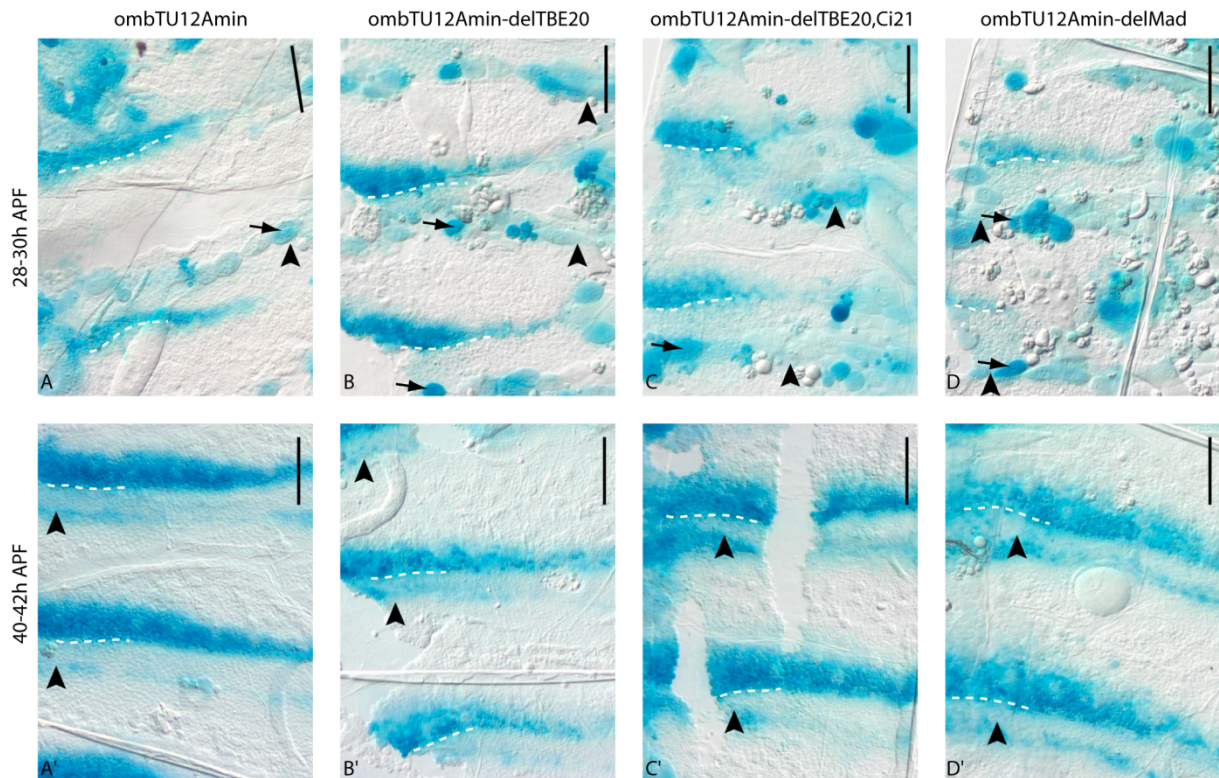


Abbildung 3.16: Expressionsmuster des Minimalfragments ombTU12Amin und seinen Subfragmenten in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien des pupalen Abdomens. In A – D sind die Xgal-Färbungen der Fragmente ombTU12Amin, ombTU12Amin-delTBE20, ombTU12Amin-delTBE20,Ci21 und ombTU12Amin-delMad heterozygoter Tiere bei einem Entwicklungsalter von 28-30h APF und in A' – D' die Expressionsmuster bei 40-42h APF zu sehen. Abgebildet ist jeweils ein komplettes Segment mit benachbarten anterioren und posterioren Segmenten. Anterior ist oben. Es handelt sich hierbei um die abdominalen Segmente A2-A4. Der schwarze Balken in jedem Bild deutet die Lage und Neigung der dorsalen Mittellinie im Bezug auf den Bildausschnitt an. Die weiß gestrichelte Linie deutet die A/P-Kompartimentgrenze an; Pfeilköpfe die Segmentgrenze. Pfeile in A-D markieren einzelne ‚Grenz‘-LECs. Von Fragment ombTU12Amin wurde die Linie 1B, von ombTU12Amin-delTBE20 die Linie 1B, von ombTU12Amin-delTBE20,Ci21 die Linie 4B und von ombTU12Amin-delMad die Linie 3B für 20min gefärbt.

3.1.4.2 Mutation und Oligomerisierung der hoch-konservierten Ci-Bindestelle Ci22

In jedem der in Kapitel 3.1.4.1 hergestellten Subfragmente des Minimalfragments ombTU12A war die hochaffine Ci22-Bindestelle enthalten. Um deren Einfluss auf das ‚Doppelstreifen‘-Expressionsmuster der ombTU12-Konstrukte zu erklären, wurde die hochaffine Sequenz von Ci22 mutiert. Dafür wurde an Position vier, sechs und sieben von Ci22 eine Base ausgetauscht (Abbildung 3.17). Dies wurde durch eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Die Mutation wurde zum einen im Minimalfragment ombTU12Amin und zum anderen im Subfragment ombTU12Amin-delTBE20,Ci21, um eine redundante Wirkung der Ci-Bindedomänen auszuschließen, eingeführt. Um den Effekt der hochaffinen Bindestelle weiter zu untersuchen, wurden zwei zusätzliche hochaffine Ci22-Bindestellen in ombTU12Amin eingeführt. Hierfür wurde eine in ombTU12Amin wenige Basenpaare vor Ci22 liegende BssSI-Schnittstelle genutzt, um synthetisch hergestellte Oligomere von Ci22 zu ligieren (Abbildung 3.17 ombTU12Amin-Ci22oligo). Das Fragment ombTU12Amin-Ci22oligo enthält somit drei hochaffine Ci22-Bindestellen, sowie die Ci21-Bindestelle. Die Fragmente wurden in derselben Orientierung in den Expressionsvektor pGW-attB-lacZ (Hoffmann, 2011) kloniert und in den Locus 25C6 integriert.

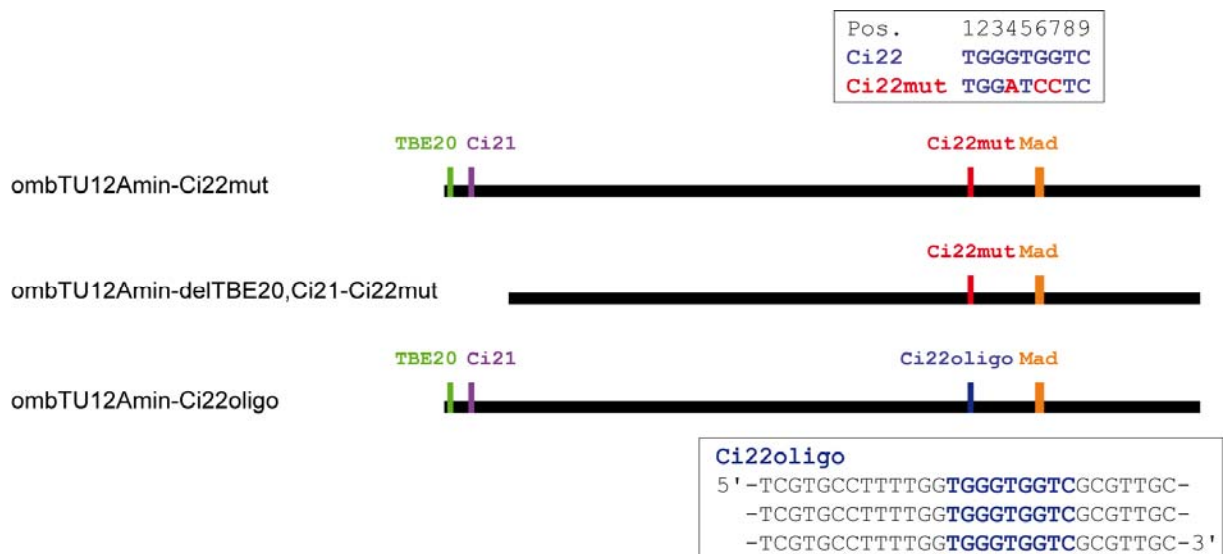


Abbildung 3.17: Mutation und Oligomerisierung von Ci22 in ombTU12Amin. Mutation der Ci22-Bindestelle in ombTU12Amin und ombTU12Amin-delTBE20,Ci21. An Position vier, sechs und sieben von Ci22 fand ein Basenaustausch statt. Das Fragment ombTU12Amin-Ci22oligo enthält zusätzlich zur vorkommenden Ci22-Bindestellen zwei weitere hochaffine Ci22-Bindestellen.

Das Fragment ombTU12Amin-Ci22oligo sowie die Fragmente, die die mutierte Ci22 *site* enthalten, zeigten lediglich eine subtile Veränderung des Expressionsmusters in den pupalen Abdomen im Vergleich zu ombTU12Amin (Abbildung 3.18). In den Stadien vor der Fusion der benachbarten Histoblastennester war bei allen drei Fragmenten ein schmaler Expressionsstreifen, direkt anterior

der A/P-Grenze gelegen, zu sehen (28-30h APF, Abbildung 3.18 B – D), was dem Expressionsmuster des Fragments ombTU12Amin entsprach (Abbildung 3.18 A). In den hier abgebildeten Abdomen wurden die Histoblastennester je durch eine Reihe ‚Grenz‘-LECs voneinander isoliert (Abbildung 3.18 A – D, Pfeile). In späteren Stadien nach der Fusion der Histoblastennester der benachbarten Segmente zeigten alle Fragmente das für ombTU12Amin typische Doppelstreifen-Expressionsmuster (Abbildung 3.18 E – H). Generell war der Expressionsstreifen anterior der A/P-Grenze von ombTU12Amin-Ci22oligo in beiden Stadien geringfügig schmaler als bei ombTU12Amin (weiße Pfeile Abbildung 3.18 B und F). In frühen Stadien von ombTU12Amin-Ci22mut Abdomen schien der Expressionsstreifen in den Histoblastennestern schwächer und etwas schmaler als bei ombTU12Amin (weiße Pfeile Abbildung 3.18 C). Bei einem Alter von 40-42h APF lag die Breite des Expressionsstreifens zwischen der Breite von ombTU12Amin und dem schmalen Expressionsstreifen von ombTU12Amin-Ci22oligo (weiße Pfeile Abbildung 3.18 G). Im Fall von ombTU12Amin-delTBE20,Ci21-Ci22mut war eine Verbreiterung des anterior zur A/P-Grenze gelegenen Expressionsstreifens zu sehen (weiße Pfeile Abbildung 3.18 D und H). Bei einem Alter von 28-30h APF war die lacZ Expression des Expressionsstreifens und der LECs (schwarze Pfeile Abbildung 3.18 D) stärker als bei den anderen Fragmenten. Hier war auch eine schwache Expression in posterioren Kompartiment des Histoblastennestes zu sehen (Asteriske Abbildung 3.18 D). Bei einem Alter von 40-42h APF war eine Verbreiterung des anterioren Expressionsstreifens (weißer Pfeil Abbildung 3.18 H), vor allem im Bereich der dorsalen Mittellinie zu sehen. Der schmale Expressionsstreifen am anterioren Rand des anterioren Kompartiments war deutlich breiter als bei ombTU12Amin (schwarze Pfeile Abbildung 3.18 H).

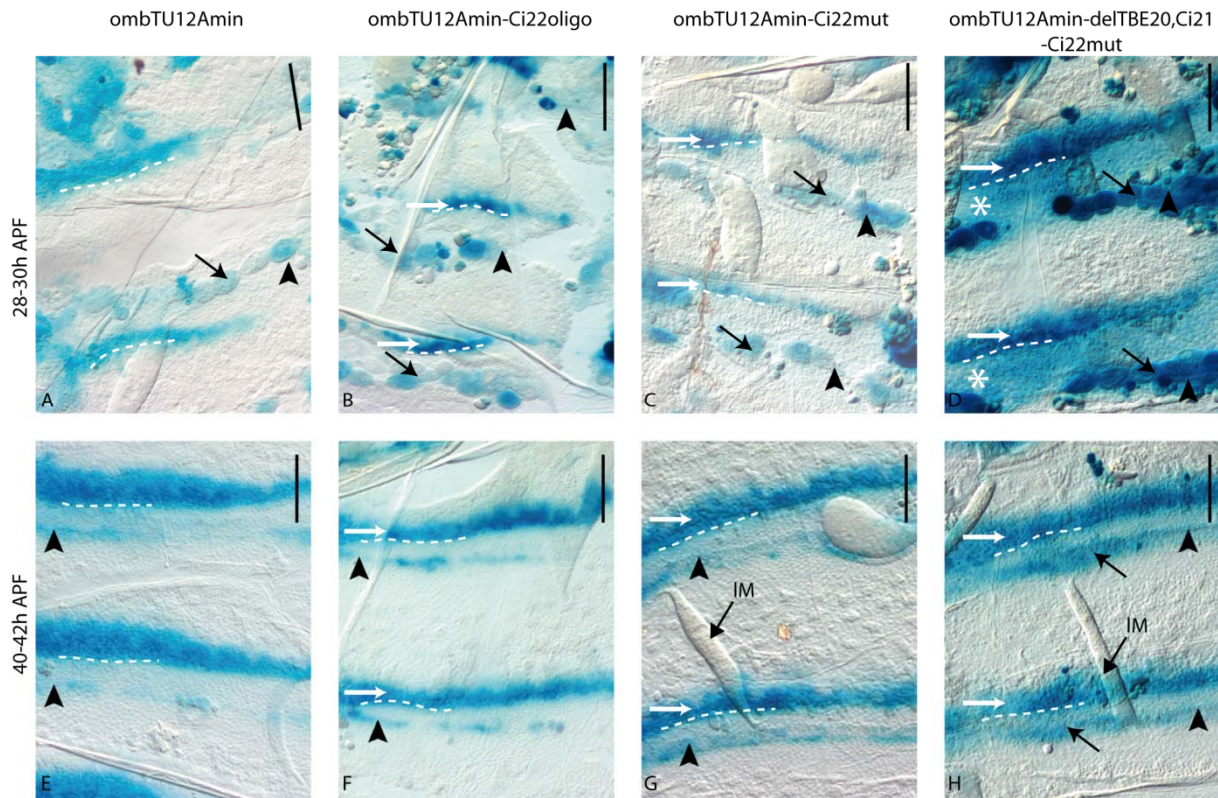


Abbildung 3.18: Expressionsmuster der Fragmente der mutierten oder oligomerisierten Ci22 Bindestelle in ombTU12Amin. In A – D sind die Expressionsmuster der Fragmente ombTU12Amin, ombTU12Amin-Ci22oligo, ombTU12Amin-Ci22mut und ombTU12Amin-deltaTBE20,Ci21-Ci22mut heterozygoter Tiere bei einem Entwicklungsalter von 28-30h APF und in E – H die Expressionsmuster bei 40-42h APF nach Xgal-Färbung zu sehen. Abgebildet ist jeweils ein komplettes Segment mit benachbarten anterioren und posterioren Segmenten. Anterior ist oben. Es handelt sich hierbei um die abdominalen Segmente A2-A4. Der schwarze Balken in jedem Bild deutet die Lage und Neigung der dorsalen Mittellinie im Bezug auf den Bildausschnitt an. Die weiß gestrichelte Linie deutet die A/P-Kompartimentgrenze an; Pfeilköpfe die Segmentgrenze. Schwarze Pfeile in A – D deuten auf ‚Grenz‘-LECs, die benachbarte Histoblastennester voneinander isolieren. Weiße Pfeile in B – D und F – H deuten den anterior zu A/P-Grenze liegenden Expressionsstreifen an. Asteriske in D markieren das posteriore Kompartiment des Histoblastennests. Schwarze Pfeile in H markieren den schmalen Expressionsstreifen am anterioren Rand des anterioren Kompartiments. IM = larvaler longitudinaler Muskel. Von Fragment ombTU12Amin wurde die Linie 1B für 20 min in Xgal, von ombTU12Amin-Ci22oligo die Linie 2B, von ombTU12Amin-Ci22mut die Linie 2B und von ombTU12Amin-deltaTbe20,Ci21-Ci22mut die Linie 1B für 1,5h in Xgal gefärbt.

3.1.5 Deletionen verschiedener Bereiche der endogenen *omb* Tergiten-Enhancer Region durch homologe Rekombination

Wie in Kapitel 3.1.3 gezeigt wurde, befinden sich in Intron IV von *omb* in den Bereichen von *ombTU10A* bis *ombTU12A* Abdomen-spezifische regulatorische Sequenzen. Durch endogene Deletionen verschiedener Bereiche dieses Tergiten-Enhancers sollte deren Bedeutung für die *Omb*-Expression in der Entwicklung des adulten Abdomens analysiert werden und durch das Einbringen von *attP sites* nützliche Werkzeuge für weitere Untersuchungen geschaffen werden.

Zur Herstellung endogener Deletionen wurde die von Huang et al. entwickelte Methode des ‚*genomic engineering*‘ angewandt (Huang et al., 2009; Huang et al., 2008). Die Methode kombiniert das Ersetzen oder Deletieren genomischer Zielsequenzen und die ϕ C31-Integration. Zuerst wird durch homologe Rekombination eine *knock-out* Linie erzeugt. Dafür wird ein mobilisierbarer extrachromosomaler Donor benötigt. Dieser entstammt einer transgenen Fliegenlinie (Donorstamm), die das durch P-Elementinsertion ins Genom gelangte Deletionskonstrukt trägt. Aus dem Deletionskonstrukt wird durch hitzeinduzierte Flippase (FLP)-Aktivität die Donorkassette mobilisiert. Dabei erkennt die Flippase die *FRT sites*, die die äußerste Grenze der Donorkassette bilden und formt daraus eine ringförmige extrachromosomale DNA-Struktur. Es wurde gezeigt, dass lineare DNA-Strukturen besser als ringförmige Strukturen rekombinieren (Orr-Weaver et al., 1981). Deshalb besitzt die Donorkassette direkt neben den *FRT sites* Erkennungssequenzen der *I-SceI* Endonuklease, wodurch die ringförmige extrachromosomale DNA linearisiert werden kann. Die Donorkassette trägt zur Zielregion proximal und distal liegende homologe Sequenzen (*ush* = „*upstream homology*“ und *dsh* = „*downstream homology*“) in denen die homologe Rekombination stattfinden soll. In der Donorkassette flankieren die *ush* und *dsh* eine *attP site* und ein *loxP* flankiertes *white*-Markergen. Am 3'-Ende des transgenen Donors befindet sich das Zelltodgen *reaper* (*rpr*) mit vorhergeschalteter UAS-Sequenz, das zur späteren Selektion gegen nicht-gerichtete Rekombinationsereignisse dient.

Nach erfolgreicher homologer Rekombination wird die Zielsequenz durch das *white*-Markergen und die *attP site* ersetzt (Abbildung 3.19). UAS-*rpr* wird dabei nicht integriert. Das *white*-Gen kann durch Cre-Rekombinase aus der *knock-out* Linie entfernt werden, so dass nur noch die *attP* und die *loxP site* im Genom vorhanden sind. Nun können durch ϕ C31-Integration beispielsweise artfremde oder mutierte DNA-Sequenzen über ein *attB*-tragendes Plasmid in den deletierten Locus gebracht werden.

Die Durchführung des ‚*Targeting*‘-Experiments erfolgte in drei Schritten: Die ‚*Targeting*‘-Kreuzung, in der Jungfrauen der Donorstämme mit Männchen eines *hs-FLP*, *hs-I-SceI* tragenden Stammes (GOP 492 oder GOP 609) gekreuzt wurden. Der F1-Generation dieser Kreuzung wurde 24-48h nach Eiablage einen Hitzeschock unterzogen (75min, 38°C). Hierbei wurde die Donorkassette mobilisiert und homologe Rekombination konnte stattfinden. Aus dieser Kreuzung gingen nur Weibchen hervor, die

eine potentielle homologe Rekombination in ihren Keimzellen trugen. Diese Fliegen besaßen aufgrund ihrer Flippase-Aktivität „Mosaik-Augen“. In der ‚*Screening*‘-Kreuzung wurden die „Mosaik-Augen“ Tiere mit ubiquitären Gal4-Treiberlinien (GOP 610 oder GOP 613) gekreuzt, um gegen nicht-gezielte Rekombinationsereignisse oder nicht mobilisierte Donorkassetten zu selektieren. Rotäugige Tiere, die aus dieser Kreuzung hervorgingen, wurden in der ‚*Mapping*‘-Kreuzung auf eine X-chromosomale Insertion getestet. War dies der Fall, wurden je ein homozygoter und ein X-chromosomal balancierter Stamm hergestellt. Die detaillierte Durchführung der Kreuzungen ist im Kapitel 2.3.2 beschrieben.

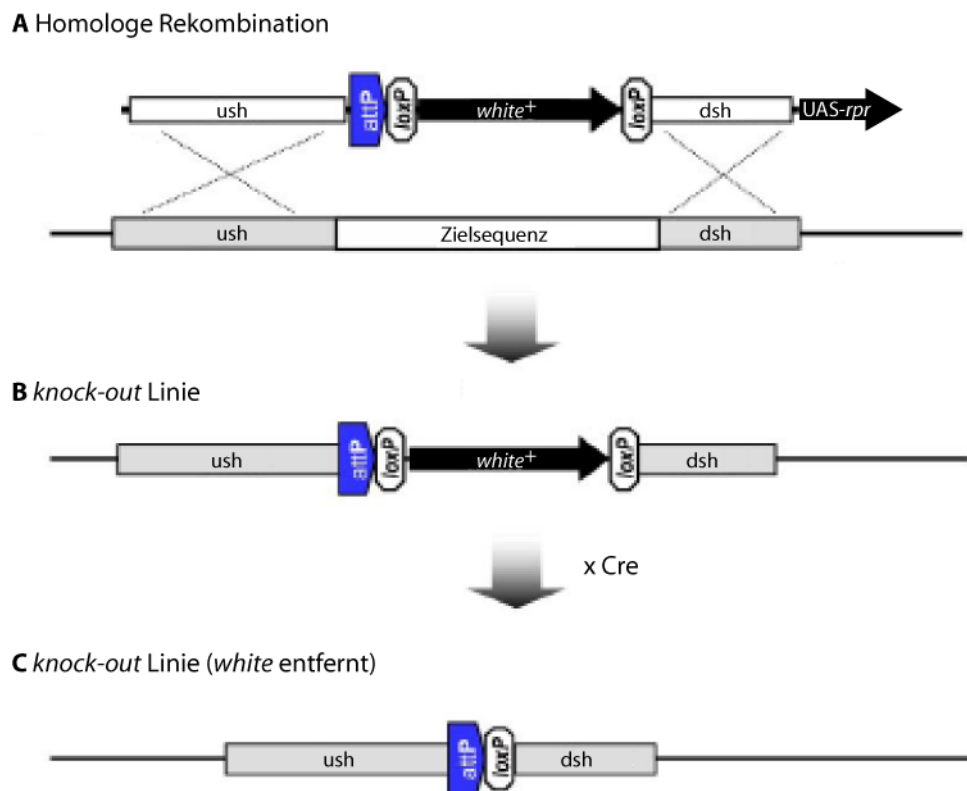


Abbildung 3.19: Herstellung endogener Deletionen durch homologe Rekombination (nach Huang et al., 2009). (A) Die homologe Rekombination soll zwischen *upstream* und *downstream* zur Zielsequenz liegenden Sequenzen (*ush* und *dsh*) des extrachromosomalen Donors und der genomischen Sequenz stattfinden. (B) Dabei wird die Zielsequenz durch eine *attP* Site und ein *loxP* flankiertes *white* Markergen ersetzt. (C) Durch Cre-Rekombinase Aktivität kann das *white* Gen entfernt werden, so dass sich nur noch eine *attP* und eine *loxP* Site in Genom anstelle der Zielsequenz befinden.

Es wurden Versuche zur Erlangung dreier unabhängiger Deletionen unternommen (Abbildung 3.20). Es gelang nicht, die ca. 21kb große Deletion Δ ombTU10-1 zu erzeugen, welche große Bereiche des Introns IV überdeckt hätte. In einem zweiten Versuch wurde der zu deletierende Bereich auf das Fragment ombTU10-2 mit einer Größe von 5,6kb beschränkt. Diese Deletion wurde Δ ombTU10-2 genannt und beinhaltet einen Teil des *omb*-Targitenehancers. In einer weiteren Deletion,

$\Delta ombTU12A$, wurden 1,6kb des Fragments $ombTU12A$ inklusive der konservierten Ci-Bindestellen Ci21 und Ci22 (siehe 3.1.4.1) eliminiert. Für eine spätere übergreifend Deletion wurde eine entgegengesetzte Orientierung der eingeführten *attP sites* der $ombTU10$ und $ombTU12A$ Deletionen gewählt.

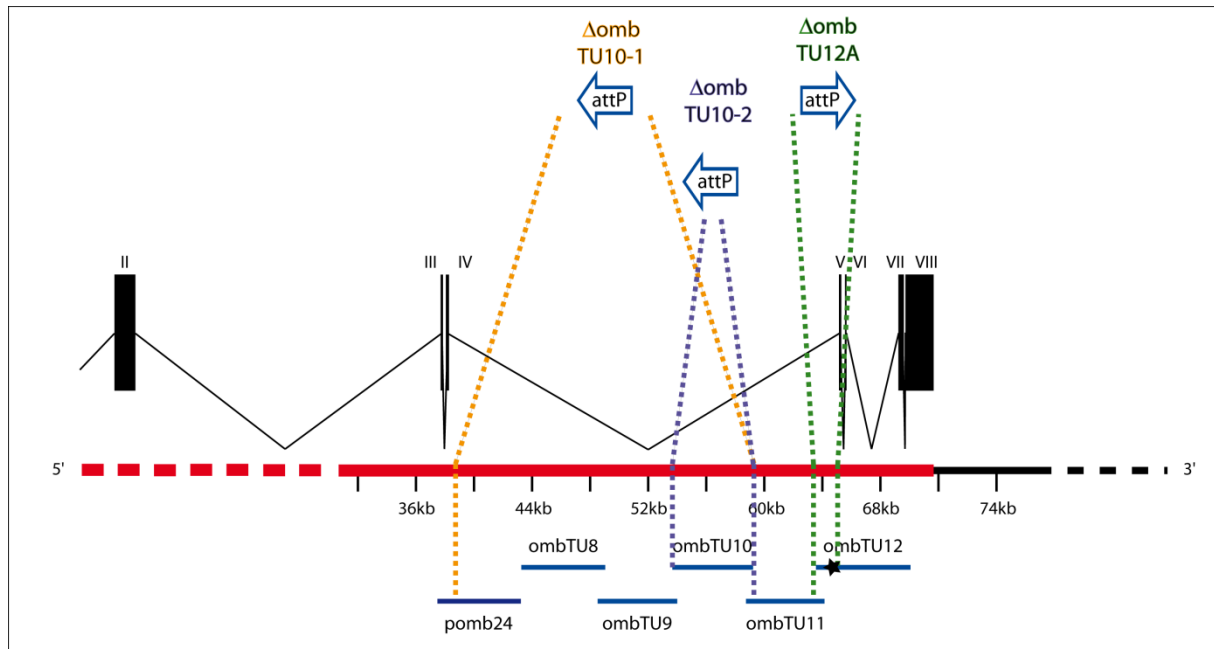


Abbildung 3.20: Endogene Deletionen des Tergiten-Enhancers. Drei unabhängige Deletionen in Intron IV der *ombTU* sollten erlangt werden: $\Delta ombTU10-1$ (21 089bp), $\Delta ombTU10-2$ (5630bp) und $\Delta ombTU12A$ (1605bp).

3.1.5.1 Herstellung der Deletionskonstrukte

Zur Klonierung des Deletionskonstrukts wurde eine dreistufige Strategie verfolgt. Zuerst wurden die *ush* und *dsh* Region der Zielsequenz mit *linker*-Primer amplifiziert. Die *linker*-Primer trugen die Erkennungssequenz, die zur späteren Klonierung in den Deletionsvektor pGX-attP (Huang et al., 2009) benötigt wurden. Als nächstes folgte eine Subklonierung der *ush* und *dsh* Amplifikate im pCR-XL-Topo Vektor (invitrogen). Die aus dem Topo-Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen isolierten *ush* und *dsh* Fragmente wurden nun sequentiell in die jeweilige multiple Klonierungsstelle (MCS) des pGX-attP ligiert. Die genaue Durchführung der Klonierungsschritte sind dem Kapitel 2.2.16 zu entnehmen.

In dieser Arbeit wurden vier Deletionskonstrukte hergestellt und sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Drei Konstrukte dienen für die oben beschriebenen Deletionen der Bereiche in Intron IV von *omb*. Ein weiteres sollte zur Erstellung der Letaldeletion von Exon V und VI von *omb* dienen. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Tabelle 3.1: In dieser Arbeit hergestellte Deletionskonstrukte

Δ Donor	5'MCS	PCR-Oligos	Enzyme	Größe	3'MCS	PCR-Oligos	Enzyme	Größe
ombTU10-1	dsh	1116/ 1117	KpnI/ NotI	3267bp	ush	1114/ 1115	AscI/ XhoI	3240bp
ombTU10-2	dsh	1116/ 1117	KpnI/ NotI	3267bp	ush	1256/ 1257	AscI/ SpeI	3326bp
ombTU12A	ush	1101/ 1092	NotI/ KpnI	3204bp	dsh	1093/ 1094	BglII/ AscI	3381bp
exonV+VI	ush	1347/ 1348	NotI/ KpnI	3365bp	dsh	1349/ 1350	BglII/ AscI	3059bp

Die Deletionskonstrukte tragen den Namen ihrer zu deletierenden Region. Der Tabelle ist zu entnehmen, in welche *multiple cloning site* (MCS) des pGX-attP die *ush* und *dsh* Regionen ligiert wurden, sowie die PCR-Oligos mit den zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen und die Größe der jeweiligen *ush* und *dsh* Regionen.

3.1.5.2 Deletion von ombTU10-1

Nach Mikroinjektion des Deletionskonstrukts ombTU10-1 wurden vier unabhängige transgene Donorlinien erhalten. Diese Donorlinien enthalten durch P-Element Insertion die zur homologen Rekombination benötigte Kasette mit den *ush* und *dsh* Sequenzen sowie das zur Selektion benötigte UAS-*reaper*. Zur Überprüfung der von der Position des Insertionsortes im Genom abhängigen Letalität des im Deletionsvektor enthaltenen UAS-*reaper* Gens wurden zunächst sogenannte Toxizitätstests durchgeführt (siehe auch 2.3.2.1). Die Toxizitätstests der Donorlinien wurden mit Männchen der ubiquitären Gal4-Linie GOP 610 angesetzt und der prozentuale Anteil der, nach UAS-*reaper* Selektion überlebende UAS-*reaper* positive Nachkommen bestimmt. Diese Tiere waren an ihrer roten Augenfarbe erkennbar. Dieser Vorabtest sollte die spätere Identifikation der gewünschten Deletion erleichtern. Der prozentuale Anteil der überlebenden Gal4/UAS-*rpr* Tiere ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Zu dem Zeitpunkt dieses Experimentes war die bei der Durchführung der Deletionsexperimente ombTU10-2 und ombTU12A verwendete Gal4-Linie GOP 613 nicht verfügbar. Für die alle vier Donorlinien wurden mehrere ‚*Targeting*‘-Kreuzungen angesetzt, die in Tabelle 3.3 zusammengefasst sind. Im ‚*Targeting*‘-Experiment ombTU10-1 konnte die gewünschte Deletion nicht erzielt werden. Jedoch ging aus ‚*Targeting*‘-Kreuzungen des Donorstammes 4-2B ein Ereignis hervor, das in adulten Tieren den für *w⁺*-Insertionen in *omb* typischen Streifenaugen-Phänotyp zeigte. Bei diesem Tier wurde eine Insertion der Donorkasette auf dem zweiten Chromosom lokalisiert (siehe 3.1.5.3).

Tabelle 3.2: Toxizitätstest der ombTU10-1-Donorlinien

Donorlinie (Chromosom)	%-Anteil w^+ Tiere nach x 610
1-1F (X)	0%
2-1B (II)	0%
3-1A (II)	12,8%
4-2B (II)	0%

Tabelle 3.3: Zusammenfassung des ,Targeting'-Experiments Δ ombTU10-1.

,Targeting'-Kreuzung [22°C]	P(donor)*/hs-flp, hs-I-SceI Jungfrauen (Mosaik-Augen)	,Screening'-Kreuzung		,Mapping'-Kreuzung		
		$white^-$	$white^+$	lebensfähig und fertil	nicht- gerichtet	X-chromosomal
1-1F x <i>hs-hid</i> GOP 492	1105	39796	31	21	12	8* 1 Y- chromosomal
2-1B x <i>hs-hid</i> GOP 492	121	4511	1	0	0	0
2-2B x <i>hs-hid</i> GOP 492	62	3568	2	2	2	0
3-1A x <i>hs-hid</i> GOP 492	257	7260	12	10	10	0
4-2B x <i>hs-hid</i> GOP 492	388	12063	9	8	7 1Streifen- Auge [†]	0
total	1933	67198	55	41	32	8

Spalte Eins führt die, für die verschiedenen Donorstämme angesetzten ,Targeting'-Kreuzungen auf. Diese wurden bei 22°C gehalten. „P(donor)*/hs-flp, hs-I-SceI Jungfrauen (Mosaik-Augen)“ gibt die Anzahl der erhaltenen und für die ,Screening'-Kreuzung eingesetzten Mosaik-Augen Jungfrauen wieder. In der Spalte ,Screening'-Kreuzung wird die Anzahl der weißäugigen ($white^-$) und der rotäugigen ($white^+$) Nachkommen der ,Screening'-Kreuzung aufgeführt. Die rotäugigen Nachkommen der ,Screening'-Kreuzung werden in der ,Mapping'-Kreuzung eingesetzt. In der Spalte ,Mapping'-Kreuzung werden die lebensfähigen und fertilen $white^+$ -Nachkommen der ,Screening'-Kreuzung aufgeführt und davon die Anzahl derer, die eine X-chromosomale oder eine nicht gerichtete Rekombination tragen.

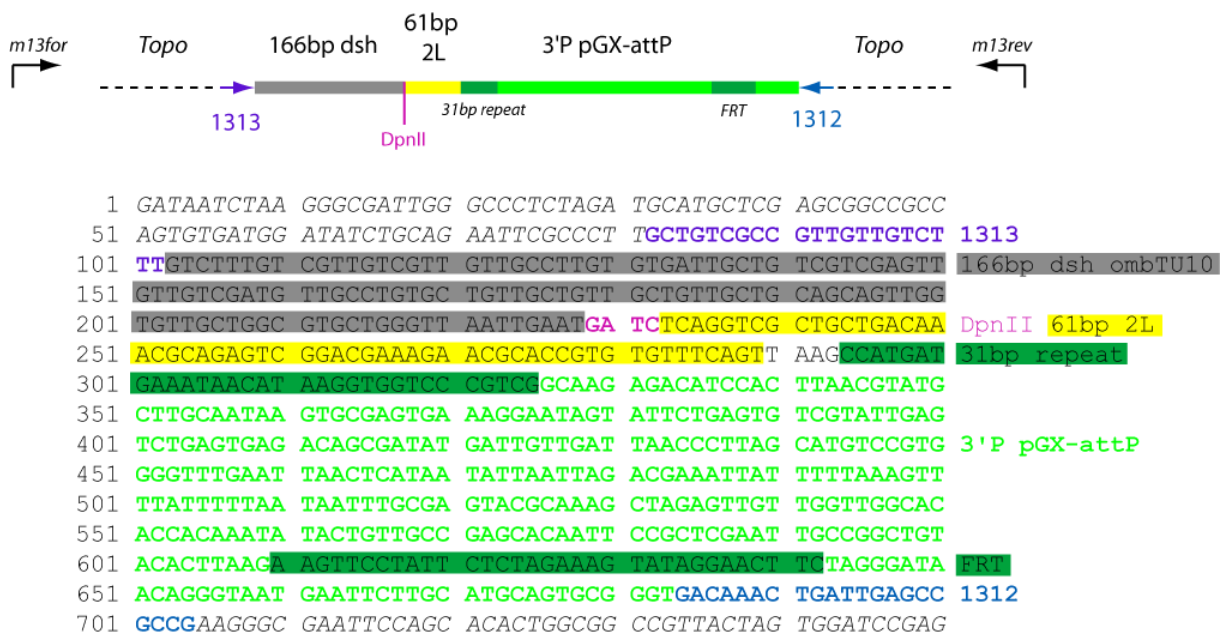
*Bei Linie 1-1F handelte es sich um eine X-chromosomale Donorlinie. Bei den X-chromosomalen Ereignissen nach der ,Mapping'-Kreuzung wurde angenommen, dass es sich um nicht-mobilisierte Donorkassetten handelt, da die Tiere nicht den für *omb* typischen Streifenaugen-Phänotyp zeigten.

†Bei der aus ,Targeting'-Kreuzung 4-2B hervorgegangenen Streifenaugenfliege handelt es sich um eine zweitchromosomale Insertion.

3.1.5.3 Molekulare Charakterisierung einer II.-chromosomalen Streifenaugen-Fliege

Bisher war der Streifenaugen-Phänotyp ein deutlicher Hinweis einer w^+ -markierten Insertion im *omb*-Locus. Die aus dem ‚Targeting‘-Experiment ombTU10-1 erhaltene Streifenaugen-Fliege zeigte einen ähnlichen Phänotyp, allerdings wurde die Insertion auf dem zweiten Chromosom kartiert. PCR-Experimente ergaben, dass die *ush* und *dsh* der Donorkassette in der Streifenaugen-Fliege enthalten waren. Der genaue Insertionsort der Donorkassette wurde über eine inverse PCR bestimmt. Hierfür wurden Primerpaare synthetisiert, die je in entgegengesetzter Orientierung an den nach außen zeigenden Enden der *ush* und der *dsh* binden. Die genomische DNA wurde mit Restriktionsenzymen, die nicht in der Sequenz zwischen den inversen Primern schneiden, verdaut. Im Falle der *ush* wurde NlaIII, im Falle der *dsh* DpnII verwendet. Die iPCR am *dsh* Ende der Donorkassette verlief erfolgreich. Da sie *dsh* Sequenz aus *omb* stammt und im Genom vorhanden ist, wurde neben der rekombinanten Bande der Insertionsstelle eine endogene Bande erwartet. Diese besteht aus Sequenzen die *up-* und *downstream* der Primerbindestellen bis zur nächsten NlaIII Schnittstelle reichen. Tatsächlich war auf dem Gel die erwartete Bande, mit einer Größe von 1000bp zu sehen. Die Sequenzierung der Bande bestätigte die endogene Identität der Sequenz. Zusätzlich war eine Bande von 650bp zu sehen, die die rekombinante Bande darstellte. Sequenzierung dieser Bande zeigte, dass die Donorkassette nicht durch ungerichtete homologe Rekombination in den *ush* und *dsh* Sequenzen, sondern durch ihre P-Element Enden auf das Chromosom 2L (7,307,103) inseriert war (Abbildung 3.21). Somit befindet sich die Donorkassette 58bp stromaufwärts der *wingless* (*wg*) Transkriptionseinheit. Durch das Scheitern der iPCR des *ush* Endes der Donorkassette wurden bisher keine weiteren Versuche unternommen das 5‘-Ende der Insertion zu ermitteln. Es scheint, dass w^+ -markierte Insertionen in *wg* einen ähnlichen polaren Augenphänotyp zeigen, wie Insertionen in *omb*.

1. Sequenz des iPCR-Amplifikats



2. Genomische Situation

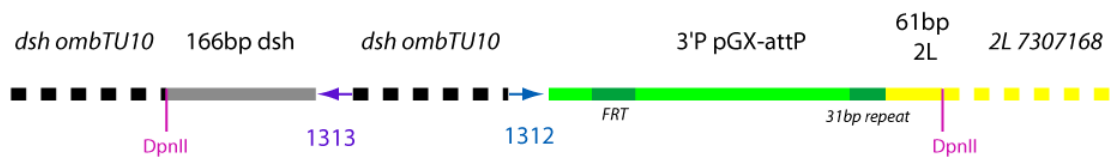


Abbildung 3.21: iPCR der zweitchromosomalen Streifenaugenfliege. Aus der iPCR vom *dsh*-Ende der ombTU10-1 Donorkassette mit dem Primerpaar 1312/1313 wurde eine 650bp langes Amplifikat erhalten. Dieses wurde in den pCR-XL-Topo Vektor kloniert und mit den Primern *m13forward* und *m13reverse* sequenziert. Die daraus erhaltene experimentelle Sequenz ist oben abgebildet. Die farbmarkierten Bereiche der Sequenz entsprechen dem jeweiligen farblich markierten Bereich der schematischen Abbildung der experimentellen Sequenz und der korrespondierenden genomischen Situation. Primer 1313 (lila) liest 166bp in die *dsh* Sequenz (grau) bis zur ersten DpnII Schnittstelle hinein. Primer 1312 (blau) bindet am äußersten Ende der *dsh* und liest in die Sequenz der FRT und des 3'P-Element Ende des Deletionsvektors pGX-attP (grün) hinein. Auf die P-Element Sequenz folgen 61bp der endogenen Sequenz des Chromosoms 2L (gelb).

3.1.5.4 Deletion von ombTU10-2

Nach Mikroinjektion des Donorkonstruktes ombTU10-2 wurden sieben unabhängige transgene Donorlinien erhalten. Mit fünf der Linien wurden Toxizitätstests mit den ubiquitären Gal4-Linien GOP 610 und GOP 613 angesetzt und mit dreien daraus das „Targeting“-Experiment durchgeführt. Aufgrund der schwachen Toxizität der Gal4-Linie GOP 613 (Tabelle 3.4) wurde hier in der „Screening“-Kreuzung nur die Gal4-Linie GOP 610 verwendet. Ein X-chromosomales Rekombinationsereignis wurde erhalten, das den *omb*-typischen Streifenaugen-Phänotyp zeigte (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.4: Toxizitätstest der Donorlinien ombTU10-2

Donorlinie (Chromosom)	%-Anteil w^+ Tiere nach x 610	%-Anteil w^+ Tiere nach x 613
2-1C (III)	0%	0%
2-2C (III)	0%	---
3-1C (III)	0%	31%
4-1B (II)	0%	---
4-2B (II)	0%	40%
5-1C (III)	27%	28%
7-1C (III)	0%	17%

Tabelle 3.5: Zusammenfassung des ,Targeting'-Experiments Δ ombTU10-2.

,Targeting'-Kreuzung [22°C]	P(donor)*/hs-flp, hs-I-SceI Jungfrauen (Mosaik-Augen)	,Screening'-Kreuzung		,Mapping'-Kreuzung		
		$white^-$	$white^+$	lebensfähig und fertil	nicht-gerichtet	X-chromosomal
3-1C, Sb x 492	106	1835	3	2	2	1
4-1B, CyO x 609	237	4367	1	1	1	0
4-2B, CyO x 609	345	2136	0	0	0	0
7-1C, Sb x 492	156	2222	2	2	2	0
Total	844	10560	6	5	5	1

Spalte Eins führt die, für die verschiedenen Donorstämme angesetzten ,Targeting'-Kreuzungen auf. „P(donor)*/hs-flp, hs-I-SceI Jungfrauen (Mosaik-Augen)“ gibt die Anzahl der erhaltenen und für die ,Screening'-Kreuzung eingesetzten Mosaik-Augen Jungfrauen wieder. Für die ,Screening'-Kreuzung wurden hier ausschließlich Männchen der Gal4 Linie GOP 610 verwendet. In der Spalte ,Screening'-Kreuzung wird die Anzahl der weißäugigen ($white^-$) und der rotäugigen ($white^+$) Nachkommen der ,Screening'-Kreuzung aufgeführt. Die rotäugigen Nachkommen der ,Screening'-Kreuzung werden in der ,Mapping'-Kreuzung eingesetzt. In der Spalte ,Mapping'-Kreuzung werden die lebensfähigen und fertilen $white^+$ -Nachkommen der ,Screening'-Kreuzung aufgeführt und davon die Anzahl derer, die eine X-chromosomale oder eine nicht gerichtete Rekombination tragen.

3.1.5.5 Molekulare Charakterisierung der Deletion ombTU10-2

Nach Etablierung eines homozygoten Stammes des X-chromosomalen Rekombinationsereignisses Δ ombTU10-2 wurden zur Verifikation der Deletion von ombTU10-2 PCR-Experimente durchgeführt. Es wurde ein Primerpaar synthetisiert, das über den deletierten Bereich amplifiziert (Abbildung 3.22, Oligos 1400/1401). Im Falle einer nicht erfolgten Deletion wurde ein PCR-Produkt der Größe von 7kb erwartet. Wurde der deletierte Bereich durch die Donorkassette ausgetauscht, erwartete man ein

4,5kb langes Amplifikat. Die Amplifikation an wildtypischer DNA, sowie DNA des Deletionsstammes Δ ombTU10-2 ergaben die erwarteten Fragmente, wie auf den Gelbildern in Abbildung 3.22 zusehen war. Um festzustellen, ob die flankierenden Bereiche der Zielregion während der Rekombination erhalten wurden, wurden die *ush* und die *dsh* Regionen mit ihren entsprechenden Primerpaaren (1246/1257; 1116/1117) amplifiziert und zeigten auf dem Gelbild die erwartete Größe (*ush* ombTU10-2: 3326 bp; *dsh* ombTU10-2: 3267bp). Die gewünschte Deletion wurde erzielt.

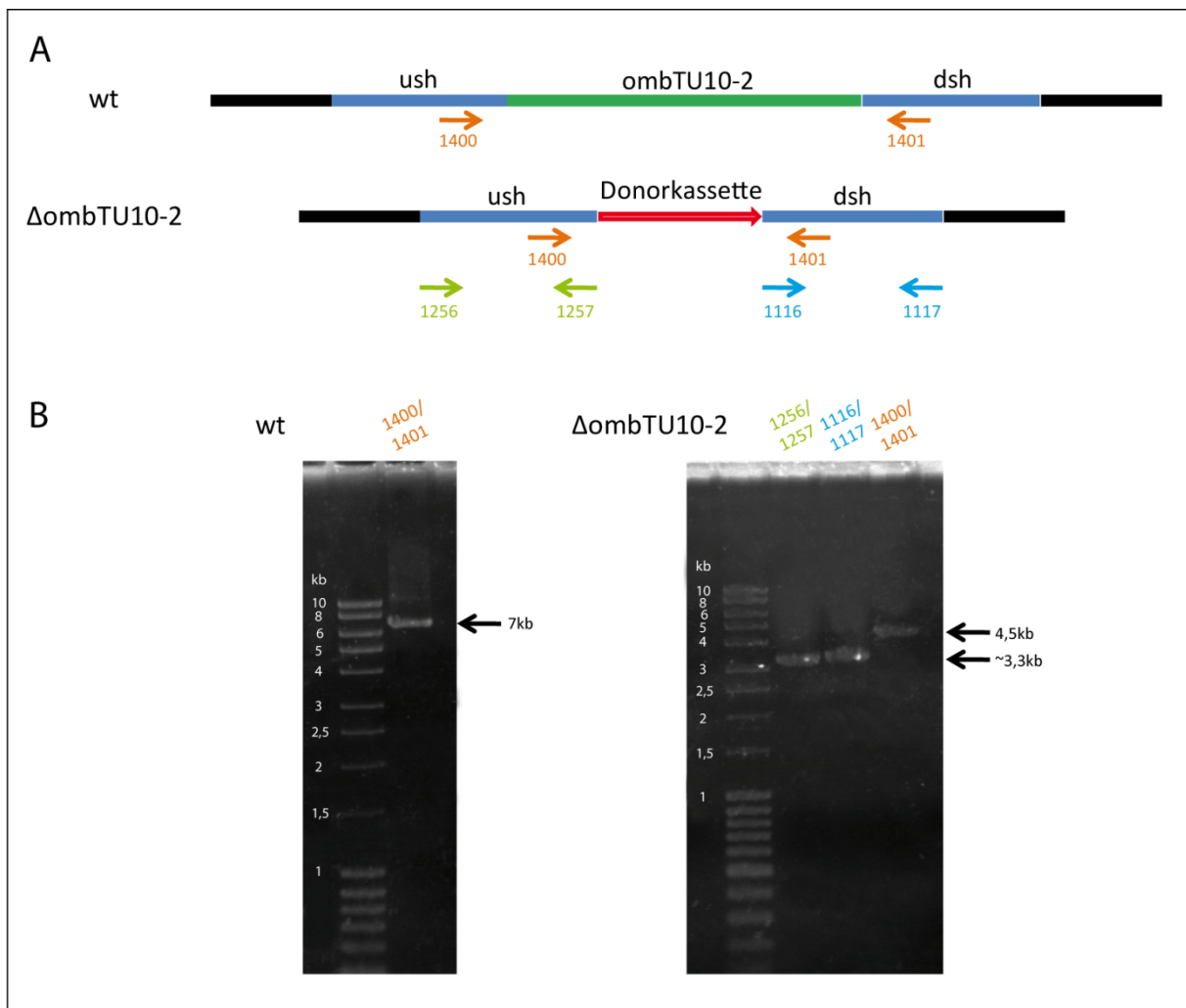


Abbildung 3.22: PCR-Experimente zur Verifikation der Deletion ombTU10-2. In **(A)** sind die durchgeführten PCR-Experimente schematisch dargestellt, in **(B)** die Ergebnisse der PCR nach Gelelektrophorese abgebildet. Zur Verifikation der Deletion wurde das Primerpaar 1400/1401 gewählt, was in den flankierenden *ush* und *dsh* Regionen von ombTU10-2 bindet und über den zu deletierenden Bereich amplifiziert. An wildtypischer DNA ergibt dies ein Amplifikat einer Größe von 7kb (siehe wt-Gelbild), an DNA des Deletionsstammes Δ ombTU10-2 ein 4,5 kb langes Amplifikat (siehe Gelbild Δ ombTU10-2). Amplifikation der *ush* und *dsh* Regionen an Δ ombTU10-2-DNA zeigte, dass diese komplett im Deletionsstamm enthalten waren (*ush*: 3326bp; *dsh*: 3267kb).

3.1.5.6 Deletion von ombTU12A

Nach Mikroinjektion der Deletionskonstrukts wurden 10 unabhängige transgene Linien erhalten. Mit fünf der Donorstämme wurden Toxizitätstests mit den ubiquitären Gal4-Linien GOP 610 und GOP 613 durchgeführt und der prozentuale Anteil der, nach UAS-reaper Selektion überlebende UAS-reaper positive Nachkommen bestimmt. Die Ergebnisse des Toxizitätstests sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tabelle 3.6: Toxizitätstest der ombTU12A-Donorlinien

Donorlinie (Chromosom)	%-Anteil w^+ Tiere nach x 610	%-Anteil w^+ Tiere nach x 613
A (GOP 642) (III)	0%	1,8%
B (GOP 630) (II)	0%	2%
C (GOP 640) (II)	0%	56%
D (GOP 675) (II)	0%	0%
E (GOP 673) (II)	6,25%	31,5%

Für die Donorlinien A, B und C wurden ‚Targeting‘- und darauf folgende ‚Screening‘-Kreuzungen angesetzt. Trotz der stärkeren Toxizität der Gal4-Linie 610 wurden ‚Screening‘-Kreuzungen mit beiden Gal4-Linien angesetzt. In Tabelle 3.7 ist eine Zusammenfassung des ‚Targeting‘-Experiments zur Herstellung der Deletion ombTU12A gegeben. Aus jeder angesetzten ‚Targeting‘-Kreuzung resultierte ein X-chromosomales Rekombinationsereignis. Diese Fliegen zeigten den für w^+ -markierte Insertionen in *omb* typischen Streifenaugen-Phänotyp. Alle fünf X-chromosomale Rekombinationsereignisse stammen aus ‚Screening‘-Kreuzungen mit dem Gal4 Stamm GOP 613.

Tabelle 3.7: Zusammenfassung des ,Targeting'-Experiments Δ ombTU12A.

,Targeting'-Kreuzung [22°C]	P(donor)*/hs-flp, hs-I-SceI Jungfrauen (Mosaik-Augen)	,Screening'-Kreuzung		,Mapping'-Kreuzung		
		<i>white</i> ⁻	<i>white</i> ⁺ (610/613)	lebensfähig und fertil	nicht- gerichtet	X- chromosomal
A1 642 x <i>hs-hid</i> (GOP 492) 30♀ x 30♂	289	10546	8 (1/7)	2	1	1 [†]
B1 630 x <i>hs-hid</i> (GOP 609) 32♀ x 20♂	192	5451	3 (0/3)	2	1	1 [†]
B2 630 x <i>hs-hid</i> (GOP 609) 32♀ x 25♂	220	6195	8 (2/6)	3	2	1 [†]
C1 640 x <i>hs-hid</i> (GOP 609) 23♀ x 30♂	268	7693	37 (4/33)	9	6	3*
C2 640 x <i>hs-hid</i> (GOP 609) 23♀ x 25♂	282	6260	22 (9/13)	9	8	1
Total	1251	36145	78 (16/62)	25	18	5

Spalte Eins führt die, für die verschiedenen Donorstämme angesetzten ,Targeting'-Kreuzungen auf. „P(donor)*/hs-flp, hs-I-SceI Jungfrauen (Mosaik-Augen)“ gibt die Anzahl der erhaltenen und für die ,Screening'-Kreuzung eingesetzten Mosaik-Augen Jungfrauen wieder. In der Spalte ,Screening'-Kreuzung wird die Anzahl der weißäugigen (*white*⁻) und der rotäugigen (*white*⁺) Nachkommen der ,Screening'-Kreuzung aufgeführt. Die Anzahl der rotäugigen Nachkommen der ,Screening'-Kreuzung aus Kreuzungen mit den Gal4-Linien 610 und 613 ist in Klammern angegeben. Die rotäugigen Nachkommen der ,Screening'-Kreuzung werden in der ,Mapping'-Kreuzung eingesetzt. In der Spalte ,Mapping'-Kreuzung werden die lebensfähigen und fertilen *white*⁺-Nachkommen der ,Screening'-Kreuzung aufgeführt und die Anzahl derer, die eine X-chromosomale oder eine nicht gerichtete Rekombination tragen.

*hierbei handelt es sich um ein Ereignis und wird in ,Total' als eine Fliege behandelt

[†] Stämme sind homozygot letal

3.1.5.7 Molekulare Charakterisierung der Deletion ombTU12A

Die X-chromosomalen Rekombinationsstämme wurden nach ihrer entsprechenden ,Targeting'-Kreuzung A1, B1, B2, C1 und C2 benannt. Aus der Kreuzung C1 gingen 3 X-chromosomale Rekombinationen hervor, die wahrscheinlich aus einem Ereignis stammen (siehe Tabelle 3.7), und wurden mit C1-1, C1-2 und C1-3 benannt. Bei der Homozygotisierung der Stämme zeigte sich, dass die Stämme A1, B1 und B2 homozygot letal und die Stämme C1-1 bis C1-3 und C2 homozygot lebensfähig waren. Kreuzungen der homozygot letalen Deletionsstämme mit einem letalen *omb*-Stamm, der eine *omb*-Duplikation auf dem 2. Chromosom trägt (GOP 451A), bestätigten, dass die

Letaldeletion in *omb* liegt (Abbildung 3.23). PCR-Experimente an den homozygot letalen sowie lebensfähigen Stämmen sollten weitere Aufschlüsse über die Ursache der Letalität geben. Die verwendeten Primer-Kombinationen und Positionen sind in Abbildung 3.24 abgebildet. Als Negativkontrolle für die erwünschte Deletion wurde ein Primerpaar, das innerhalb des deletierten Fragments (1172/1173) bindet gewählt. Bei nicht erfolgter Deletion von *ombTU12A* bzw. im Wildtyp entstand ein Amplifikat der Größe 1,3kb. Bei Amplifikation dieses Fragments an genomischer DNA der Deletionsstämmen, homozygot letal sowie lebensfähig, war kein Amplifikat zu sehen (in Abbildung 3.24 nicht gezeigt). Das Primerpaar 1184/1185 bindet zu beiden Seiten flankierend der deletierten Sequenz. Die Größe des hier entstehenden Amplifikats zeigt, ob die Zielregion *ombTU12A* durch die Donorkassette ersetzt wurde und weist in diesem Fall eine Größe von 3,5kb, anstatt der für den Wildtyp erwarteten 1,9kb auf (Abbildung 3.24 Gelbild C). Der homozygot letale Stamm B2 wies auf dem Gel beide Banden auf, da es sich um einen balancierten Stamm handelte, der die wildtypische als auch die rekombinante Sequenz trug. Amplifikation mit Primerpaar 1184/1185 an DNA homozygot lebensfähiger Stämme (Abbildung 3.24 Gelbild C, C1-1 und C1-2) wiesen die Bande bei 3,5kb auf. Bei Stamm C1-1 war eine schwache Bande bei 1,9kb zu sehen, die auf eine Kontamination der DNA mit balancierten Fliegen zurückzuführen war. Desweiteren wurden Primerpaare gewählt, die 5' der gewünschten Deletion und im *white*-Markergen (1168/1169), sowie 3' der gewünschten Deletion und im *white*-Markergen (1170/1171) binden. Hier sind die erwarteten Größen 4,4kb und 3,9kb. In Abbildung 3.24 Gelbild B ist dieses Experiment abgebildet. Homozygot letale, sowie lebensfähige Stämme zeigten die gewünschten Banden. Mit Primerpaar 1168/1169 war eine unspezifische Bande bei 1,7kb zu sehen, die durch Fehlbindung der Primer entstand. Die PCR-Experimente bestätigten, dass in beiden Fällen eine Deletion von *ombTU12A* vorlag.

Die Sequenzierung des Amplifikats 1170/1171, welches die Region stromabwärts der Deletion mit den Exons V und VI enthielt, zeigte, dass in den homozygot letalen Stämmen zwei Punktmutationen in Exon V enthalten waren. Exon V kodiert für einen Teil der T-Domäne des *Omb*-Proteins. Die Punktmutation in den letalen Stämmen A1, B1 und B2 führte zu einem Aminosäureaustausch in der T-Domäne. An Position 460 des *Omb* ORF fand ein Austausch von Phenylalanin durch Serin statt und an Position 492 Tyrosin durch Cystein. An Position 460 wurde also eine unpolare durch eine polare Aminosäure ersetzt. Es ist wahrscheinlich, dass diese Mutation letal ist, da alle Aminosäuren in diesem Bereich unpolar sind. Tyrosin, an Position 492, ist in allen T-box Proteinen konserviert (Ruvinsky et al., 2000). Sequenzierung der entsprechenden Sequenz des Deletionskonstrukts zeigte, dass die Punktmutation bereits in diesem enthalten war. Die homozygot lebensfähigen Stämme C1 und C2 enthielten die gewünschte Deletion und die wildtypische Sequenz von Exon V. Die beiden Mutationsereignisse waren offensichtlich im Verlauf der Rekombinationsereignisse repariert worden. (Sequenzen siehe 7.3)

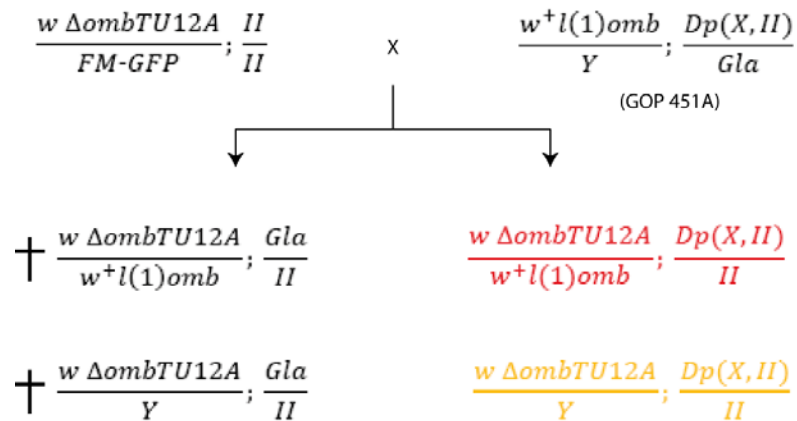


Abbildung 3.23: Kartierung der Letaldeletion in homozygot letalen $\Delta ombTU12A$ Tieren. Kreuzung der balancierten homozygot letalen $\Delta ombTU12A$ Jungfrauen mit dem letalen *omb*-Stamm GOP 451A. Es wurde gezeigt, dass die Letaldeletion in *omb* lag, da in der F1-Generation rotäugige Weibchen (rot) und Streifenaugen Männchen (orange) vorkamen, die keine Merkmale der Balancerchromosomen trugen. Die Deletion in $\Delta ombTU12A$ und in $l(1)omb$ wurden durch die *omb*-Duplikation auf dem zweiten Chromosom ($Dp(X, II)$) gerettet. Entsprechende Tiere, die statt des Duplikationschromosoms das Balancerchromosom trugen (*Gla*) waren letal.

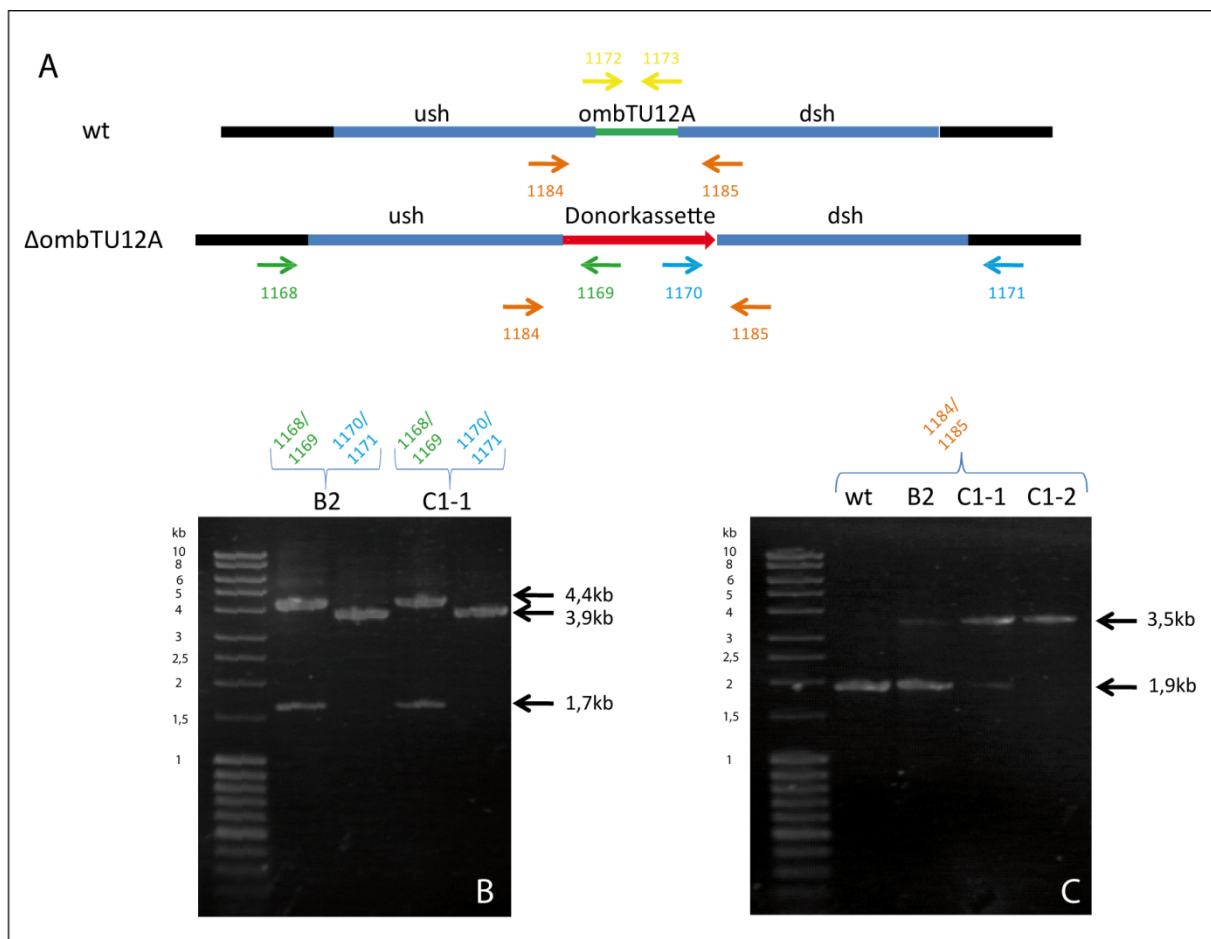


Abbildung 3.24: PCR-Experimente zur Verifikation der Deletion ombTU12A. Im Schema (A) sind die verschiedenen Primerpaare und ihre ungefähre Bindestelle an wildtypischer DNA oder Δ ombTU12A-DNA abgebildet. Die PCR-Experimente wurden an genomischer DNA aller homozygot letalen (A1, B1, B2), sowie aller homozygot lebensfähigen (C1-1, C1-2, C1-3, C2) Δ ombTU12A-Stämmen durchgeführt. Hier sind die Ergebnisse der Stämme B2, C1-1 und C1-2 gezeigt. Primerpaar 1172/1173 bindet innerhalb von ombTU12A. Es dient als Negativkontrolle und bildet ein Amplifikat von 1,3kb. Dieses Primerpaar erzeugte nur an wildtypischer DNA ein Amplifikat (hier nicht abgebildet). Primerpaar 1168/1169 und 1170/1171 binden je außerhalb der *ush* bzw. *dsh* und innerhalb der Donorkassette und ergeben an Δ ombTU12A-DNA Fragmente der Größe 4,4kb und 3,9kb. Dies wurde für homozygot letale, sowie homozygot lebensfähige Stämme gezeigt (Gelbild B). Bei der Amplifikation mit Primerpaar 1168/1169 entstand eine unspezifische Bande bei 1,7kb. Primerpaar 1184/1185 bindet an beiden Seiten flankierend der zu deletierenden Sequenz. An wildtypischer DNA wurde ein Amplifikat von 1,9kb, an Δ ombTU12A-DNA ein Amplifikat von 3,5kb erwartet (Gelbild C). Bei dem homozygot letalen Stamme B2 handelt es sich um einen balancierten Stamm, deshalb waren auf dem Gel beide Banden zu sehen. Der homozygot lebensfähige Stamm C1-1 wies die Bande bei 3,5kb, sowie eine schwache Bande bei 1,9kb auf. Diese ist auf eine Kontamination der genomischen DNA mit balancierten Fliegen zurückzuführen.

3.1.5.8 Charakterisierung der $\Delta ombTU10-2$ und der $\Delta ombTU12A$ Tiere

Beide X-chromosomale Rekombinationsereignisse $\Delta ombTU10-2$ und $\Delta ombTU12A$ zeigten den für w^+ -Insertionen in *omb* typischen Streifenaugenphänotyp. Dieser polare Augenphänotyp äußert sich durch einen hell pigmentierten Keil ungefähr an der dorso-ventralen Grenze des adulten Auges, der von anterior nach posterior schmaler wird. In $\Delta ombTU12A$ Tieren war die Abgrenzung des hellen Keils deutlicher als in $\Delta ombTU10-2$ Tieren. Diese zeigten deutlich dunkler pigmentierte Augen (Abbildung 3.25).

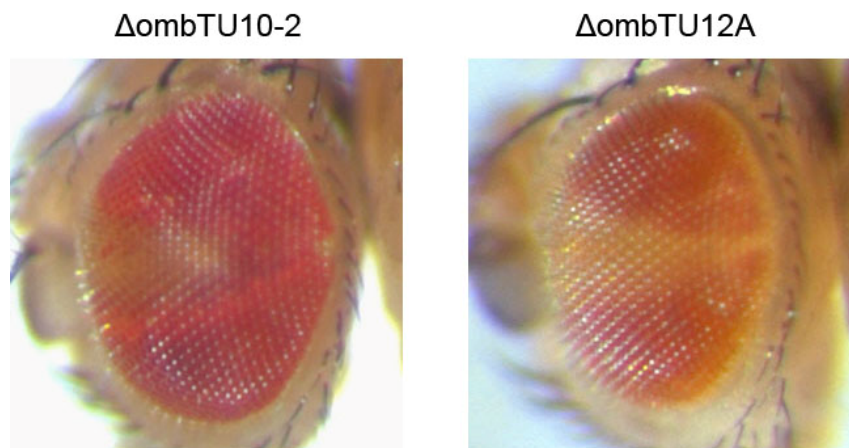


Abbildung 3.25: Streifenaugenphänotyp der $\Delta ombTU10-2$ und $\Delta ombTU12A$ Tiere. Dorsal ist oben, anterior links. Hier sind jeweils Augen von hemizygoten Männchen zu sehen. Innerhalb der Linien war kein Geschlechtsdimorphismus zu sehen.

Bei der Betrachtung der Pigmentierung der adulten Abdomen fiel auf, dass bei $\Delta ombTU10-2$ Weibchen eine hohe Variabilität in der Pigmentierung des Segments A6 zu sehen war. Bei etwa einem Drittel der betrachteten Tiere fehlte der breite Pigmentstreifen des A6 Segments (Abbildung 3.26 A und B), bzw. war stark reduziert (Abbildung 3.26 C und D). Auch der Pigmentstreifen des A5 Segments schien in einem Teil der Tiere schmaler (Abbildung 3.26 A, B und D). Die restlichen Tiere zeigten einen breiten Pigmentstreifen im Segment A6 wie er im Wildtyp vorkommt (Abbildung 3.26 E – F). Diese hohe Variabilität in der Pigmentierung der posterioren Segmente weiblicher Tiere war im Wildtyp nicht zu sehen. Bei den Männchen der $\Delta ombTU10-2$ Tiere war keine Variabilität in der Pigmentierung zu sehen.

Bei den $\Delta ombTU12A$ Tieren war weder bei weiblichen noch bei männlichen Tieren eine Abweichung in der Pigmentierung im Vergleich zum Wildtyp zu sehen (Abbildung 3.27).

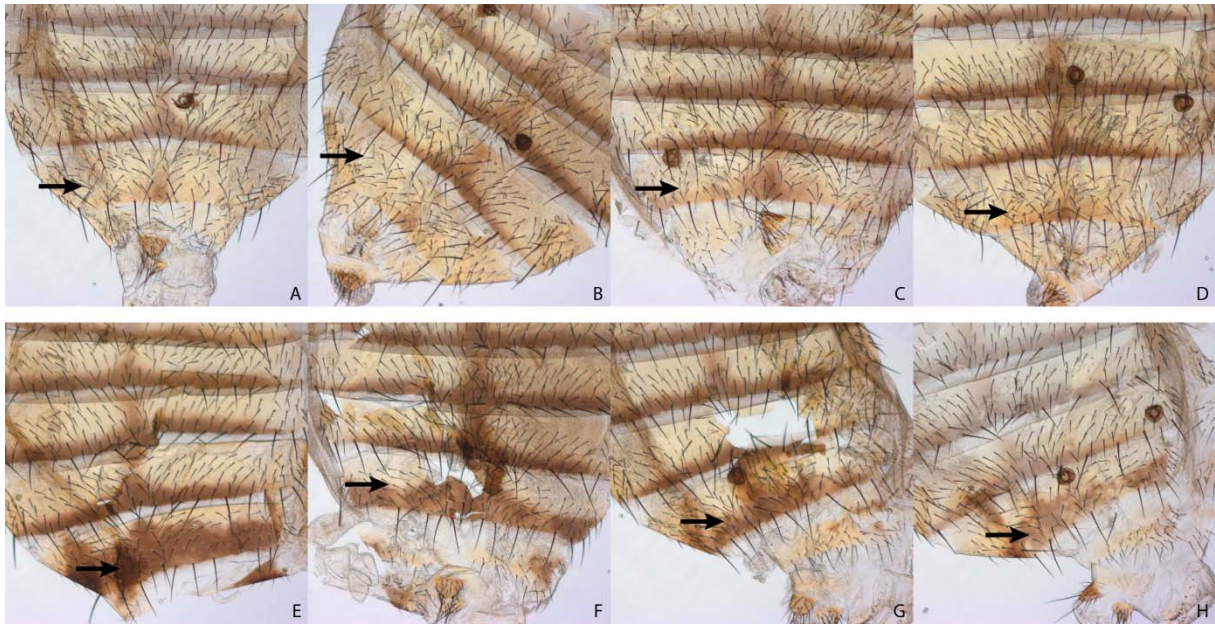


Abbildung 3.26: Pigmentierung des adulten Abdomens von Δ ombTU10-2 Weibchen. Fotografien von Abdomen von Weibchen des Δ ombTU10-2 Stammes sind abgebildet. Pfeile in A – H zeigen auf das A6 Segment. In A – D sind Abdomen abgebildet, bei denen der Pigmentstreifen in A6 abwesend (A und B) oder stark reduziert ist (C und D). E – H zeigt Abdomen, die eine wildtypische Pigmentierung von A6 aufweisen. Verschiedene Intensitäten der Pigmentierung (H) waren auch im Wildtyp zu sehen.

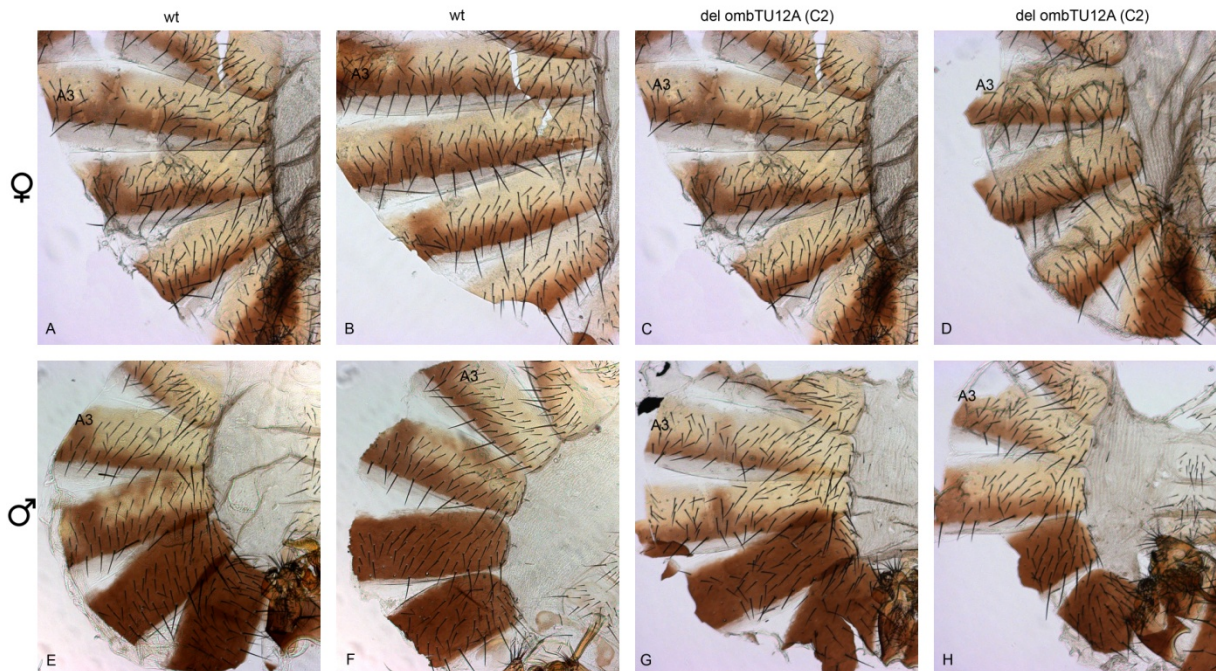


Abbildung 3.27: Pigmentierung des adulten Abdomens von Δ ombTU12A Tieren im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind Fotografien der wildtypische Abdomen von Weibchen (A und B) und Männchen (E und F) und Abdomen des Δ ombTU12A Deletionsstammes C2, Weibchen (C – D) und Männchen (G – H). Es sind jeweils die Segmente A2 – A6 zu sehen, das A3 Segment ist in jeder Abbildung markiert. Die Abdomen wurden an der dorsalen Mittellinie geteilt und die Segmente fächerförmig ausgebreitet.

3.1.6 Expressionstreue verschiedener Enhancer-Trap Insertionen in der Abdominalentwicklung

In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe von *omb* Enhancer-Trap Stämmen hergestellt, die als genetische Werkzeuge eingesetzt werden können (Beinert et al., 2004; Calleja et al., 1996; Gerlitz et al., 2002; Peter et al., 2002; Ryder et al., 2007; Sun et al., 1995; Tang and Sun, 2002; Thibault et al., 2004). Enhancer-Trap Stämme können die endogene Genexpression durch die Expression eines Reportergens wiedergeben (O'Kane and Gehring, 1987). In Abbildung 3.28 sind die Insertionsorte der verschiedenen Enhancer-Trap Insertionen im *omb*-Locus zu sehen. In dieser Arbeit wurde die Expressionstreue einiger dieser Stämme in der Entwicklung des adulten Abdomens untersucht. Die Expressionstreue in den Imaginalscheiben wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit in der Arbeitsgruppe betrachtet (Abassi, 2007). In Tabelle 3.8 ist eine Übersicht über die hier gefärbten Stämme aufgeführt. Bei den untersuchten Stämmen handelt es sich zum einen um PlacW und PGalW Insertionen, die *lacZ* als Reportergen und *white* als Markergen tragen (Bier et al., 1989). Weitere betrachtete Stämme tragen PGawB Insertionen, bei denen der aus der Hefe stammende Transkriptionsfaktor Gal4 als Reportergen dient (Brand and Perrimon, 1993). Von den 13 untersuchten Stämmen zeigten nur drei der vier pGawB-Stämme ein *omb*-ähnliches Streifenmuster während der Entwicklung des adulten Abdomens (Abbildung 3.29). Dabei war dies sehr variabel. Der Stamm ombP4 zeigte als einziger PGawB-Stamm keine Reportergenexpression im pupalen Abdomen.

Die Insertion ombP3, bei der es sich um eine PGawB-Insertion etwa 1,5kb vor dem Transkriptionsstartpunkt von *omb* handelt, zeigte das diskreteste Expressionsmuster. Mit einem Alter von 45h APF war ein schmaler Streifen anterior der A/P-Grenze zu sehen (Abbildung 3.29 B). Dieser wurde bis zu einem Alter von 60h APF etwas breiter, ragte jedoch nicht weit ins anteriore Kompartiment hinein (Abbildung 3.29 C). In Abbildung 3.29 C sind blau gefärbte Zellen des sich entwickelnden adulten Herzes zu sehen (Pfeil). Bei dem Expressionsmuster der Insertion ombP6 handelt es sich um das von Kopp und Duncan (2002) publizierte *omb*-Expressionsmuster, das mit der endogenen Expression von *omb* gleichgesetzt wurde. ombP6 stellt eine kurz vor Exon II gelegene PGawB-Insertion dar. In jüngeren Stadien zwischen 24 und 30h APF trieb ombP6 in den Histoblastennestern und in LECs entlang der A/P-Grenze mit einem beidseitigen Gradienten lacZ-Expression (Abbildung 3.29 D). Mit einem Alter von 45h APF entsprach die lacZ-Expression der endogenen *omb* Expression (vergleiche Abbildung 3.3), bei der *omb* entlang der A/P-Grenze mit einem Gradienten in das anteriore Kompartiment hinein exprimiert wurde (Abbildung 3.29 E). Ältere Stadien um 60h APF zeigten ebenfalls eine starke Expression entlang der A/P-Grenze (Abbildung 3.29 F) mit einem weit ins anteriore abfallenden Gradienten. Die Insertion ombP7 befindet sich am selben Insertionsort wie ombP6 und ist ebenfalls eine PGawB-Insertion. Dennoch trieb ombP7 eine schwächere lacZ-Expression als bei ombP6 gesehen wurde. 24-30h APF war eine Färbung in den

Histoblastennestern entlang der A/P-Grenze und auch in den LECs zu sehen (Abbildung 3.29 G). Mit 40h APF zeigte ombP7 einen Expressionsstreifen auf der A/P-Grenze, der jedoch schmaler war als bei ombP6 und keinen deutlichen beidseitigen Gradienten zeigte (Abbildung 3.29 E). Auch bei einem Alter von 60h APF ragte die Expressionsdomäne von ombP7 nicht so weit ins anteriore hinein wie bei ombP6 (Abbildung 3.29 F).

Um eine Erklärung für die fehlende Expression von ombP4 zu finden, wurde die 5' Region der PGawB Insertion über die Gal4 Promotor Region bis in die Gal4-kodierende Region von ombP4 und ombP3 sequenziert. Defekte in dieser Region der ombP4 Insertion könnten für die fehlende Expression verantwortlich sein. Jedoch entsprach diese Sequenz der ombP4 Insertion genau der in der ombP3 Insertion. Ein Defekt der Promotor proximalen Kontrollregion in ombP4 kann als Ursache für die fehlende Expression ausgeschlossen werden.

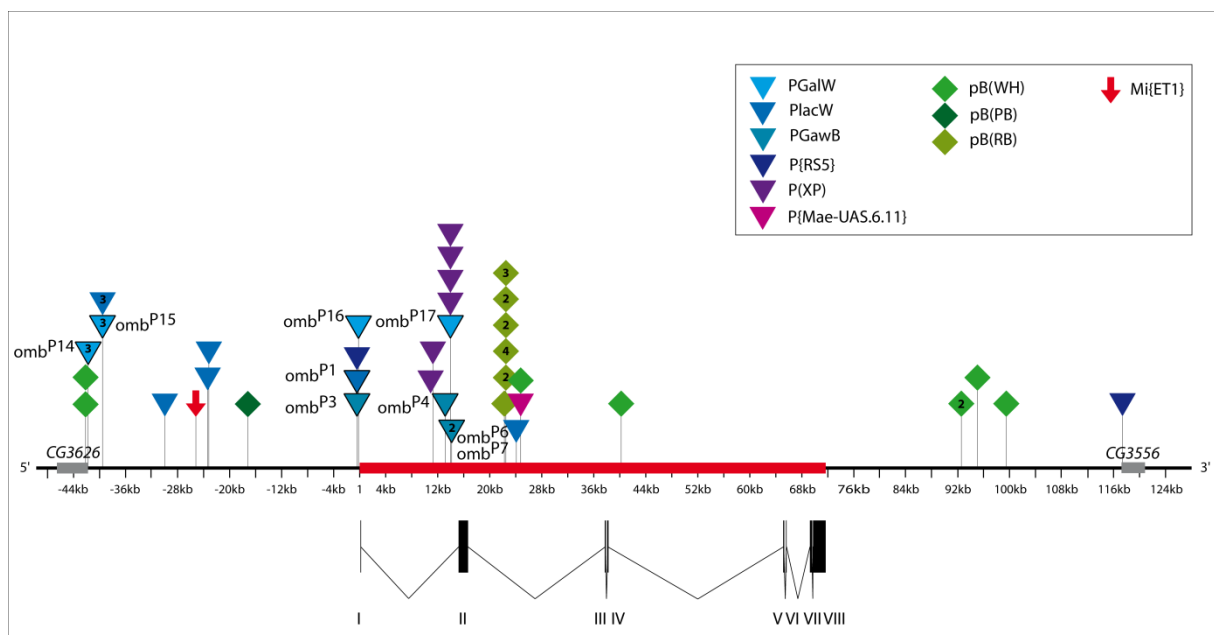


Abbildung 3.28: Enhancer-Trap Insertionen im *omb*-Locus. Zu sehen ist der *omb*-Locus mit seinen *upstream* und *downstream* regulatorischen Sequenzen und die proximal und distal gelegene Gene *CG3626* und *CG3556*. Die Exon/Intron-Struktur von *omb* ist unterhalb der Skala abgebildet. P-Elementinsertionen sind in der Grafik als Dreiecke dargestellt. Verschiedenfarbige Dreiecke symbolisieren unterschiedliche P-Element Typen, verschiedenfarbige Rauten stellen unterschiedliche *piggyBac* Insertionen dar. Die *Minos*-Insertion ist als Pfeil dargestellt. Befinden sich an einem Insertionsort mehrere unabhängige Insertionen, wird dieses durch eine Zahl in dem jeweiligen Element symbolisiert. Die Expressionstreue in der Abdominalentwicklung der in der Abbildung schwarz umrandeten und beschrifteten Insertionen wurden in dieser Arbeit untersucht.

Tabelle 3.8: Übersicht über die in dieser Arbeit auf abdominale Expression untersuchten Enhancer-Trap Stämme

Insertion	Insertionstyp	Insertionsort rel. zu TSS	GOP- Stammnummer	Herkunft	abdominale Expression
ombP14	PGalW	-41 619	1067, 1068, 1070	(Gerlitz et al., 2002)	nein
ombP15	PGalW	-39 377	1069, 1071, 1074	(Gerlitz et al., 2002)	nein
ombP5 oder P9 oder P10	PlacW	-39 377	81, 631, 632	(Peter et al., 2002)	nein
ombP2	PlacW	-29 938	83	(Sun et al., 1995)	nein
ombP11 (SPE-D)	PlacW	-23 439	633	(Peter et al., 2002)	nein
ombP3	PGawB	-1 481	55	(Calleja et al., 1996)	ja
ombP1	PlacW	-1 378	82	(Sun et al., 1995)	nein
ombP16	PGalW	-122	1072	(Gerlitz et al., 2002)	nein
ombP4	PGawB	12 282	47	(Calleja et al., 1996)	nein
ombP17	PGalW	13 963	1073	(Gerlitz et al., 2002)	nein
ombP6, ombP7	PGawB	14 265	504, 741	(Tang and Sun, 2002)	ja

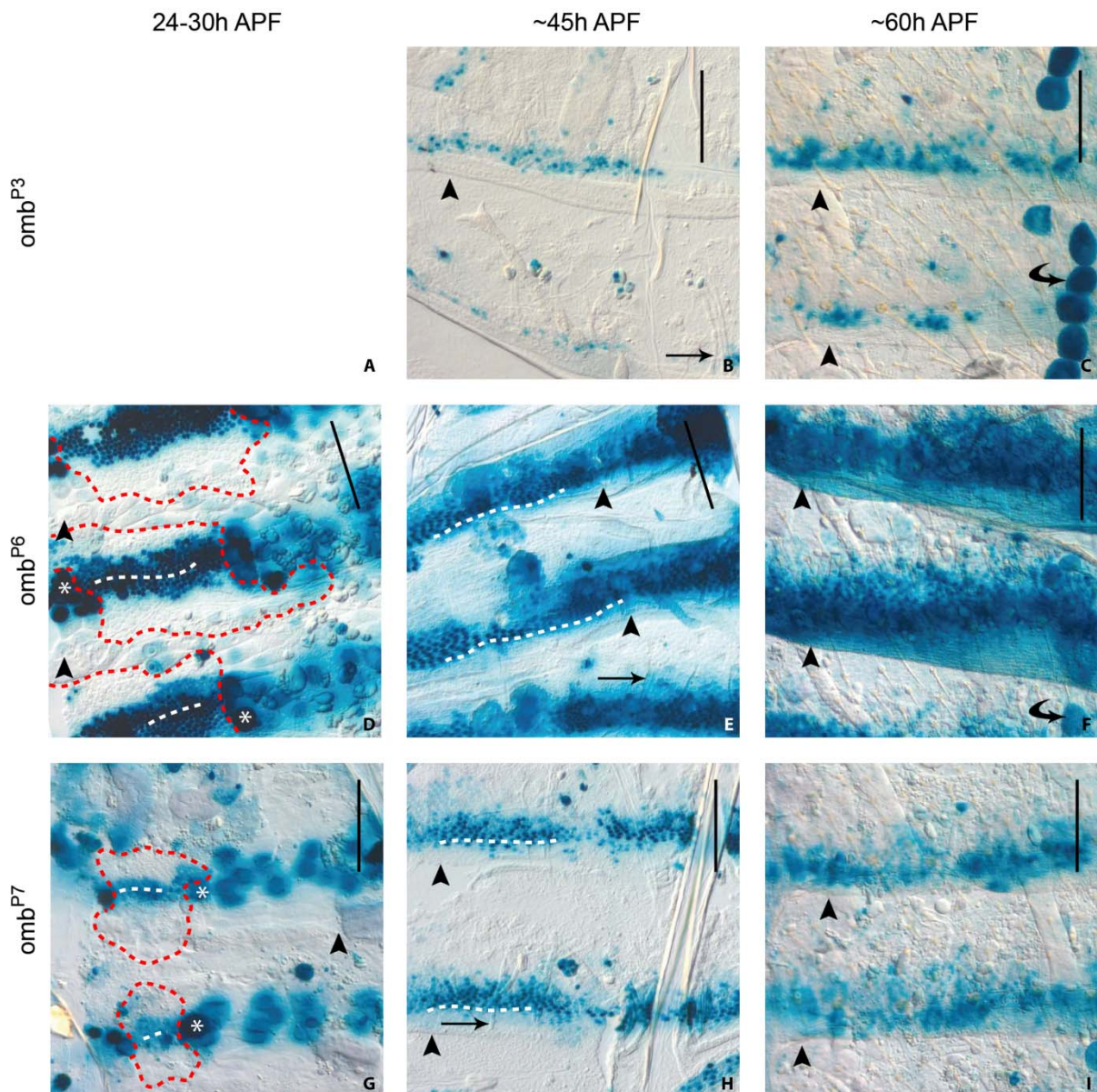


Abbildung 3.29: Expressionsmuster der Enhancer-Trap Stämme ombP3, ombP6 und ombP7. Dargestellt sind Xgal-Färbung der Enhancer-Trap Stämme ombP3, ombP6 und ombP7. Es sind jeweils drei Stadien abgebildet, 24-30h APF, 40h und 60h APF. Zu sehen sind die abdominalen Segmente A2 bis A4. Der schwarze Balken gibt Lage und Neigung der dorsalen Mittellinie an. Pfeilköpfe deuten die Segmentgrenzen an, geschwungene Pfeile in B, D und F Zellen des sich entwickelnden adulten Herzes. Alle Linien wurden 2h in Xgal gefärbt.

3.1.7 β -Galactosidase Aktivität in pupalen Herzzellen

Xgal-Färbungen an pupalen Abdomen von Enhancer-Reporter und Enhancer-Trap Stämmen zeigten reproduzierbar Färbungen in pupalen Herzzellen (Abbildung 3.30 A, Pfeil). Da die Färbung in allen untersuchten Enhancer-Reporter Linien gefunden wurde, wurden Abdomen von *w* Fliegen einer Xgal-Färbung unterzogen. Auch hier war eine Blaufärbung der Herzzellen zusehen (Abbildung 3.30 B). Ein Fliegenstamm, in dem die endogene β -Galactosidase Aktivität mutiert ist (Gal^{n1} , Knipple and MacIntyre, 1984), zeigte ebenfalls eine Färbung in den Herzzellen (Abbildung 3.30 C). Bei der Färbung der Herzzellen der Enhancer-Reporter Linien handelt es sich also nicht um einen Artefakt des Vektors und auch nicht um Enhancer-spezifisch getriebene Reporterexpression.

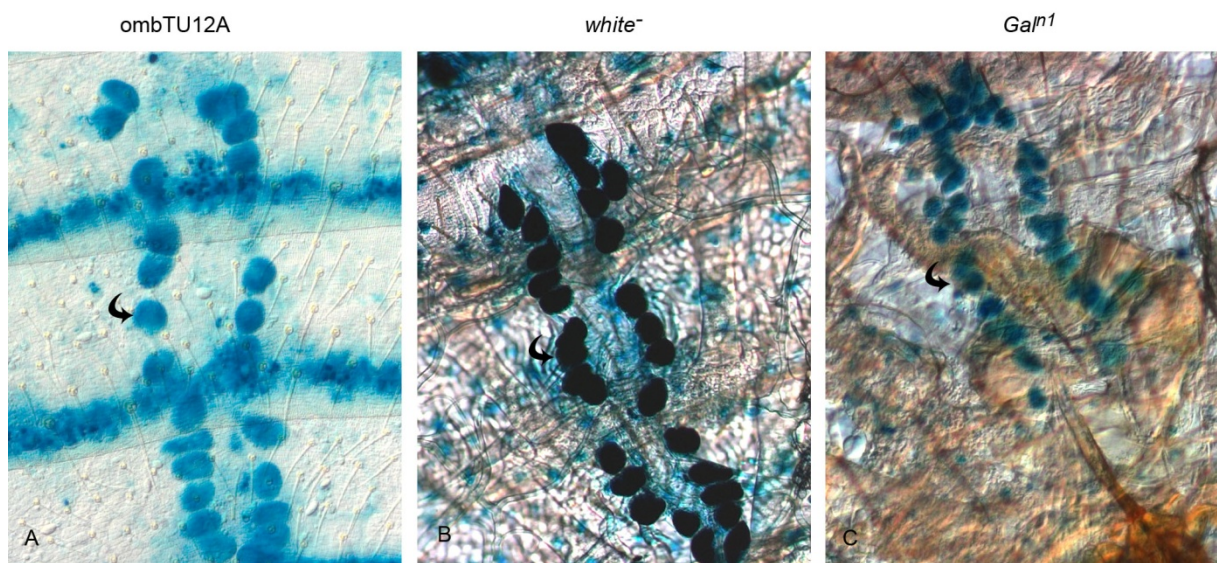


Abbildung 3.30: β -Galactosidase Aktivität in pupalen Herzzellen. Pfeile markieren gefärbte pupale Herzzellen. (A) Xgal-Färbung der Enhancer-Reporter Linie ombTU12A, 60h APF. (B) Xgal-Färbung einer *white*⁻ Fliege, 70-80h APF. (C) Xgal-Färbung einer Gal^{n1} Fliege, 70-80h APF.

3.2 Ergebnisse und Diskussion: Untersuchungen zur Regulation von *omb*

3.2.1 Enhancer-Reporter Konstrukte

In dieser Arbeit wurde die vorangegangene Analyse des *omb*-Gens nach regulatorischen Sequenzen fortgeführt (Sivasankaran et al., 2000; Hofmeyer, 2001; Dorner, 2008; Mayer, 2008). Hierzu wurden bislang noch nicht untersuchte Bereiche des *omb*-Locus in überlappenden Fragmenten in Enhancer-Reporter Vektoren kloniert. Nach Insertion im Genom wurde deren räumliche und zeitliche Expressionsmuster in verschiedenen Geweben untersucht. Abbildung 3.31 zeigt das *omb* Gen mit seinen proximalen und distalen regulatorischen Regionen und die auf regulatorische Eigenschaften untersuchten Fragmente. Die genauen Positionen der in dieser Arbeit hergestellten Enhancer-Reporter Konstrukte sind der Tabelle 3.9 und deren Herstellung dem Kapitel 2.2.15 zu entnehmen.

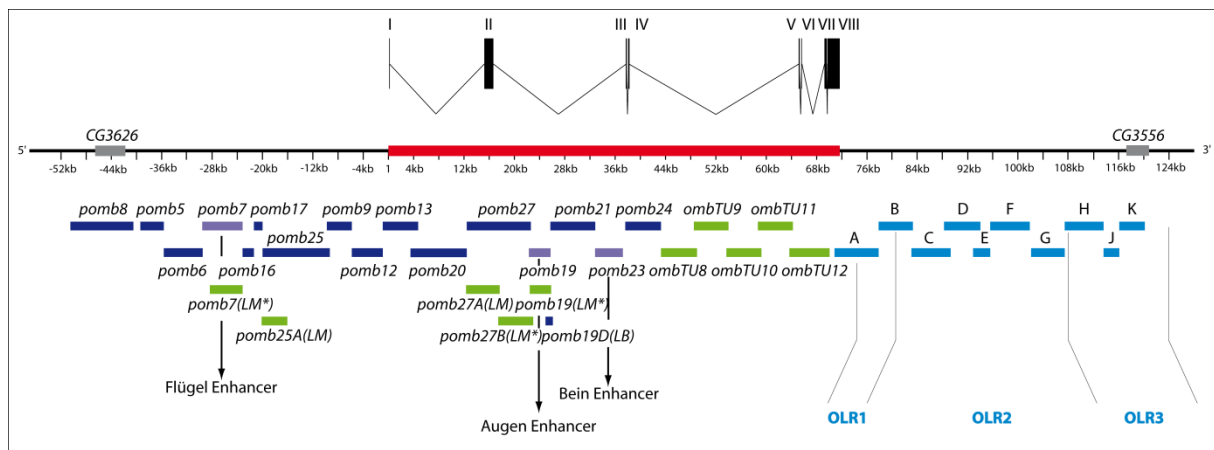


Abbildung 3.31: Der *omb*-Locus und die auf Enhancer Aktivität untersuchten Fragmente mit ihrer Position relativ zum TSS. Oberhalb der Skala ist die Exon/Intron Struktur der *ombTU* dargestellt. Sivasankaran et al., 2000 identifizierten in *pomb7* einen Flügel-, in *pomb19* einen Augen- und in *pomb23* einen Beinspezifischen Enhancer. Die in dieser Arbeit untersuchten Fragmente sind in grün abgebildet. Die Fragmente *pomb7(LM*)*, *pomb27B(LM*)* und *pomb19(LM*)* werden in (Mayer, 2008) beschrieben. OLR = optic lobe regulatory region

Tabelle 3.9: In dieser Arbeit hergestellte und untersuchte Enhancer-Reporter Konstrukte.

Fragment	Position relativ zu TSS	Größe (bp)	Primer	Schnittstelle	Subklonierungsvektor	Expressionsvektor
pomb25-A	-20390 - -16220	4171	818/819	---	pCR8/GW/TOPO	pGW-attB-lacZ
pomb27-A	12226 – 17879	5675	832/833	---	pCR8/GW/TOPO	pBPGUw
ombTU8*	43380 – 48993	5613	931/932	KpnI	pCR-XL-TOPO	pHPelican
ombTU9	48560 – 54039	5501	933/934	KpnI	pCR-XL-TOPO	pHPelican

ombTU10*	53707 – 59196	5489	935/936	EcoRI	pCR-XL-TOPO	pHPelican
ombTU10A	53708 – 55541	1855	935/ 1040	---	pCR8/GW/TOPO	pGW-attB-lacZ
ombTU10B	55247 – 56929	1703	1041/ 1042	---	pCR8/GW/TOPO	pBPGUw
ombTU10C	56771 – 59233	2462	1324/ 1361	---	pCR8/GW/TOPO	pGW-attB-lacZ
ombTU11	58756 – 64210	5454	937/938	---	pCR8/GW/TOPO	pBPGUw
ombTU12*	63714 – 70000	6286	939/940	KpnI	pCR-XL-TOPO	pHPelican
ombTU12A	63730 – 65604	1895	1044/ 1045	---	pCR8/GW/TOPO	pBPGUw
ombTU12A min	64026 – 65091	1086	1362/ 1363	---	pCR8/GW/TOPO	pGW-attB-lacZ
ombTU12A min- Ci22mut	64026 – 65091	1086	1422/ 1423 <small>Topo- ombTU12Amin als Template</small>	---	pCR8/GW/TOPO	pGW-attB-lacZ
ombTU12A min- Ci22oligo	64026 – 65091	1144	1362/ 1363	---	pCR8/GW/TOPO	pGW-attB-lacZ
ombTU12A minΔTBE20	64040 – 65112	1072	1364/ 1363	---	pCR8/GW/TOPO	pGW-attB-lacZ
ombTU12A min Δ TBE20,Ci21	64123 – 65112	989	1365/ 1363	---	pCR8/GW/TOPO	pGW-attB-lacZ
ombTU12A min Δ TBE20,Ci21 -Ci22mut	64123 – 65112	989	1422/ 1423 <small>Topo- ombTU12Amin Δ TBE20,Ci21 als Template</small>	---	pCR8/GW/TOPO	pGW-attB-lacZ
ombTU12A min ΔMad Pollard12	64026 – 64842	816	1362/ 1366	---	pCR8/GW/TOPO	pGW-attB-lacZ
ombTU12B	65354 – 68283	2950	1046/ 1047	---	pCR8/GW/TOPO	pGW-attB-lacZ
ombTU12C	68226 – 69495	1290	1048/ 1049	---	pCR8/GW/TOPO	pBPGUw
J ^{min} +WRE	115768- 116224	478	982/983	EcoRI	pCR-XL-TOPO	pHPelican

*Die Enhancer-Reporter Konstrukte ombTU8, ombTU10 und ombTU12 wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit in der Arbeitsgruppe hergestellt (Barth, 2008).

3.2.1.1 Expression der Enhancer-Reporter Konstrukte ombTU8 bis ombTU12 der 3'ombTU in den Imaginalscheiben

In den Fragmenten der 3'ombTU wurde der oben beschriebene Tergiten-Enhancer identifiziert (siehe 3.1.3). In den Imaginalscheiben trieben die Fragmente ombTU9 bis ombTU12 Reporter gen Expression, ombTU8 zeigte keine Expression. Die Expressionsmuster werden im Folgenden beschrieben.

ombTU8

Das Fragment ombTU8 wurde in den P-Element Vektor pHPelican (Barolo et al., 2000) kloniert und über P-Element Transformation transgen gemacht. Es wurden vier unabhängige Linien erhalten. Keine der Linien zeigt eine charakteristische Expression, weder in den Imaginalscheiben (Abbildung 3.32 A-E), noch während der Entwicklung des adulten Abdomens. In der Flügelimaginalscheibe war eine leichte Färbung in der hinge-Region zu sehen. Diese tauchte allerdings bei vielen Enhancer-Reporter Linien auf, so dass sie als Artefakt betrachtet werden kann (Butler et al., 2003). Die leichte Färbung in der Augen- und Antennenscheibe sind aufgelagerten Aepithelialzellen zuzuschreiben.

ombTU9

Für ombTU9 wurden vier unabhängige P-Element Insertionslinien erhalten. ombTU9 befand sich im Expressionsvektor pHPelican (Barolo et al., 2000). In den Flügelimaginalscheiben war das Färbemuster recht variabel. Alle Linien zeigten eine starke Expression der dorsozentralen *hinge*-Region. Die hier abgebildete Linie 2-2A (Abbildung 3.32 F) wies, verglichen mit den anderen transgenen Linien, die stärkste Färbung entlang der A/P-Grenze in der *pouch*-Region auf. Linie 1-1A zeigte hier nur eine schwache und die restlichen Linien keine Färbung. Die Färbung in der Notum-Region war bei allen Linien zu sehen. Die lacZ Expression in der ventralen Antennenscheibe und am dorsalen Rand der Augenimaginalscheibe war für alle Linien reproduzierbar. Bei den Linien 1-1A und 4-2A war die Färbung der Zellen anterior zur morphogenetischen Furche deutlicher zu erkennen als bei der hier abgebildeten Scheibe (Abbildung 3.32 G). Alle Linien zeigten die Färbung im dorsal-posterioren Bereich der Beinimaginalscheibe. ombTU9 wies in den Genitalscheiben einen deutlichen Sexualdimorphismus auf. In der weiblichen Genitalscheibe war keine Färbung zu sehen. Die männliche Genitalscheibe zeigte eine starke Färbung in den lateralen Bereichen des *male genital primordium* (MGP), Vorläuferstrukturen der männlichen Terminalia (Abdominalsegment 9). In diesem Bereich der Genitalscheibe wird, im Gegensatz zur weiblichen Genitalscheibe, *dpp* exprimiert (Sanchez et al., 2001). Diese *dpp* Expression ist entscheidend für die Entwicklung oder Repression des MGP. Anscheinend befinden sich in ombTU9 Sequenzen, die durch diese spezifische *dpp*-Expression

angesprochen werden. Auch die Expression der Flügel- und Antennenscheiben stehen im Einklang mit einer Regulation durch Dpp.

ombTU10

ombTU10 wurde in den P-Elementvektor pHPelican kloniert und es wurden nach Injektion neun unabhängige P-Element Insertionslinien isoliert. In den Imaginalscheiben zeigte *ombTU10* in allen Linien, bis auf Linie 8-1A, ein ähnliches Expressionsmuster. Die Flügelimaginalscheiben zeigten eine intensive Färbung der *pouch*- und *hinge*-Region. Im Notum Bereich war ebenfalls, bis auf den anterioren Rand und einen posterioren Fleck, eine intensive Färbung zu sehen. In den Augen- und Antennenscheiben war eine deutliche Färbung in der ventralen und eine schwächere Färbung in der dorsalen Hälfte der Antennenscheibe zu sehen. Die Augenscheibe wies am ventralen und am dorsalen Rand eine Färbung auf. In der Beinimaginalscheibe waren der komplette anterior-dorsale und die Hälfte des posterior-dorsalen Bereichs gefärbt. Ein weiterer Fleck im posterior-ventralen Bereich war gefärbt. Die Genitalscheiben zeigten einen Sexualdimorphismus. In der weiblichen Genitalscheibe war eine Färbung im *female genital primordium* (FGP), einer Vorläuferstruktur des weiblichen Abdominalsegments A8, zu sehen. Die männliche Genitalscheibe war im lateralen MGP und im ebenfalls im *repressed female primordium* (RFP) gefärbt. In den männlichen und weiblichen Primordien überlappte die lacZ-Expression jeweils mit der Dpp- und der Omb-Expressionsdomäne (Sanchez et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass in *ombTU10* *dpp*-regulatorische bzw. *omb*-selbstregulatorische Elemente, die in den Genitalscheiben aktiviert werden, enthalten sind.

ombTU11

ombTU11 befand sich in Gateway-Expressionsvektor pBPGUw und wurde mittels des ϕ C31-Integrase System ins Genom in den Locus 58A integriert. Dabei wurden zwei unabhängige transformante Linien erhalten. Die Expressionsmuster beider Linien waren identisch. Die Flügelimaginalscheiben wiesen, bis auf anteriore und posteriore Bereiche der *hinge*-Region, eine ubiquitäre Färbung auf, wobei die Färbung im Notum am intensivsten war. In der Augen- und Antennenimaginalscheibe lag jeweils eine Färbung des dorsalen und ventralen Randes vor. In der Beinimaginalscheibe lag eine Färbung der dorsalen Hälfte vor, die in der ventralen Hälfte in einen konzentrischen Kreis übergang. Diese Färbung wurde in der Arbeitsgruppe auch bei anderen Enhancer-Reporter Linien, die den Gateway Destination Vektor pBPGUw oder pGW-attB-lacZ enthielten, gesehen und war somit auf einen Effekt des Vektors zurückzuführen. Die weibliche Genitalscheibe wies eine ubiquitäre Färbung auf. In der männlichen Genitalscheibe waren, bis auf zwei Bereiche des MGP, alle Primordien gefärbt.

ombTU12

Für *ombTU12* wurden nach P-Elementinsertion des pHPelican Reporter-Konstrukts sieben unabhängige transgene Linien etabliert. Die untersuchten Linien zeigten ein im Wesentlichen übereinstimmendes Xgal-Färbemuster, das sich in der Intensität unterscheiden kann. In der Flügelimaginalscheibe war eine von dorsal nach ventral reichende, streifenartige Färbung zu sehen, die zum posterioren hin schwächer wurde. Dabei handelte es sich um eine Färbung der Peripodialmembran, was die Antikörperfärbung gegen β -Galactosidase in Abbildung 3.33 zeigte. Die großflächigen Zellen der Peripodialmembran wiesen β -Galactosidaseaktivität auf. Die Färbung könnte auf der A/P-Grenze der Peripodialmembran lokalisiert sein. Dies müsste jedoch durch eine Doppelfärbung mit einem Kompartiment-Marker gezeigt werden. Dieses Färbemuster wurde jedoch auch bei anderen Enhancer-Reporter Linien, die den Gateway Destination Vektor pBPGUw oder pGW-attB-lacZ enthielten in der Arbeitsgruppe gesehen. Das Fragment *ombTU12* wurde allerdings in den P-Elementvektor pHPelican kloniert. Trotzdem ist davon auszugehen, dass es sich bei der Färbung der Peripodialmembran um einen Artefakt handelt. Die hier abgebildete Linie 1-2A zeigte in der Flügelscheibe nur eine schwache Färbung im posterioren Notum. Diese war bei anderen Linien deutlicher ausgeprägt. Die Augen-/Antennenimaginalscheibe wurde ebenfalls von posterior nach anterior von einer streifenartigen Färbung durchzogen. Dabei ist die Färbung am posterioren Pol der Augen- und am anterioren Pol der Antennenscheibe am stärksten. Die Färbung zog sich jedoch nicht in den optischen Stiel hinein. Die Antennenscheibe wies eine Färbung im dorsalen Bereich auf. Bei der Färbung im dorsalen Teil der Augenscheibe und im Zentrum der Antennenscheibe handelt es sich bei der hier gezeigten Imaginalscheibe um aufgelagerte Adepithelialzellen. Die Beinimaginalscheibe war in einem anterior-ventralen Bereich stark gefärbt. Von hier aus zog sich ein Streifen bis zur ventralen Spitze der Beinscheibe. Dorthin verlief ebenfalls ein weiterer Streifen am posterioren Rand der Scheibe. Die weibliche Genitalscheibe war komplett, bis auf einen kleinen lateralen Bereich des FGP, sehr intensiv gefärbt. Die Genitalscheibe des Männchens war am Rand des MGP gefärbt. In diesem Bereich wird *dpp* exprimiert (Sanchez et al., 2001).

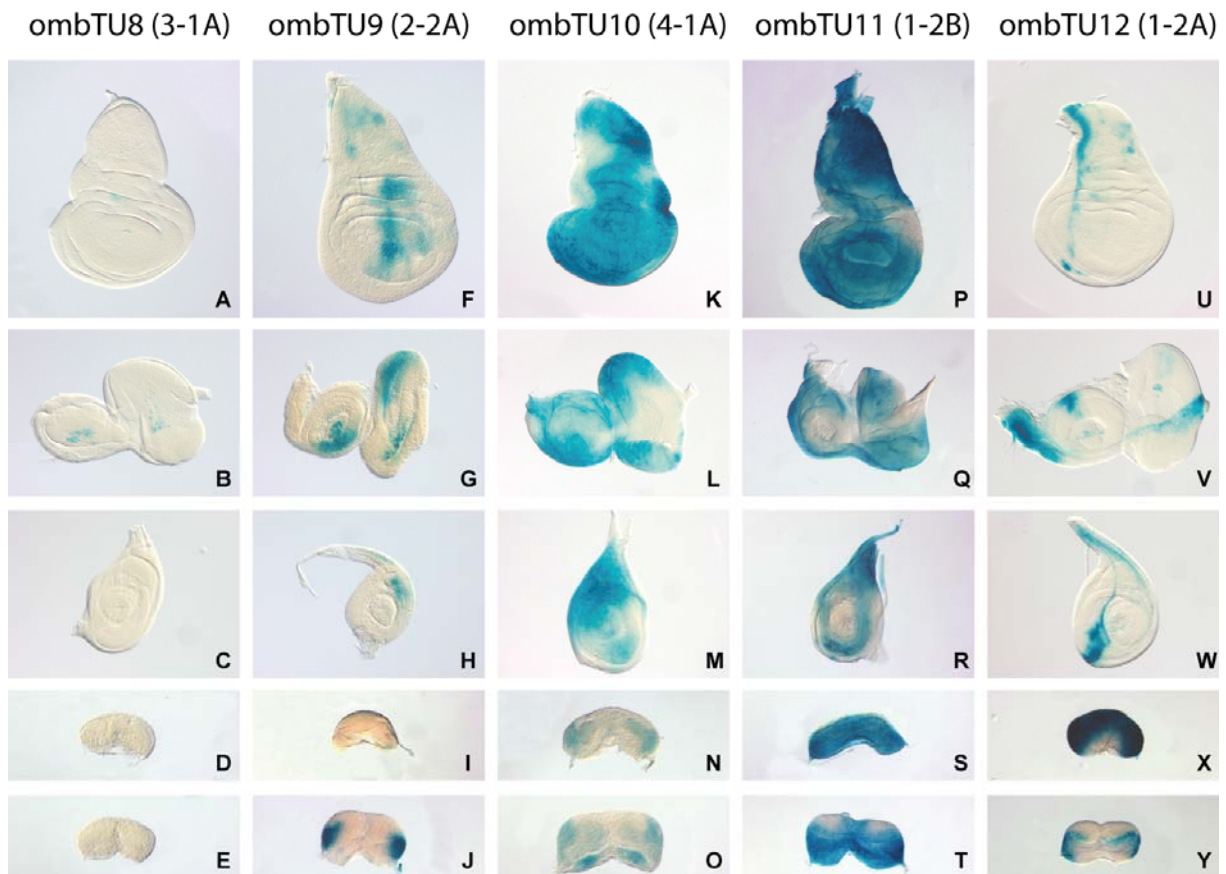


Abbildung 3.32: ombTU8 bis ombTU12 Expression in den Imaginalscheiben. In A-Y sind Xgal Färbungen von Imaginalscheiben von L3-Larven zu sehen. In A, F, K, P und U sind Flügelimaginalscheiben, in B, G, L, Q und V Augenimaginalscheiben und in C, H, M, R und W Beinimaginalscheiben mit der Orientierung dorsal oben und anterior links abgebildet. In D, I, N, S und X sind weibliche und in E, J, O, T und Y männliche Genitalscheiben zu sehen. Sie sind in der dorsalen Ansicht abgebildet. A-C zeigen die Imaginalscheiben des Enhancer-Reporters ombTU8 Linie 3-1A, D und E des Enhancer-Reporters ombTU8 Linie 1-2A. F-J ombTU9 Linie 2-2A; K-M ombTU10 Linie 4-1A; N und O ombTU10 Linie 2-2A; P-R ombTU11 Linie 1-2B und S-T ombTU11 Linie 1-1D; U-Y ombTU12 Linie 1-2A. ombTU8, 9 und 12 wurden über Nacht, ombTU10 zwei Stunden und ombTU11 eine Stunde in Xgal gefärbt. Die Fragmente ombTU8-10 und ombTU12 befinden sich im P-Elementvektor pHPelican, ombTU11 im Gateway-Destinationvektor pBPGUw.

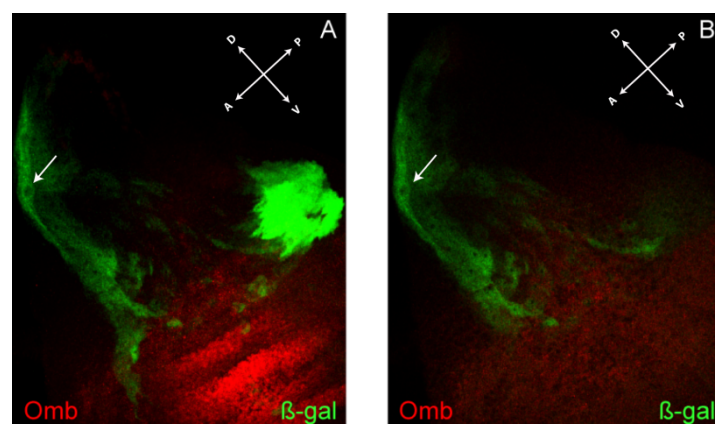


Abbildung 3.33: Antikörperfärbung gegen Omb und β -Gal an der Enhancer-Reporter Linie ombTU12 1-2A. In A ist eine Gesamtprojektion der Antikörper-Doppelfärbung gegen Omb (rot) und β -Galactosidase (grün) des Notumbereichs einer Flügelimaginalscheibe abgebildet. Ein Einzelscan der Peripodalmembran in B zeigt, dass die β -Galactosidaseaktivität in dieser Schicht lokalisiert ist (Pfeil). Die starke β -Galactosidase

Expressionsdomäne im posterioren Kompartiment des Notums (A) befindet sich in der kolumnären Schicht der Flügelscheibe.

3.2.1.2 Expression der Subfragmente von *ombTU10* und *ombTU12* in den Imaginalscheiben

Die Fragmente *ombTU10* und *ombTU12* wurden jeweils in drei überlappende Subfragmente unterteilt, deren Position der Abbildung 3.8 zu entnehmen ist. Alle Subfragmente wurden in den Vektor pBPGUw oder pGW-attB-lacZ kloniert und über ϕ C31 Integration in der Locus 58A integriert. Im Folgenden werden die Expressionsmuster in den Imaginalscheiben beschrieben.

ombTU10A

Das Subfragment *ombTU10A* wurde in den Vektor pGW-attB-lacZ kloniert und zeigte ein charakteristisches Expressionsmuster in allen Imaginalscheiben (Abbildung 3.34 A – E). In Flügel-, Auge-, Bein- und Genitalscheiben entsprach die Expression zum großen Teil der Expression des Fragments *ombTU10* (vergleiche Abbildung 3.32 K – O). Im Flügel zeigte *ombTU10A* eine diskretere Expression als *ombTU10*. Die Färbung im Notum war sehr schwach. Die Färbung in der *pouch* war auf die zentrale Region und die ventrale Pleura beschränkt. In der Augen- und Antennenimaginalscheibe entsprach die Expression in abgeschwächter Form der Expression von *ombTU10*. Eine Färbung der dorsalen und ventralen Ränder der Augenscheibe, sowie eine Färbung der ventralen Antennenscheibe waren zu sehen. Die Beinscheibe wies eine Färbung des dorsalen Bereichs auf, die sich im anterioren Kompartiment schwach fast bis zur D/V-Grenze zieht. In der weiblichen Genitalscheibe wurde *ombTU10A* im FGP und in der männlichen Genitalscheibe in lateralen Bereichen des MGP exprimiert.

ombTU10B

ombTU10B wurde in den Vektor pBPGUw kloniert und zeigte in der Flügel-, Augen-/Antennen- und Beinimaginalscheibe die für diesen Vektor bekannten Artefaktfärbungen (Abbildung 3.34 F geschwungener Pfeil). In den Genitalscheiben zeigte dieses Fragment ebenfalls einen Sexualdimorphismus. In der weiblichen Genitalscheibe war eine starke Expression im FGP zu sehen. Die männliche Genitalscheibe zeigte eine Färbung im RFP (Abbildung 3.34 I und J).

ombTU10C

Das Fragment *ombTU10C* wurde in den Vektor pGW-attB-lacZ kloniert und zeigte in allen Scheiben eine recht ubiquitäre Färbung (Abbildung 3.34 K – O). In der Flügelscheibe war die Färbung in einem die *pouch* umrandenden Ring am stärksten (Abbildung 3.34 K Pfeil). Dieser reichte bis zur ventralen

Pleura. Auch am posterioren Rand des Notums war eine stärkere Färbung zu sehen. In der Augenscheibe fiel auf, dass der posteriore, Photorezeptoren enthaltende Rand und ein zentraler, den ‚Bolwischen‘-Nerven enthaltender Bereich ungefärbt war (Abbildung 3.34 L Pfeil). Ansonsten waren die dorsalen und ventralen Ränder stark gefärbt. In der Beinscheibe war im Wesentlichen ein peripherer Ring gefärbt, was möglicherweise auf ein Vektorartefakt zurückzuführen ist. Auch in den Genitalscheiben war durch die ubiquitäre Färbung kein distinktes Expressionsmuster zu erkennen.

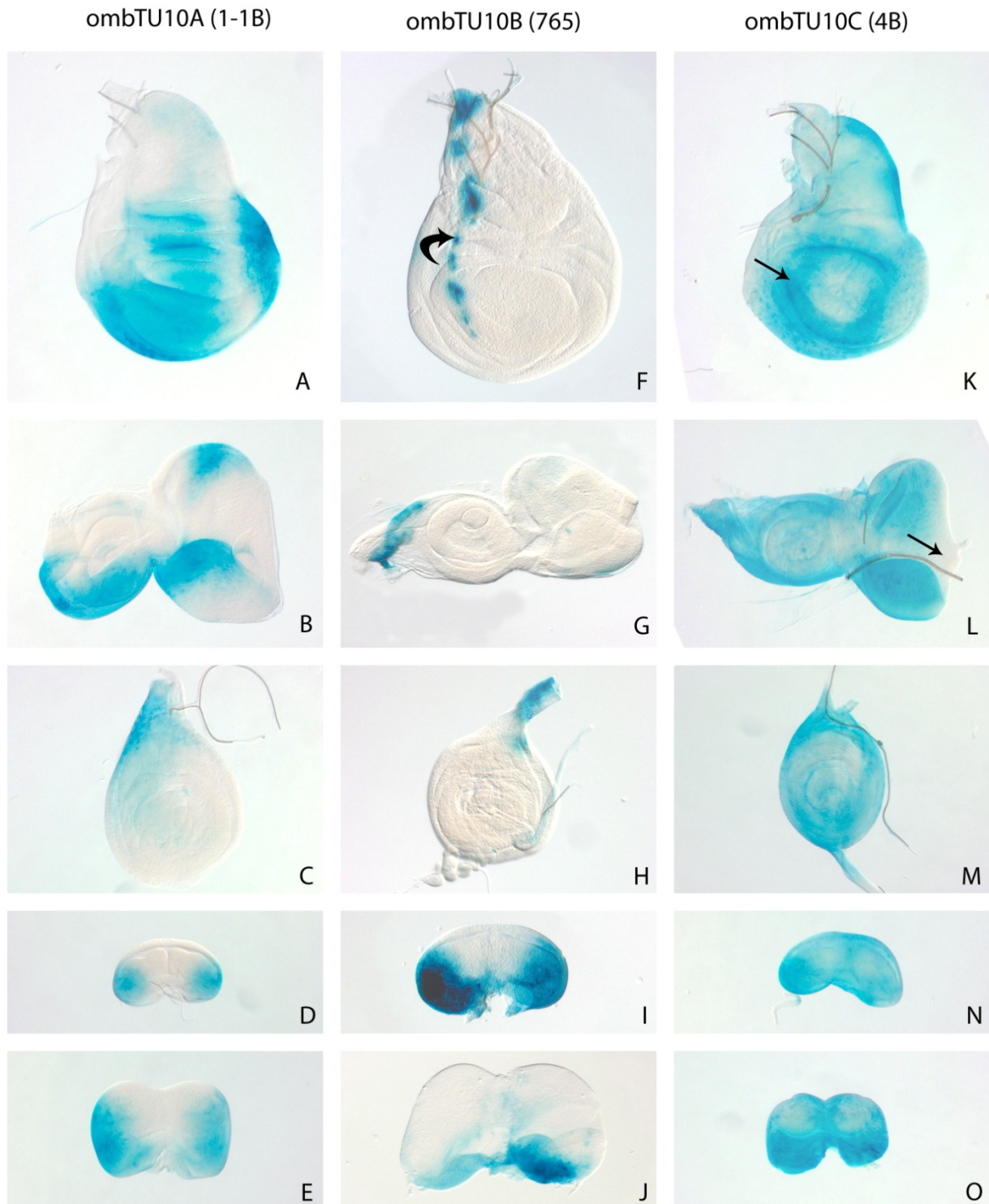


Abbildung 3.34: Expressionsmuster der Subfragmente von ombTU10 in den Imaginalscheiben. In A – O sind Xgal Färbungen von Imaginalscheiben von L3-Larven zu sehen. In A, F und K sind Flügelimaginalscheiben, in B, G und L Augenimaginalscheiben und in C, H und M Beinimaginalscheiben mit der Orientierung dorsal oben und anterior links abgebildet. In D, I und N sind weibliche und in E, J und O männliche Genitalscheiben zu sehen. Sie sind in der dorsalen Ansicht abgebildet. In A – E sind Scheiben des Enhancer-Reporter Stamms ombTU10A Linie 1-1B, in F – J des Stamms ombTU10B Linie 765 und in K – O des Stamms ombTU10C Linie 4B abgebildet. Der geschwungene Pfeil in F deutet den peripodialen Vektorartefakt von pGW-attB-lacZ an. Der Pfeil in K markiert die konzentrische Färbung der *pouch*. Der Pfeil in L markiert den posterior zur morphogenetischen Furche

liegenden ungefärbten Bereich. Alle Stämme wurden eine Stunde in Xgal gefärbt. ombTU10A und ombTU10C wurden in den Vektor pGW-attB-lacZ und ombTU10B in pBPGUw kloniert.

ombTU12A

Das Subfragment ombTU12A wurde in den Gateway Expressionsvektor pBPGUw kloniert und in den Locus 58A integriert. Es zeigte im Vergleich zu ombTU12 eine starke Expression in den Imaginalscheiben (vergleiche Abbildung 3.35 A – E und Abbildung 3.32 U – Y). Das Subfragment ombTU12A enthält zwei konservierte Ci-Bindedomänen, eine TBE-*site* und eine Mad-Bindestelle (Abbildung 3.15). In der Flügelimaginalscheibe war, im Gegensatz zur Expression im pupalen Abdomen, kein *hh*-abhängiges Expressionsmuster zu erkennen (Abbildung 3.35 A). Das Expressionsmuster zeigte *dpp*-abhängige Charakteristika, mit einer breiten Expression in der *pouch* Region, die an der A/P-Grenze am stärksten zu sein schien (Abbildung 3.35 A). Die Färbung zog sich mit einer stärkeren Färbung im Anterieren über die *hinge*, bis in die Notum Region. Diese peripodiale Färbung könnte jedoch auch auf die Artefaktfärbung des Vektors zurückzuführen sein. Die starke Färbung der posterioren Notum Region war in abgeschwächter Form auch in ombTU12 Flügelscheiben zu sehen. In der Augenimaginalscheibe war eine schwache Färbung des posterioren Pols zu sehen und in der Antennenscheibe eine starke Färbung des dorsalen, ventralen und posterioren Randes. Diese Färbung der Antennenscheibe wurde bei mehreren pBPGUw enthaltenden Stämmen gesehen (vergleiche ombTU11 Abbildung 3.32 Q) und wurde deshalb ebenfalls als Vektor- und Integrationsartefakt identifiziert. Die Beinscheibe, sowie die weibliche Genitalscheibe zeigten eine ubiquitäre Färbung.

ombTU12B

ombTU12B wurde in den Vektor pGW-attB-lacZ kloniert und in den Locus 58A integriert. Es zeigte in der Flügel-, Augen-/Antennen- und Beinimaginalscheibe die für diesen Vektor typische Artefaktfärbungen (Abbildung 3.35 F – H). In der weiblichen Genitalscheibe war eine Färbung des FGP und in der männlichen Genitalscheibe eine Färbung des RFP zu sehen (Abbildung 3.35 I und J).

ombTU12C

ombTU12C befindet sich im Gateway Vektor pBPGUw und wurde in den Locus 58A integriert. Es zeigte, wie ombTU12B, in Flügel-, Augen-/Antennen- und Beinimaginalscheibe die typischen Artefaktfärbungen (Abbildung 3.35 K – O). In der weiblichen Genitalscheibe war eine starke Färbung des FGP zu sehen. Die männliche Genitalscheibe wies eine breitere Färbung des RFP auf, als bei *ombTU12B* zu sehen war (Abbildung 3.35 N und O).

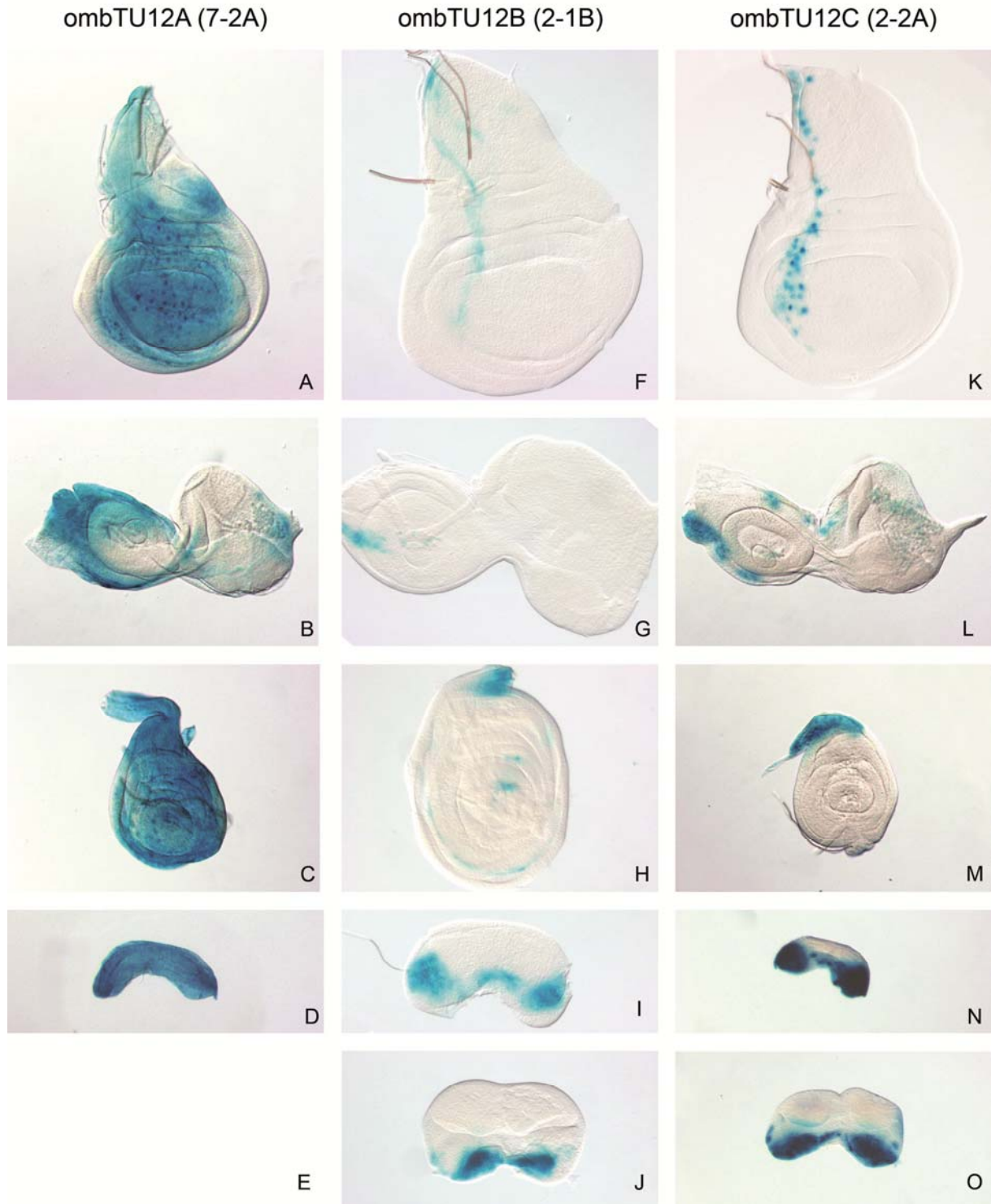


Abbildung 3.35: Expressionsmuster der Subfragmente von ombTU12 in den Imaginalscheiben. In A – O sind Xgal Färbungen von Imaginalscheiben von L3-Larven zu sehen. In A, F und K sind Flügelimaginalscheiben, in B, G und L Augenimaginalscheiben und in C, H und M Beinimaginalscheiben mit der Orientierung dorsal oben und anterior links abgebildet. In D, I und N sind weibliche und in E, J und O männliche Genitalscheiben zu sehen. Sie sind in der dorsalen Ansicht abgebildet. In A – E sind Scheiben des Enhancer-Reporter Stamms ombTU12A Linie 7-2A, in F – J des Stamms ombTU12B Linie 2-1B und in K – O des Stamms ombTU12C Linie 2-2A abgebildet. ombTU12A und ombTU12C wurde 1,5h in Xgal gefärbt, ombTU12B für 2,5h.

3.2.1.3 Expression des Minimalfragments ombTU12Amin und seinen Subfragmenten in den Imaginalscheiben

Die Expression des in 3.1.4.1 beschriebenen Minimalfragments ombTU12Amin und seiner Subfragmente, denen je eine der in ombTU12Amin enthaltenen potentiellen Bindestelle fehlt (siehe Abbildung 3.15), wurde in den Imaginalscheiben untersucht. Alle Fragmente wurden in den Expressionsvektor pGW-attB-lacZ kloniert und in den Locus 58A integriert. Alle Fragmente zeigten in Flügel-, Augen-/Antennen- und Beinimaginalscheibe ein vergleichbares Expressionsmuster, das jedoch auch innerhalb der Linien leicht variabel war. In der Flügelimaginalscheibe war ein mit ombTU12A vergleichbares Expressionsmuster zu erkennen (vergleiche Abbildung 3.36 A – L und Abbildung 3.35 A). Es war eine starke Färbung der *pouch* bis in die ventrale Pleura zu sehen. Dabei war entweder die ganze *pouch* gefärbt, oder es waren ungefärbte Bereiche oberhalb der D/V-Grenze zusehen. In Flügeln von Tieren des Minimalfragments ombTU12Amin traten beide Expressionen auf. Tiere der Linien ombTU12Amin-deltBE20 und ombTU12Amin-deltBE20,Ci21 zeigten immer den ungefärbten Bereich oberhalb der D/V-Grenze und Flügel der Linie ombTU12Amin-delMad eine komplette Färbung oder einen ungefärbten Bereich anterior und oberhalb der D/V-Grenze. Die Färbung zog sich über die *hinge* Region ins Notum, wobei es sich bei der anterioren Färbung um den peripodalen Vektorartefakt handelte (z.B. Abbildung 3.36 B, geschwungener Pfeil). Das posteriore Notum zeigte die Färbung, die auch bei ombTU12 und ombTU12A zu sehen war (z.B. Abbildung 3.36 A, Asterisk). Der anteriore Flügelrand war bei allen Linien ungefärbt, wobei sich die Färbung bei Flügeln der ombTU12Amin-deltBE20,Ci21 Tieren am weitesten nach anterior zog (vergleiche Abbildung 3.36 D und G, Pfeile). Die Färbung des posterioren Flügelrandes war variabel. Sowohl Flügel von ombTU12Amin sowie der ombTU12Amin-deltBE20,Ci21 Tiere zeigten eine weit nach posterior reichende Färbung (vergleiche Abbildung 3.36 A, C, D und G Pfeilköpfe).

In den Augenimaginalscheiben war für jedes Konstrukt ein charakteristisches Expressionsmuster zu erkennen. Das Minimalfragment ombTU12Amin zeigte eine schwache Expression in der ventralen Hälfte der Augenscheibe und in einem kleinen Bereich in der dorsalen Augenhälfte, der jedoch variabel war (Abbildung 3.37 Stern A – C). In der zentralen Region war ein breiterer Streifen gefärbt (Abbildung 3.37 Pfeil A). Die Antennenscheibe zeigte eine ubiquitäre Färbung und in manchen Fällen nur eine Färbung des dorsalen und ventralen Randes. Bei dieser Färbung handelte es sich vermutlich um die Artefaktfärbung des Vektors pGW-attB-lacZ. Das Fragment ombTU12Amin-deltBE20 zeigte posterior zur morphogenetischen Furche in der Augenscheibe eine Färbung. Diese reichte nicht in den optischen Stiel hinein. Der zentrale, den ‚Bolwigischen‘-Nerven enthaltende Bereich und der ventrale Rand waren gefärbt (Abbildung 3.37 Pfeil D). Die Antennenscheibe war an ihren Rändern und einem konzentrischen Kreis gefärbt, wobei die Färbung im ventralen Teil stärker war. Das

Fragment *ombTU12Amin-delTBE20,Ci21* zeigte ebenfalls das für *ombTU12Amin-delTBE20* beschriebene Expressionsmuster in Augen- und Antennenscheibe, wobei die Färbung dieses Fragments etwas stärker schien. In Augenscheiben des Fragments *ombTU12Amin-delMad* war nur die ventrale Hälfte des posterior zur morphogenetischen Furche liegenden Bereichs gefärbt. Eine Färbung der ‚Bolwigschen‘-Nerven enthaltenden Region, sowie des ventralen Augenrandes war ebenfalls zu sehen (Abbildung 3.37 Pfeil K). Die Antennenscheiben zeigten das für *ombTU12Amin-delTBE20* beschriebene Expressionsmuster.

Die Beinscheiben aller vier Fragmente zeigten eine fast ubiquitäre Färbung, bei der kein charakteristisches Muster zu erkennen war. Diese Daten legen nahe, dass der distale Bereich des *ombTU12A* Fragments (um das TBE20 Element) zur Unterdrückung der Enhanceraktivität im dorsalen retinalen Feld notwendig ist. Da *omb* nicht in den differenzierenden Photorezeptorzellen exprimiert wird, spiegeln die veränderten Expressionsmuster wahrscheinlich keinen Omb-vermittelten Effekt wieder.

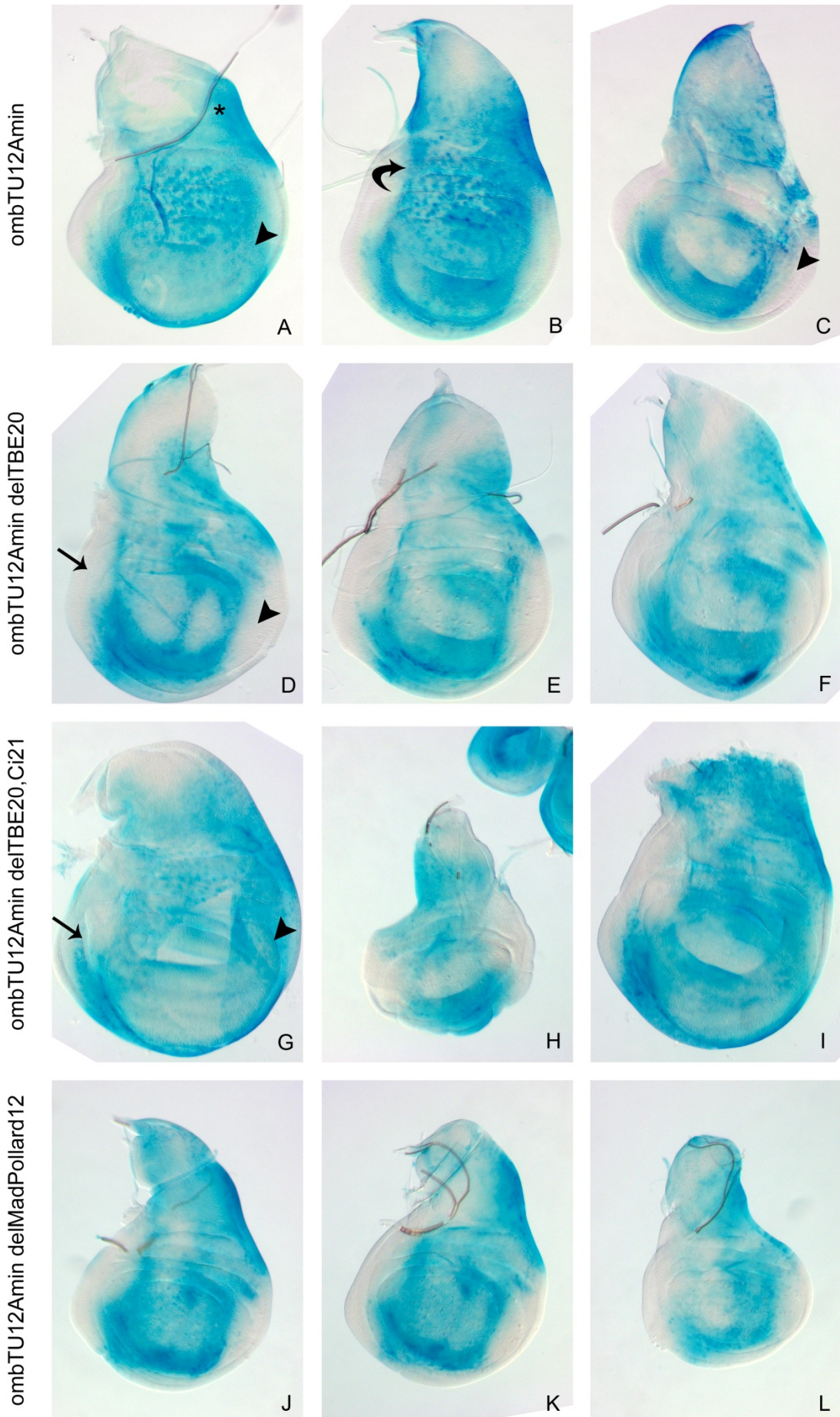


Abbildung 3.36: Expressionsmuster des Minimalfragments ombTU12A und seinen Subkonstrukten in Flügelimaginalscheiben. In A – C sind Xgal-Färbungen von Flügelimaginalscheiben des Enhancer-Reporter Konstrukts ombTU12Amin Linie 2B, in D – F des Konstrukts ombTU12Amin-deltBE20 Linie 5B, in G – I des Konstrukts ombTU12Amin-deltBE20,Ci21 Linie 4B und in J – L des Konstrukts ombTU12Amin-delMad Linie 11B abgebildet. Dorsal ist oben, anterior links. Askerisk in A markiert die Färbung des posterioren Notums, die auch in ombTU12 und ombTU12A Flügelscheiben zu sehen war. Die Pfeilköpfe in A, C, D und G deuten auf die unterschiedliche Färbung des posterioren Flügelrandes. Der geschwungene Pfeil in B markiert beispielsweise die in allen abgebildeten Flügeln vorkommende Artefaktfärbung der Peripodialmembran. Alle Scheiben wurden 1,5h in Xgal gefärbt.

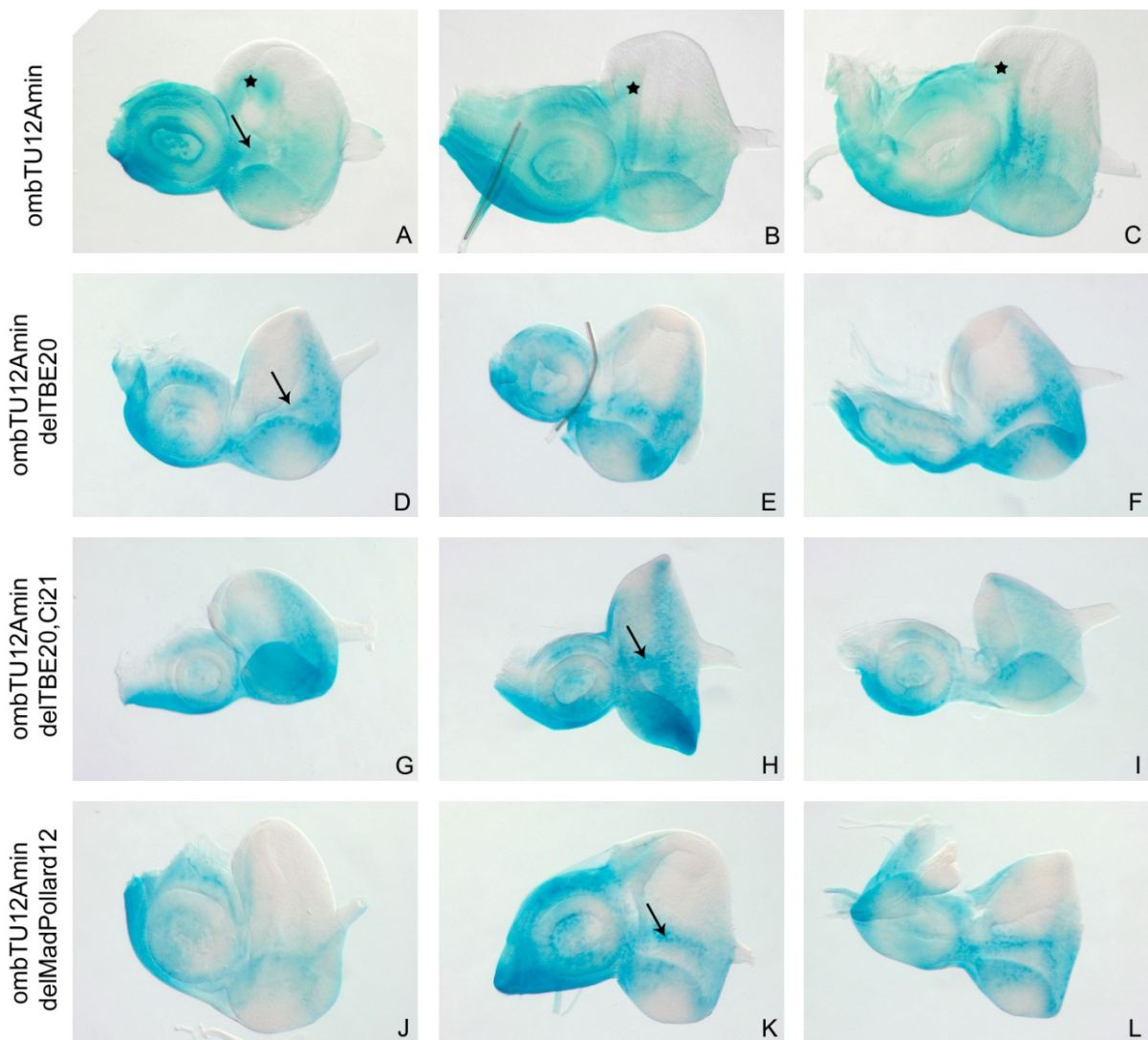


Abbildung 3.37: Expressionsmuster des Minimalfragments ombTU12A und seinen Subkonstrukten in Augen-/Antennenimaginalscheiben. In A – C sind Xgal-Färbungen von Augen-/Antennenimaginalscheiben des Enhancer-Reporter Konstrukts ombTU12Amin Linie 2B, in D – F des Konstrukts ombTU12Amin-deltBE20 Linie 5B, in G – I des Konstrukts ombTU12Amin-deltBE20,Ci21 Linie 4B und in J – L des Konstrukts ombTU12Amin-delMad Linie 11B abgebildet. Dorsal ist oben, anterior links. Der Asterisk in A – C markiert den variabel gefärbten Bereich der dorsalen Hälfte der Augenscheiben. Pfeile in A, D, H und K deuten die Färbung der zentralen, den ‚Bolwig’schen‘-Nerven enthaltende Region an. Alle Scheiben wurden 1,5h in Xgal gefärbt.

3.2.1.4 Expression weiterer Enhancer-Reporter Konstrukte

Um die Lücken in der Enhancer-Reporter Analyse des *omb*-Locus zu schließen, wurden die Fragmente *pomb25A* und *pomb27A* in Expressionsvektoren kloniert und transgen gemacht (Positionen siehe Abbildung 3.31 und Tabelle 3.9). Das Enhancer-Reporter Konstrukt *ombA-CPLZ* wurde von K. Hofmeyer hergestellt (Hofmeyer, 2001) und in dieser Arbeit reinjiziert.

pomb25A

Das Fragment *pomb25A* wurde in den Vektor pGW-attB-lacZ kloniert und über ϕ C31-Integration in den Locus 58A integriert. Das Fragment zeigte ausschließlich in der Flügelimaginalscheibe in der *pouch* bis zum ventralen Rand eine Reporter-gen Expression (Abbildung 3.38 A). In diesem Bereich wird ebenfalls *omb* exprimiert. Die Färbung im posterioren Teil der Antennenscheibe (Abbildung 3.38 B Pfeil) und die andeutungsweise konzentrische Färbung der Beinscheibe (Abbildung 3.38 C) waren auf den Vektorartefakt zurückzuführen.

pomb27A

das Fragment *pomb27A* wurde in den Gateway Expressionsvektor pBPGUw kloniert und über ϕ C31-Integration in den Locus 58A integriert. Die Expression in der Flügelimaginalscheibe zeigte die für diesen Vektor typische Artefaktfärbung der Peripodialmembran (Abbildung 3.38 D). Auch in der Antennenscheibe und der Beinscheibe war die typische Artefaktfärbung zu sehen (Abbildung 3.38 Pfeil E und F). Die Färbung im dorsalen Teil der Augenscheibe war innerhalb der Linie variabel und reichte in manchen Fällen bis zum ventralen Rand.

ombA

Das Fragment *ombA* befand sich in dem P-Element Vektor CPLZ und wurde über P-Element Transformation ins Genom von *Drosophila* integriert. Es wurden sechs unabhängige Linien erhalten von denen die hier abgebildete Linie die stärkste Färbung zeigte. Das Expressionsmuster war vergleichbar mit dem von K. Hofmeyer beschriebenen Expressionsmuster (Hofmeyer, 2001). In der Flügelimaginalscheibe war eine Färbung in einem kleinem Bereich des Notums und im ventralen Flügelrand zu sehen (Abbildung 3.38 G). In der Augenimaginalscheibe war der posteriore Bereich bis zur morphogenetischen Furche gefärbt (Abbildung 3.38 H). Die Färbung im zentralen Bereich der Antennenscheibe war wahrscheinlich aufgelagerten Adepithelialzellen zuzuschreiben. In der Beinimaginalscheibe war ein eine dorsale Färbung und angedeutete Färbung eines konzentrischen Ringes sichtbar (Abbildung 3.38 I). Es wurde gezeigt, dass *ombA* auch in der Embryonalentwicklung ein *omb* ähnliches Expressionsmuster treibt (Hofmeyer, 2001).

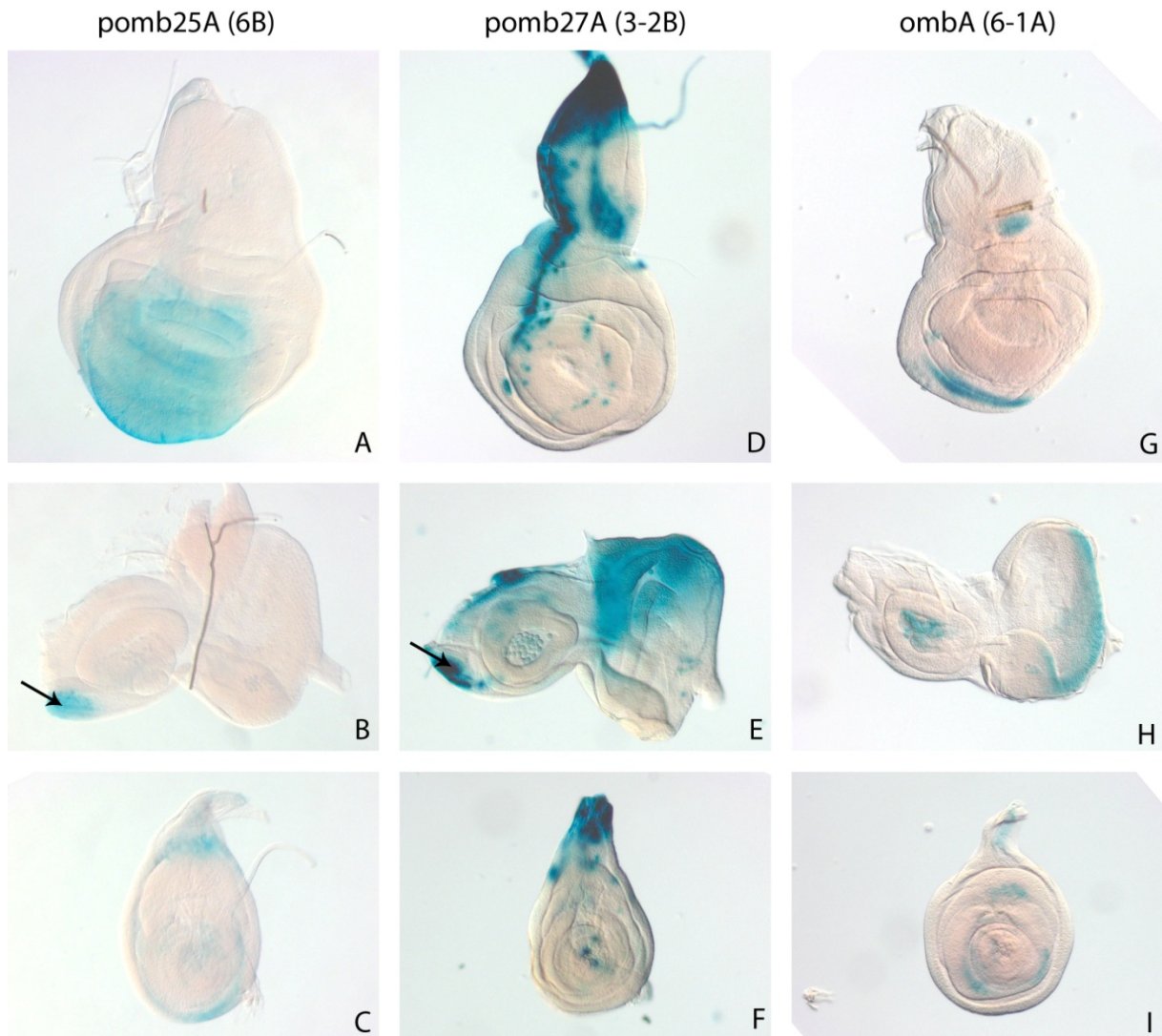


Abbildung 3.38: Expressionsmuster der Enhancer-Reporter Konstrukte *pomb25A*, *pomb27A* und *ombA* in den Imaginalscheiben. In A – C sind Xgal-Färbungen der Imaginalscheiben des Enhancer-Reporter Konstrukts *pomb25A* Linie 6B, in D – F des Enhancer-Reporter Konstrukts *pomb27A* Linie 3-2B und in G – I des Enhancer-Reporter Konstrukts *ombA* Linie 6-1A abgebildet. Dorsal ist oben, anterior links. *pomb25A* wurde für 1,5h, *pomb27A* und *ombA* über-Nacht in Xgal gefärbt.

3.2.1.5 *Wingless-Response-Element in ombJ+K*

In einem Enhancer-Reporter *screen* der *omb* OLR (Hofmeyer, 2001) wurde ein 4kb großes Fragment identifiziert, das Reporterexpression in einem *wg*-ähnlichen Expressionsmuster in den Imaginalscheiben von L3 Larven trieb. Dieses Fragment, *ombK*, liegt in der OLR3, einer Region die sich mehr als 30kb stromabwärts des 3'Endes der *ombTU* befindet, und für die Entwicklung von zehn Interneuronen der Optischen Loben verantwortlich ist (Pflugfelder and Heisenberg, 1995). Hierbei handelt es sich um Riesenneurone des horizontalen und vertikalen Systems (HS und VS Zellen). 5' in *ombK* gelegen befindet sich eine 164bp lange Sequenz, die als imaginales *Wingless response Element*

(WRE) fungiert und Reporterexpression im *wg*-typischen Expressionsmuster trieb. In der Flügelimaginalscheibe wurde das Reporterexpression in einem prominenten Streifen auf der D/V-Grenze und in zwei *pouch*-umrandenden Ringen, sowie einem Streifen in der Notum-Region exprimiert. In der Augenimaginalscheibe fand Reporterexpression am dorsalen und ventralen Rand und in der Antennenscheibe in einem dorsalen Sektor statt. In der Beinscheibe war die Reporterexpression in einem dorsalen Sektor zu sehen. Durch ektopische Expression von *wg* oder anderen Komponenten der *wg*-Signaltransduktionskaskade durch das UAS/Gal4 System, konnte die Reporterexpression in ektopischen Regionen aktiviert werden. Im Gegenzug wurde die Aktivität des Enhancer-Reporter Konstrukts durch die dominant negative Inhibition von Komponenten der *wg*-Signaltransduktionskaskade blockiert. Das 164bp WRE enthält an Position 103 eine konservierte TCF Bindestelle. Für viele WNT Zielgene wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor TCF/LEF-1 am Ende der Signaltransduktionskaskade steht und Zielgenexpression kontrolliert. Mutation der TCF Bindestelle im WRE führte nicht zu völligem Verlust dieser Bindestelle, sondern einem veränderten Expressionsmuster: Die Flügelimaginalscheibe zeigte ein zum *wg*-Expressionsmuster invertiertes Expressionsmuster. Das WRE enthält anscheinend weitere Bindestellen für transkriptionelle Aktivatoren, deren Aktivität bei TCF Bindung unterdrückt oder moduliert wird (Hofmeyer, 2001).

Es wurde gezeigt, dass die Expression des WRE Kontext-abhängig ist (Hofmeyer, 2001). Ein Fusionskonstrukt eines das 164bp WRE beinhaltenden Subfragments von ombK (ombKa 2,4kb) und des im genomischen Locus stromaufwärts angrenzenden 2,5kb Fragments ombJ, zeigte in den Imaginalscheiben, bis auf in den dorsalen und ventralen Rändern der Augenimaginalscheibe, keine Reporterexpression. Dies bekräftigt die Hypothese, dass die Aktivität des WRE im genomischen Kontext modifiziert ist. Enhancerelemente können von Silencerelementen aus benachbarten genomischen Regionen beeinflusst werden. Um festzustellen, ob das 164bp WRE von einem Silencerelement aus nächster Nähe beeinflusst wird, wurde in dieser Arbeit ein Fusionskonstrukt hergestellt, das das 164bp WRE und 269bp der angrenzenden *upstream* gelegenen Sequenz von ombJ enthält. Dieses Fragment wird im Folgenden ombJ^{min}+WRE genannt.

ombJ^{min}+WRE wurde in den Expressionsvektor pHPelican kloniert und in *Drosophila* transgen gemacht. Dabei wurden acht unabhängige Linien erhalten. Zwei der acht Linien zeigten ein schwaches Expressionsmuster. Innerhalb der Linie 6-1A wurden zwei unterschiedliche Expressionsmuster gesehen. Die erste Färbung, die zeitlich kurz nach Injektion des Konstrukts und Etablierung eines homozygoten Stammes durchgeführt wurde (Abbildung 3.39 D-F), zeigte in der Flügelimaginalscheibe in der anterioren Hälfte eine *pouch*-umrandende Färbung. In einer Färbung, die etwa zwei Jahre nach der Injektion an dieser Linie durchgeführt wurde, war die *pouch*-umrandende Färbung nur noch in einem Fleck in der anterioren *hinge*-Region zu sehen. Stattdessen

war ein deutlicher Fleck im Mittelpunkt der *pouch*, in dem Schnittpunkt der A/P- und der D/V-Grenze zu sehen (Abbildung 3.39 A). Im Auge zeigten beide Färbedurchgänge lacZ Expression in den dorsalen Augenrändern. Die Färbung in der Antennenscheibe und im zentralen Bereich der Augenimaginalscheibe in Abbildung 3.39 E sind auf aufgelagerte Adepithelialzellen zurückzuführen (Pfeile). Die Beinscheiben waren in allen Linien ungefärbt. In Linie 7-2aA waren die dorsalen Ränder der Augenscheiben gefärbt (Abbildung 3.39 H).

Das *wg*-ähnliche Reporter-Expressionsmuster des 164bp WRE wurde durch die Anwesenheit der in genomischen Kontext angrenzenden 269bp des *upstream* gelegenen Fragments ombJ zu einem großen Teil unterdrückt.

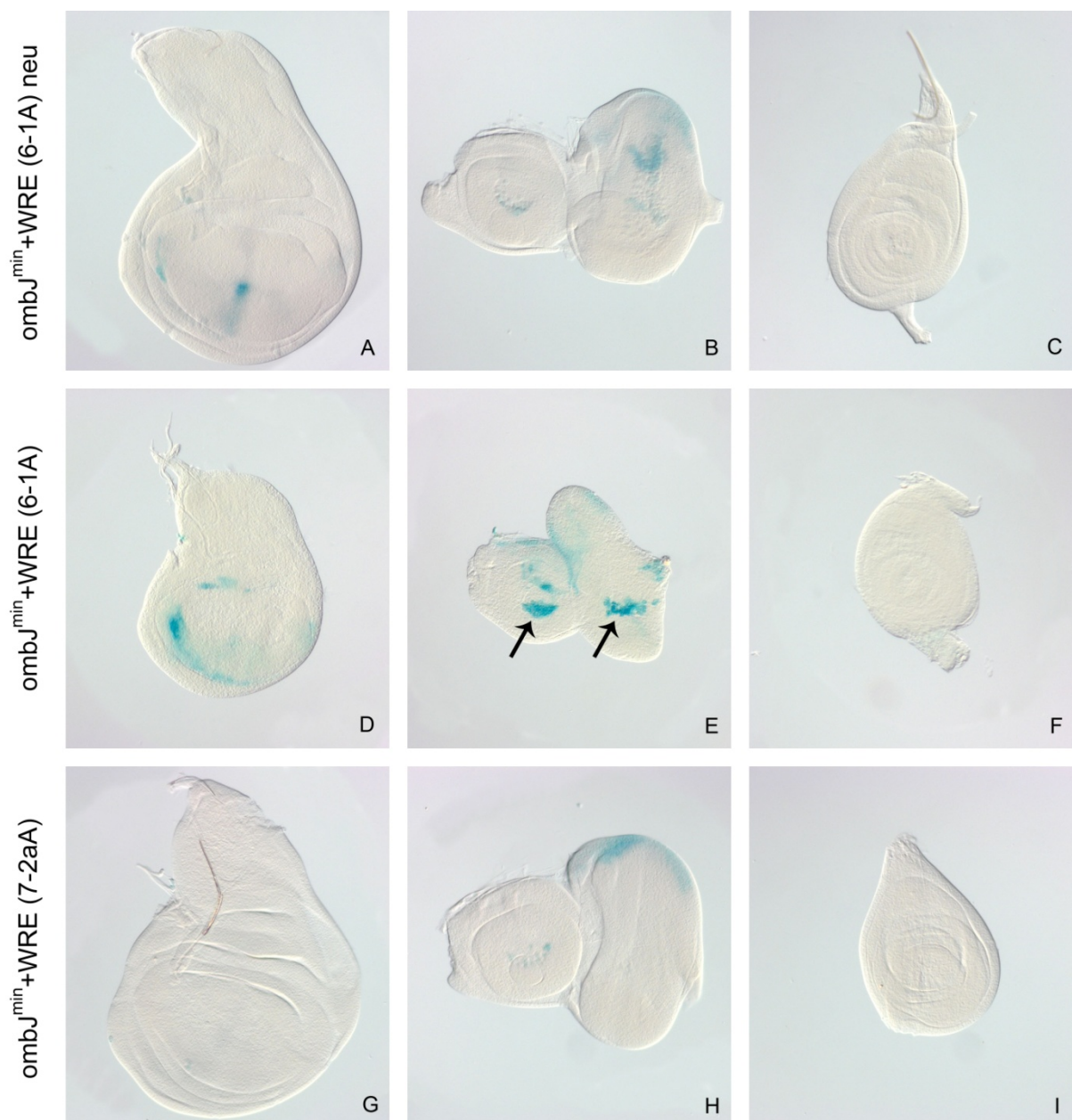


Abbildung 3.39: Expressionsmuster des Enhancer-Reporter Fragments ombJ^{min}+WRE in L3 Imaginalscheiben. Abgebildet sind Xgal-Färbungen der Flügel-, Augen-/Antennen- und Beinimaginalscheiben der Linie 6-1A und 7-

2aA des Enhancer-Reporter Fragments ombJ^{min}+WRE. Pfeile in E deuten auf aufgelagerte Aepithelialzellen hin. Scheiben wurden über Nacht in Xgal gefärbt. Anterior ist links, dorsal ist oben.

3.2.1.6 Diskussion Enhancer-Reporter Konstrukte

Die in dieser Arbeit hergestellten Enhancer-Reporter Konstrukte wurden alle auf regulatorische Eigenschaften in den Imaginalscheiben untersucht. Dabei zeigte ein Großteil der untersuchten Fragmente Reporterexpression in den Flügel-, Augen-/Antennen-, Bein- und/oder Genitalimaginalscheiben. Keines der Fragmente reflektierte dabei exklusiv das endogene *omb* Expressionsmuster. Stattdessen wurde Reporterexpression in Bereichen der endogenen *omb*-Expressionsdomäne, sowie in Bereichen in denen kein endogenes *omb* exprimiert wird, getrieben. Dies zeigt, dass Expressionsmuster von Genen nicht ausschließlich durch additive Wirkung ihrer Enhancer entstehen. Im genomischen Kontext wirken ebenfalls Repressoren auf die Expression eines Gens. Dies wird besonders durch die Zerlegung eines größeren Fragments in mehrere Subfragmente deutlich. Das Fragment ombTU10 zeigte in allen Scheibentypen ein starkes charakteristisches Expressionsmuster (Abbildung 3.32 K – O). Von seinen drei Subfragmenten zeigte lediglich ombTU10A ein vergleichbares Expressionsmuster, ombTU10B trieb fast keine Reporterexpression und ombTU10C in allen Scheiben eine ubiquitäre Expression (Abbildung 3.34). Im Fall der Zerlegung von ombTU12 in Subfragmente wurde deutlich, dass proximal in ombTU12 gelegen das Subfragment ombTU12A eine starke Enhanceraktivität besitzt, die jedoch in ombTU12 durch Sequenzen in ombTU12B oder ombTU12C reprimiert wird (vergleiche Abbildung 3.32 U – Y und Abbildung 3.35). Ein weiteres Beispiel der Reprimierung von Enhanceraktivität im genomischen Kontext zeigte das Fusionskonstrukt ombJ^{min}+WRE (siehe 3.2.1.5). Hier wurde die Aktivität eines Wg-responsiven Elements in den Imaginalscheiben durch in nächster Nähe liegende Sequenzen reprimiert. Diese Fälle verdeutlichen, dass Fragmente, die in einem transgenen Testsystem Enhanceraktivität aufweisen, nicht notwendigerweise im endogenen genomischen Kontext auf gleiche Weise aktiv sind, noch lässt sich so die Notwendigkeit dieser Fragmente bestimmen. Dies müsste durch endogene Deletionen der potentiellen Enhancer untersucht werden.

Dass Enhancer in redundanter Weise wirken, wird deutlich, wenn man die Reporterexpression der Fragmente beispielsweise in der *pouch* der Flügelimaginalscheibe betrachtet. Vier der hier untersuchten Fragmente trieben dort lacZ Expression (ombTU9, ombTU10, ombTU11 siehe Abbildung 3.32 B, K, P; pomb25A siehe Abbildung 3.38 A). Die drei Fragmente ombTU9, ombTU10 und ombTU11 sind in Intron IV lokalisiert, während pomb25A in der *upstream* regulatorischen Region, in der Nähe des von Sivasankaran et al. 2000 identifizierten Flügelenhancer gelegen ist (Abbildung 3.31). Eine Deletion eines großen Bereichs der *upstream* regulatorischen Region, in dem

der Flügelenhancer enthalten war, zeigte nur eine schwache distale Verkürzung des Flügelblatts (Shen et al., 2008). *omb* Nullmutanten haben keine Flügel (Grimm and Pflugfelder, 1996). Daraus ist zu folgern, dass redundante Enhancer das Auftreten eines starken Phänotyps unterdrücken und für eine robuste Genexpression sorgen (Dunipace et al., 2011).

In dieser Arbeit wurden Transgene entweder über P-Elementinsertion (Rubin and Spradling, 1982) oder durch ϕ C31-Integration (Groth et al., 2004) ins Genom integriert. Bei der P-Elementinsertion werden Transgene mit der Hilfe der Transposase zufällig ins Genom integriert. Dabei unterliegen sie in ihrer Aktivität den Einflüssen ihrer genomischen Umgebung (Levis et al., 1985). Diese kann je nach Insertionsort deutlich variieren. Auch die Orientierung des integrierten transgenen Fragments ist in diesem Fall unbekannt. So muss ein consensus Expressionsmuster eines zu untersuchenden Fragments durch den Vergleich mehrerer transgener Linien ermittelt werden. Bei der ϕ C31-Integration von Transgenen wird die aus Phagen stammende ϕ C31-Integrase und deren Fähigkeit zwischen *attB* und *attP sites* zu rekombinieren, genutzt. Es existieren eine Reihe von Fliegenstämmen, die eine *attP site* an einer definierten Position tragen (Bischof et al., 2007). Vektoren, die eine *attB site* tragen, können so gezielt ins Genom integriert werden und die Aktivität ihrer beinhalteten transgenen Fragmente direkt verglichen werden. Ein weiterer Vorteil dieses System ist die höhere Effizienz der Insertionen im Genom als die der P-Elementinsertion.

3.2.2 PRE/TRE Regulation von *omb*

Proteine der Polycomb (PcG) und Trithorax (TrxG) Gruppe halten den transkriptionellen Status eines Gens aufrecht indem sie seine Chromatinstruktur modulieren. PcG Proteine behalten den reprimierten und TrxG den aktivierten Transkriptionsstatus eines Gens durch Bindung von Proteinkomplexen an spezifischen Bindestellen innerhalb des Genlocus bei. Diese Bindestellen werden als *Polycomb/Trithorax response elements* (PRE/TRE) bezeichnet. Die Sequenzmotive der PRE/TREs sind noch nicht genau definiert.

Immunfärbungen an Polytänchromosomen zeigten Bindung von PcG und TrxG Proteinkomplexen im Locus 4C auf dem X-Chromosom (Dejardin et al., 2005; Grimaud et al., 2006). Diese Ergebnisse wurden durch ChIP-on-chip Experimente an verschiedenen *Drosophila*-Zelllinien bestätigt (Schwartz et al., 2010). Hier wurden im *omb*-Locus verstärkt tri-methyliertes Histon H3K27 und gebundene PcG Proteine (Polycomb (Pc) und Enhancer of Zeste (E(z))) detektiert (Abbildung 3.40. PRE/TRE 1). PRE/TREs wurden vor allem im Bereich von +/- 500bp um den Transkriptionsstartpunkt (TSS) gefunden und *omb* deshalb von Schwartz und Kollegen als „*class I high-confidence target gene*“

eingestuft. In einer weiteren Studie von Oktaba et al. (2008) wurden PcG Zielgene mit verstärkter Bindung von PcG-Proteinkomplexen in einem Bereich von +/- 1kb um den TSS assoziiert. Auch im *omb*-Locus wurde in diesem Bereich gebundenes PhoRC (Pho repressive complex), eine zur transkriptionellen Reprimierung essentielle Untereinheit eines PcG-Proteinkomplexes, detektiert (Abbildung 3.40 PRE/TRE 1). Eine weitere PhoRC Bindedomänen wurde in Intron I in einem 5kb großen Bereich vor Exon II gefunden (Abbildung 3.40 PRE/TRE 2A). Mindestens 1062bp vor Exon II in *omb* befindet sich ein alternativer TSS (persönliche Mitteilung Gert O. Pflugfelder), was die These von Oktaba et al., dass PcG Zielgene in Nähe des Promotors PcG Proteine binden, unterstützt.

In einem Genom weiten *in silico* screen nach PRE/TREs (Ringrose et al., 2003) wurden in *omb* zwei potentielle PRE/TREs gefunden (Abbildung 3.40 PRE/TRE 2B und PRE/TRE 3). Diese wurden durch einen bioinformatischen Algorithmus, basierend auf bekannten etablierten PcG und TrxG Bindedomänen und Spezifität der PcG und TrxG Proteine, identifiziert und mit einem Wert (*score*) bewertet. Ein für *omb* vorhergesagtes PRE/TRE befand sich in Intron I, was sich mit den Ergebnissen von Oktaba et al. deckt. Ein weiteres PRE/TRE wurde in Intron IV vorhergesagt. Dieses PRE/TRE hat einen höheren *score* als das in Intron I, jedoch gibt es hierfür keine CHIP-Evidenz.

Von jedem experimentell oder bioinformatisch bestimmtem PRE/TRE existieren transgene Fliegenlinien, die das jeweilige PRE/TRE als Enhancer-Reporter Konstrukt beinhalten. Abbildung 3.40 zeigt die Lage der PRE/TREs in *omb* und die PRE/TRE enthaltende Fragmente. PRE/TRE 1 ist zum größten Teil im Fragment *pomb13* enthalten und zu einem kleinen Teil in *pomb12*. PRE/TRE 2A ist in den Fragmenten *pomb20* und *pomb27-A* enthalten, PRE/TRE 2B in *pomb27-A* und PRE/TRE 3 im Fragment *ombTU9*. Die transgenen Linien *pomb27-A* und *ombTU9* wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Eine transgene Linie, die einen 1,7kb stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes liegenden Bereich enthält, wurde von Tsai et al. (1997) hergestellt (im Folgenden als Linie GOP 510 bezeichnet). Diese Linie enthält Teile der identifizierten PRE/TRE1. Als einzige dieser transformanten Linien, zeigen Fliegen dieser Linie „*pairing-sensitive silencing*“ (PSS). Hierbei handelt es sich um ein Phänomen, bei dem das in den transformanten Fliegen enthaltene *w⁺*-Reporter gen im homozygoten Zustand durch das Zusammenwirken homologer Sequenzen in *trans* reprimiert wird (Pirrotta, 1999). Dies äußert sich in hellerer bzw. im kompletten Verlust der roten Augenfarbe. Die Paarung der in 510 enthaltenen PRE/TREs in *trans* verstärkt den reprimierenden Effekt dieser PRE/TREs.

Im Rahmen einer Bachelorarbeit in der Arbeitsgruppe wurde die Insertion der Linie 510 durch eine inverse PCR auf den Chromosom 2L in der Position 851 079 kartiert (Kayar, 2012). Dies entspricht einer Position wenige Basenpaare stromabwärts des Gens *drongo* und ca. 300bp stromaufwärts des Gens CG4291. CHIP Experimente an Polytänchromosomen der transgenen Linien und Mutagenese dieser PRE/TREs sollen Aufschluss über die Bedeutung dieser Bindestellen geben.

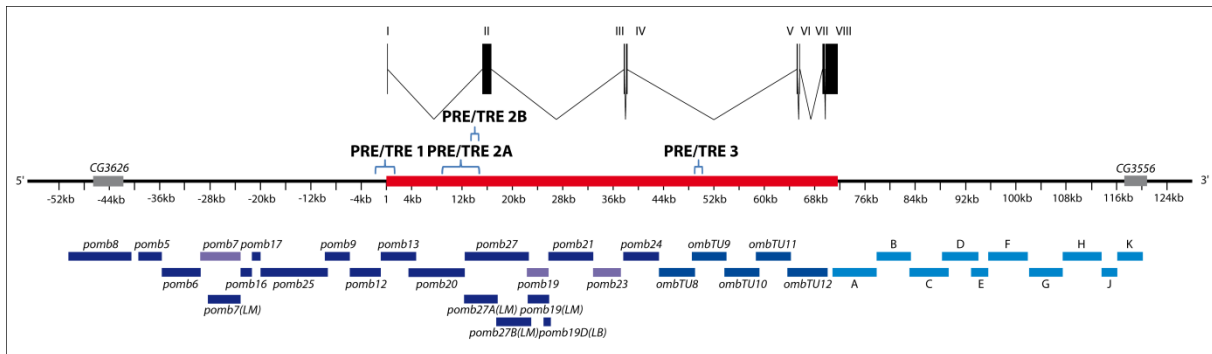


Abbildung 3.40: Lage der experimentell oder bioinformatisch bestimmten PRE/TREs im *omb*-Locus. PRE/TRE 1 entspricht der von Schwartz et al. (2010) in ChIP-on-chip und von Oktaba et al. (2008) in ChIP Experimenten detektierten PRE in der Nähe des TSS. PRE/TRE 2A entspricht der von Oktaba et al. (2008) in Intron I identifizierten PRE/TRE. PRE/TRE 2B und PRE/TRE 3 entsprechen den von Ringrose et al. (2003) bioinformatisch bestimmten PRE/TREs.

3.2.3 Selbstregulation von *omb*

Der Transkriptionsfaktor *omb* bindet, wie andere Tbx-Proteine, an das *Tbx binding element* (TBE). Durch die Identifikation von TBEs im *Drosophila* Genom sollten Hinweise auf potentielle Zielgene von *omb* gegeben werden. In einer bioinformatischen Suche nach TBEs wurden in *omb* sechs hochkonservierte TBE sites identifiziert (Binbas, 2009). Abbildung 3.41 zeigt die Position der TBEs in *omb* und die TBE-enthaltende Enhancer-Reporter Fragmente. *Omb* könnte durch Bindung an seine internen TBE sites seine Transkription regulieren. Transgene Fliegen der TBE-enthaltende Enhancer-Reporter Fragmente wurden in *omb*-mutanten Hintergrund gebracht und auf eine Veränderung des Reportergenexpressionsmusters in den Imaginalscheiben hin untersucht. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen existierten nur die Linien pomb27B (TBE17) und ombTU12 (TBE20), deren Expressionsmuster im Folgenden beschrieben werden.

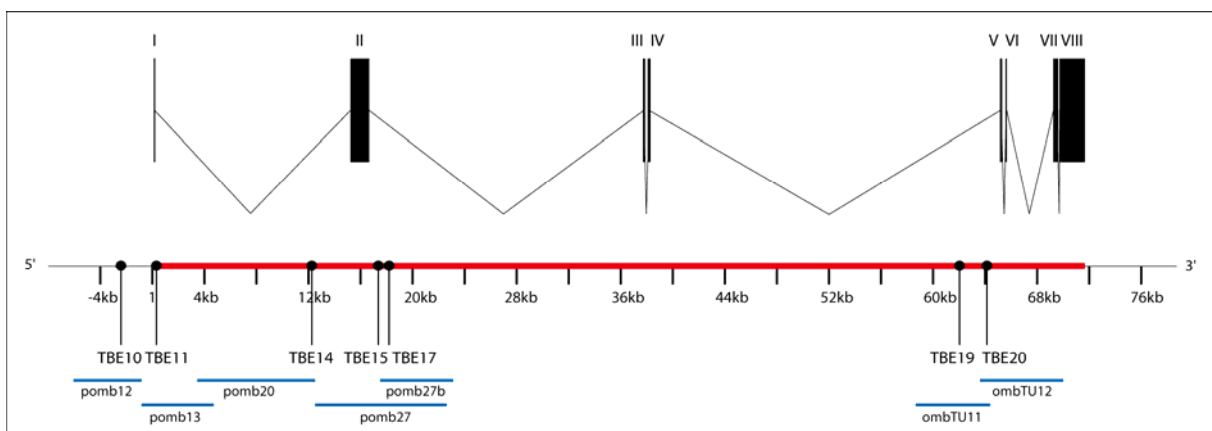


Abbildung 3.41: Positionen der hochkonservierten TBEs im *omb*-Locus. Bioinformatisch identifizierte TBEs in *omb* und die sie enthaltende Enhancer-Reporter Fragmente sind im Schema abgebildet. TBEs wurden im Bereich +/- 50 kb der *omb* Transkriptionseinheit mit der Positionsgewichtsmatrix TBE1051124 mit einem *cut-off*

Wert von 8 gesucht. Fünfundzwanzig TBEs wurden identifiziert. In die Abbildung wurden nur die TBEs aufgenommen, bei denen der mittlere score über alle zwölf im Jahr 2010 sequenzierten *Drosophila* Spezies grösser als 8.0 war.

pomb27B (TBE17) im *omb*⁻ Hintergrund

Das Fragment *pomb27B* zeigte, außer der unspezifischen Färbung der *hinge* Region der Flügelimaginalscheibe (Abbildung 3.42 A), weder im Wildtyp noch in der Mutante ein charakteristisches Expressionsmuster. Bei der Färbung in der Augenscheibe handelte es sich um aufgelagerte Adepithelialzellen. In der mutanten Flügelscheibe war die Färbung der *hinge* Region nicht zu sehen, was durch Verlust des Gewebes zu erklären sein könnte (Abbildung 3.42 D).

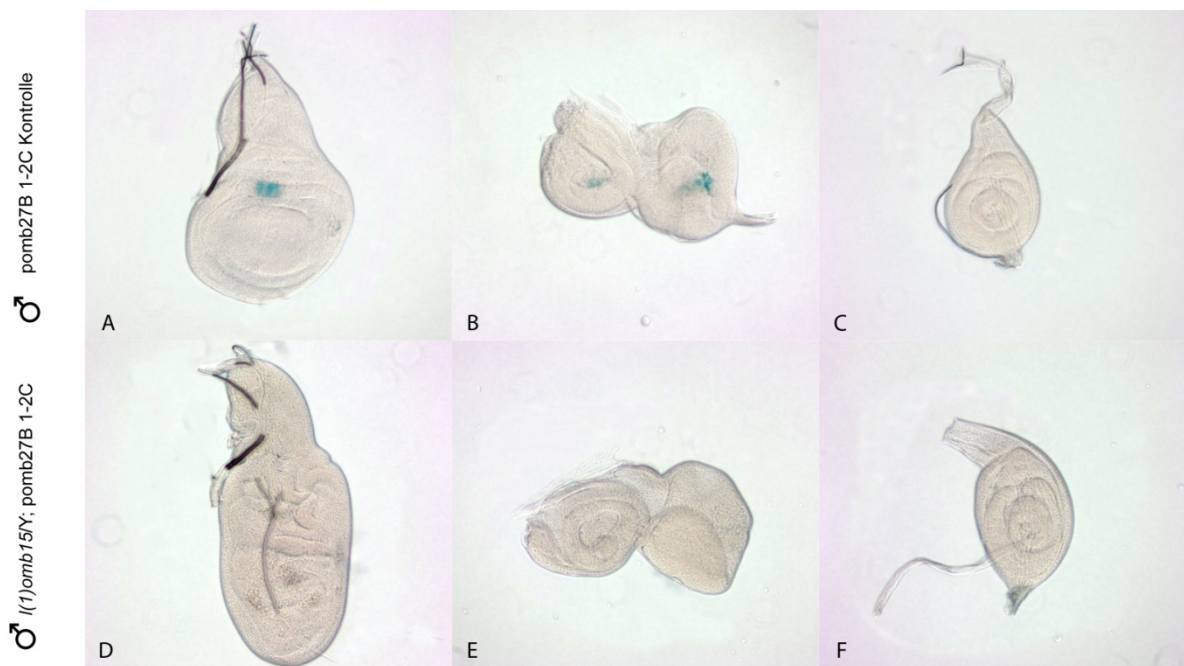
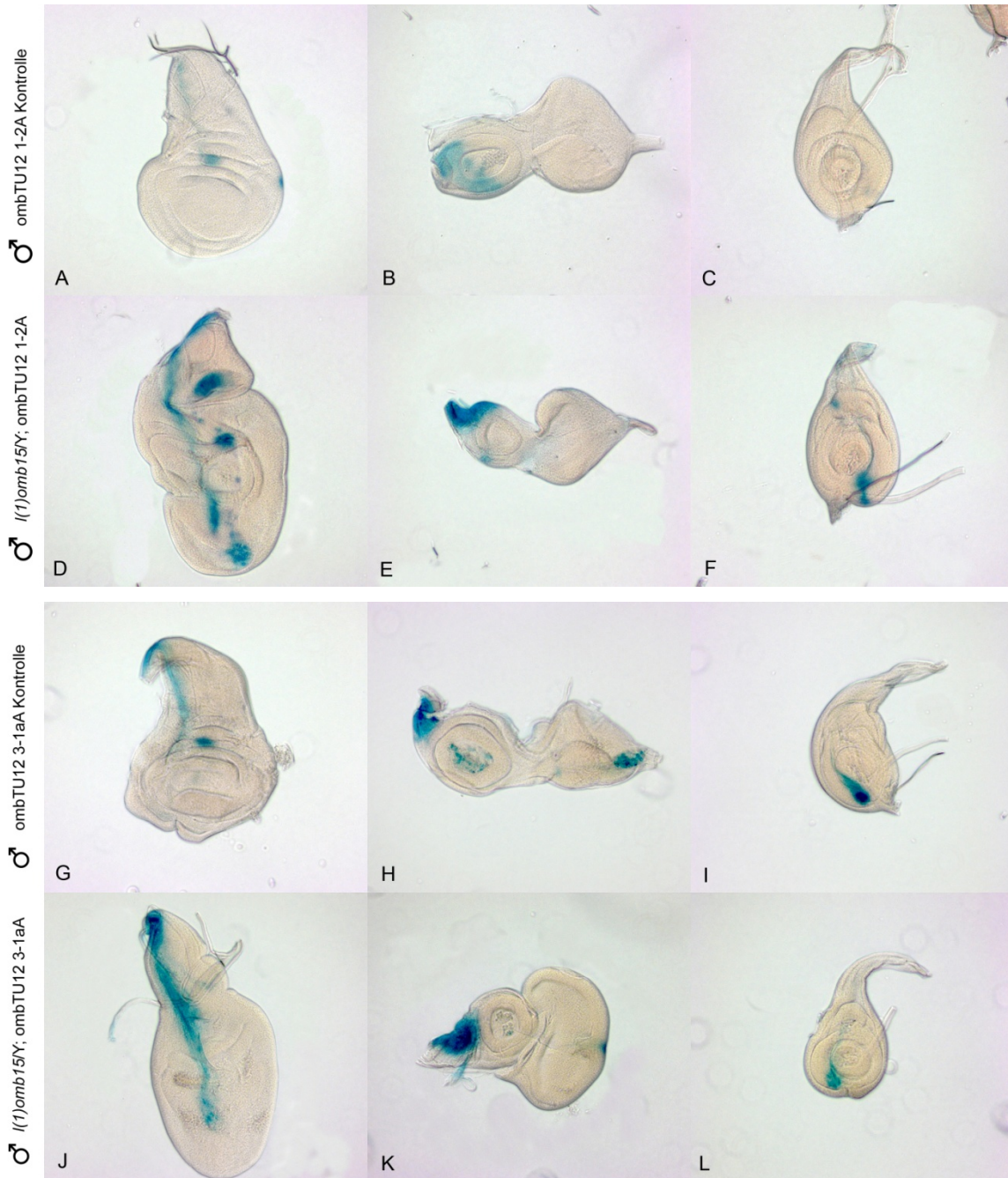


Abbildung 3.42: *pomb27B* (TBE 17) im *omb*-mutanten Hintergrund. Xgal-Färbungen der *pomb27B* Linie 1-2C an wildtypischen (Kontrolle; A – C) und *omb*-mutanten Imaginalscheiben (*pomb27B* 1-2C/*l(1)omb*¹⁵; D – F).

ombTU12 (TBE20) im *omb*⁻ Hintergrund

Es wurden drei *ombTU12* Linien in *omb*-mutanten Hintergrund gebracht. *ombTU12* zeigte in der Flügelimaginalscheibe eine Färbung entlang der A/P-Grenze in der Peripodialmembran (Abbildung 3.33). In den mutanten Flügelscheiben konnte man in allen drei Linien eine Verlängerung und eine Intensivierung dieser Expression sehen (Abbildung 3.43 D, J, P). In Linie 1-2C könnte die zusätzliche Färbung in der *hinge* durch eine Duplikation dieser Region entstanden sein. Auch Linie 6-1aA könnte eine teilweise duplizierte *hinge* aufweisen. In den Augenscheiben war keine charakteristische Färbung zusehen. Die verstärkte Färbung der mutanten Augenscheibe der Linie 6-1aA kam durch

aufgelagerte Adepithelialzellen zustande. In allen mutanten Beinscheiben, aber auch in der Kontrolle, war eine ventrale Färbung zu sehen.



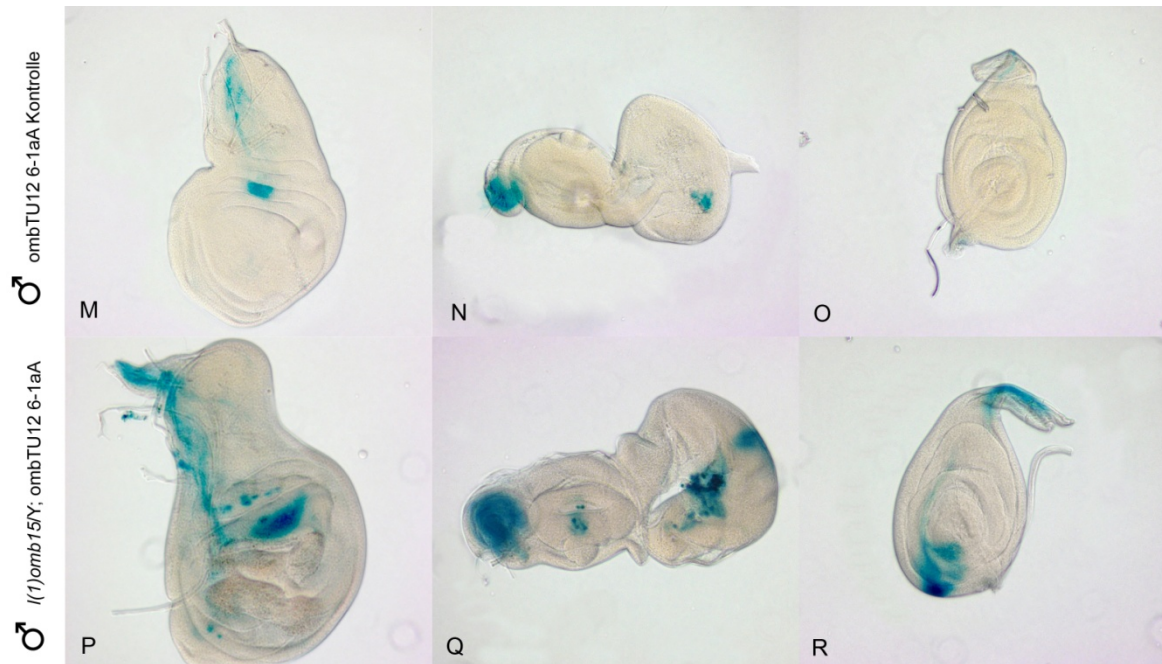


Abbildung 3.43: ombTU12 (TBE 20) im *omb*-mutanten Hintergrund. Xgal-Färbungen an den Linien 1-2C (A – F), 3-1aA (G – L) und 6-1aA (M – R) an wildtypischen (Kontrolle) und *omb*-mutanten (*ombTU12/l(1)omb¹⁵*) Imaginalscheiben.

Weibliche Genitalscheiben der Enhancer-Reporter Linie *ombTU12* zeigten eine starke *lacZ*-Expression (Abbildung 3.32 X). *Omb* wird in weiblichen Genitalscheiben im *female genital primordium* (FGP), eine Vorläuferstruktur der weiblichen Terminalia (A8), exprimiert. Antikörperfärbungen gegen β Gal und *Omb* in der weiblichen Genitalscheibe der *ombTU12* Linie zeigten, dass in den Bereichen in den *Omb* exprimiert wird die Expression von β Gal ausgespart ist (Abbildung 3.44). Dies könnte darauf hindeuten, dass *Omb* in weiblichen Genitalscheiben seine Transkription über die in *ombTU12* enthaltene TBE *site* selbst reprimiert. Um dies zu verifizieren, müssten Antikörperfärbungen an *omb*-mutanten Genitalscheiben durchgeführt werden.

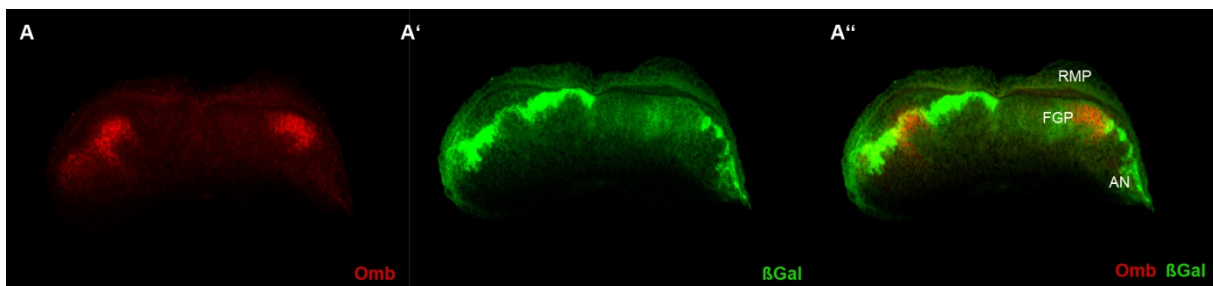


Abbildung 3.44: ombTU12 Antikörperfärbung gegen *Omb* und β Gal an einer weiblichen Genitalscheibe. Ventrale Ansicht einiger confocaler Sektionen. In (A) ist die Expression von *Omb* (rot) in (A') die Expression von β Gal (grün) und in (A'') beide Expressionen zu sehen. *Omb* wird im *female genital primordium* (FGP) exprimiert. In diesen Bereichen ist die β Gal-Expression reduziert. RMP: *repressed male primordium*; AN: *anal primordium*. Hier ist Line *ombTU12* 1-2A abgebildet.

3.2.3.1 Diskussion

Die Anwesenheit vieler konservierter TBEs im *omb* Locus gibt einen Hinweis darauf, dass *Omb* über einzelne Enhancer autoregulatorisch wirken könnte. Die hier untersuchten TBEs TBE17 und TBE20 scheinen nicht an der Autoregulation von *Omb* in den Flügel-, Augen-/Antennen- oder Beinimaginalscheiben beteiligt zu sein. In weiblichen Genitalscheiben könnte *Omb* über das in *ombTU12* enthaltene TBE20 eine autoregulatorische Wirkung haben. Eine Mutagenese der TBE20 oder Antikörper-Doppelfärbungen des Fragments *ombTU12Amin-deltaTBE20* (siehe 3.1.4.1) könnten über dessen Bedeutung Aufschluss geben.

In den letzten Jahren wurden vom Janelia Farm Institut eine Sammlung von Enhancer-Reporter Linien hergestellt (Pfeiffer et al., 2008). Diese Sammlung umfasst knapp 7000 Stämme. Diese Stämme beinhalten Loci von ca. 1000 Genen, die Expression im adulten Gehirn zeigen, unter anderem *omb*. Diese Stämme könnten genutzt werden um die Bedeutung der bisher nicht untersuchten TBEs in *omb* auf autoregulatorische Merkmale zu untersuchen.

Desweiteren müsste die autoregulative Wirkung von *omb* in anderen Entwicklungsstadien als im Larvalstadium, beispielsweise im Embryonalstadium, untersucht werden.

3.2.4 Molekulare Charakterisierung der *bifid*-Insertion

In den ersten 4kb der *ombTU* wird eine etwa 12kb große Insertion vermutet, die für den *bifid* (*bi*) Phänotyp verantwortlich sein könnte (persönliche Kommunikation G. Pflugfelder). Um die Region der Insertion zu bestimmen, wurden PCRs mit Primerpaaren, die innerhalb der ersten 4kb überlappende Amplifikate ergeben, an DNA von *bi*-Tieren durchgeführt (Abbildung 3.45). Primerpaar 1002/1003 ergab nur auf Kontroll-DNA, jedoch nicht auf *bi*-DNA ein PCR Produkt. Für Primerpaar 1004/1005 und 1006/1007 wurden die erwarteten Produkte erhalten. Daraus wurde geschlossen, dass die *bi*-Insertion in dem Bereich zwischen Primerpaar 1002 und 1004 liegen muss. Dies entspricht dem Bereich zwischen 985bp und 1824bp der *ombTU*.

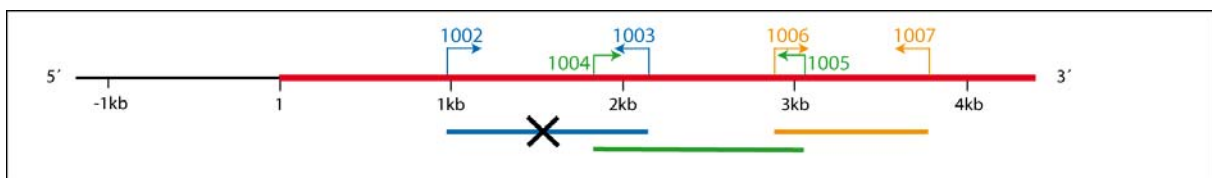


Abbildung 3.45: Kartierung der 12kb großen *bi*-Insertion in den ersten 4kb der *ombTU*. Mit Primerpaaren, die überlappende Amplifikate bilden und innerhalb der ersten 4kb der *ombTU* binden, wurden PCRs an DNA von *bi*-Tieren durchgeführt. Primerpaar 1002/1003 ergab an *bi*-DNA im Gegensatz zu den anderen Primerpaaren nicht das erwartete Produkt. Hieraus kann geschlossen werden, dass die *bi*-Insertion in dem Bereich zwischen Primer 1002 und 1004 liegen muss.

Zahlreiche Versuche, den die Insertion beinhaltenden Bereich zwischen 1002 und 1003 mit verschiedenen Long Range Polymerasen zu amplifizieren, scheiterten. Deshalb wurde, um den genauen Insertionsort zu bestimmen, die Methode der inverse PCR angewandt. Hierzu wurde *bi*-DNA mit dem Restriktionsenzym HpyCH4IV, das nicht in dem Bereich zwischen Primer 1002 und 1004 schneidet, verdaut und anschließend ligiert. Mit dem Primerpaar 1016/1002 wurde auf der linken Seite der Insertion und mit dem Primerpaar 1017/1018 auf der rechten Seite der Insertion eine inverse PCR durchgeführt (Abbildung 3.46). Primerpaar 1016/1002 ergab ein 600bp großes Produkt und Primerpaar 1017/1018 ein 800bp großes Produkt. Beide wurden im Topo-Vektor subkloniert und jeweils mit den Standard Sequenzierungsprimern *m13forward* und *m13reverse* sequenziert. Das von 1016/1002 erhaltene 600bp Produkt bestand aus einem Fragment, das von beiden Seiten von Primer 1016 flankiert wurde und auf unspezifischer Bindung des Primers im Genom beruht. Die Sequenzierung des von Primerpaar 1017/1018 resultierenden 800bp Produkts ergab, dass sich 551bp stromaufwärts von Primer 1018, also an Position 1301bp der ombTU, eine 132bp lange unbekannte Sequenz befand (Sequenz siehe 7.4). Eine „*Blast*“-Analyse der 132bp langen unbekannt Sequenz identifizierte diese als ein Teil eines 412gypsy LTRs. Dies induzierte, dass hier in das Ende eines 412gypsy LTRs gelesen wurde. Zur Identifikation des 412gypsy LTRs wurden PCRs mit Primerpaaren durchgeführt, die einmal 5' der Insertion und im 412gypsy LTR (1025/1016) und einmal im 412gypsy LTR und 3' der Insertion (1027/1028) binden. Für Primerpaar 1027/1028 wurde das erwartete PCR Produkt erhalten. Mehrfache Versuche dieses Fragment im Topo-Vektor zu subklonieren scheiterten, somit konnte es bis jetzt noch nicht sequenziert werden.

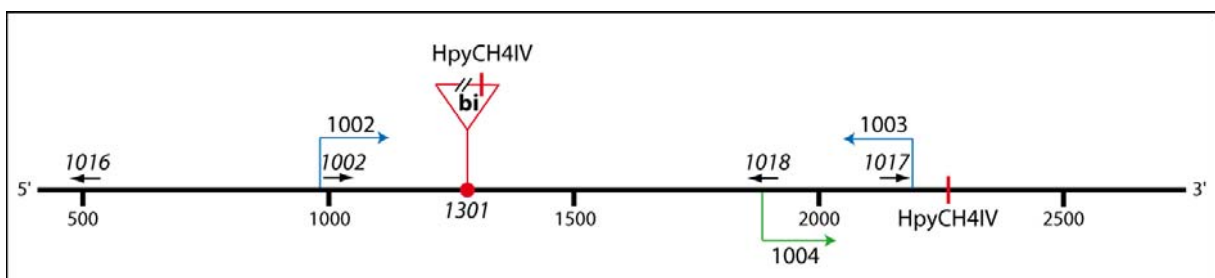


Abbildung 3.46: Durch inverse PCR bestimmter Ort der *bi*-Insertion. Isolierte *bi*-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym HpyCH4IV verdaut und ligiert. HpyCH4IV schneidet nicht in dem Bereich zwischen Primer 1002 und 1004. An der ligierten DNA wurde mit den Primerpaaren 1016/1002 und 1018/1017 inverse PCRs durchgeführt. Sequenzierung des von Primerpaar 1018/1017 erhaltenen PCR Produkts ergab, dass an Position 1301 der ombTU ein 412gypsyLTR integriert ist.

3.2.4.1 Diskussion

Der *bifid* Phänotyp zeichnet sich durch eine distale Verkürzung des Flügelblattes, sowie einer Fusion aller fünf longitudinalen Flügelvenen in einem Venenstrang im Flügelgelenk aus. Es handelt sich um

ein hypomorphes Allel, bei dem die *omb* Expression im Gegensatz zum Wildtyp in der Flügelimaginalscheibe reduziert ist (Shen et al., 2008). Die molekulare Position der *bi*-Insertion wurde hier erstmals genau bestimmt und die ersten Hinweise auf die Art der Insertion erlangt. Bei dem identifizierten 412gypsy LTR handelt es sich um ein Retrotransposon (Kim et al., 1994). Gypsy Elemente beinhalten Bindestellen für Suppressor of Hairy-wing [su(Hw)] Protein, das die Aktivität von transkriptionellen Enhancern blockieren kann. Somit können Gypsy Elemente in den transkriptionellen Status eines benachbarten Gens eingreifen (Geyer et al., 1988; Tsai et al., 1997). Ausschließlich Enhancerelemente die distal zur *su(Hw)* Bindestelle liegen werden blockiert (Dorsett, 1993; Geyer and Corces, 1992). Eventuell wirkt das in der *omb*TU an Position 1301 inserierte Gypsy Element reprimierend auf die in der *upstream* regulatorischen Region liegenden Flügelenhancer und erzeugt somit den *bi*-Phänotyp. Dieser Phänotyp weist große Ähnlichkeit mit dem Phänotyp der Deletion der *upstream* regulatorischen Region auf (Shen et al., 2008). Ob es sich jedoch bei der *bi*-Insertion tatsächlich um das 412gypsy LTR handelt, muss noch durch Sequenzierung der gesamten Insertion bestätigt werden.

3.2.5 Versuche zur Deletion in der OLR von *omb*

Im Rahmen zweier Bachelorarbeiten in der Arbeitsgruppe (Epple, 2011; Schrick, 2011) wurde der Versuch unternommen endogene Deletionen durch homologe Rekombination in der *downstream* Region von *omb* zu erzeugen. Eine Deletion sollte proximal in der OLR wenige kb hinter der *omb*TU liegen und mit 5846bp zum größten Teil das Enhancer-Reporter Fragment *ombA* umfassen. *ombA* treibt Expression in den optischen Loben des larvalen ZNS, sowie in einer Region der Augenimaginalscheibe posterior zur morphogenetischen Furche (Abbildung 3.38 H) (Hofmeyer, 2001). Demnach wurde die angestrebte Deletion Δ *ombA* genannt. Die zweite Deletion, Δ *ombJ+K*, sollte distal in der OLR über 100kb vom Ende der *omb*TU entfernt erzeugt werden und einen 2865bp großen Bereich der Enhancer-Reporter Fragmente *ombJ* und *ombK* umfassen (Abbildung 3.47). Die Orientierung der einzufügenden attP sites wurde in entgegengesetzter Richtung gewählt, so dass der dazwischenliegende Bereich später über *Recombinase Mediated Cassett Exchange* (RMCE) (Bateman et al., 2006) entfernt werden kann. Die Deletionskonstrukte und die transgenen Donorlinien wurden im Rahmen einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe hergestellt (Hau, 2010). Hierfür wurde, wie in Kapitel 3.1.5.1 beschrieben, der Vektor pGX-attP verwendet.

Um die positionsabhängige Toxizität des im Deletionskonstrukt enthaltenen UAS-*rpr* zu ermitteln, wurden die Donorlinien mit den ubiquitären Gal4-Treibenlinien GOP 610 und GOP 613 gekreuzt. Bei einer 100%igen Toxizität wäre zu erwarten, dass keine der das Donorkonstrukt enthaltenden, und

somit rotäugigen Tiere überleben. Die Toxizitätstests der Donorlinien beider Deletionskonstrukte ergaben eine hohe Rate an *rpr*-positiven überlebenden Tieren. Für $\Delta ombJ/K$ Donorlinien reichte der Anteil an *rpr*-positiven Tieren bis zu 50% der Nachkommen. $\Delta ombA$ Donorlinien wurden homozygot in die Toxizitätstests eingesetzt, wobei erwartet wurde, dass alle Tiere der F1-Generation letal sein würden. Erzielt wurde allerdings eine hohe Anzahl *rpr*-positiver Nachkommen, bei 25°C wie bei 29°C. Sequenzierung des Donorkonstrukts $\Delta ombA$ zeigte, dass das *rpr*-Gen fehlerfrei im Konstrukt enthalten war, jedoch die UAS-Sequenz beschädigt war. Anstelle der erwarteten fünf UAS-Kassetten, enthielt das Donorkonstrukt nur zwei UAS-Kassetten (Abbildung 3.48). Diese reichten anscheinend nicht aus, um durch Bindung von Gal4 *rpr* zu aktivieren. Die Erzeugung der Deletion *ombA* wurde deshalb nicht in Angriff genommen. Das $\Delta ombJ/K$ Deletionskonstrukt wurde nicht auf fehlerhafte Sequenzen untersucht. Im Rahmen der Bachelor-Arbeiten gelang es nicht die endogene Deletion *ombJ+K* zu erzeugen.

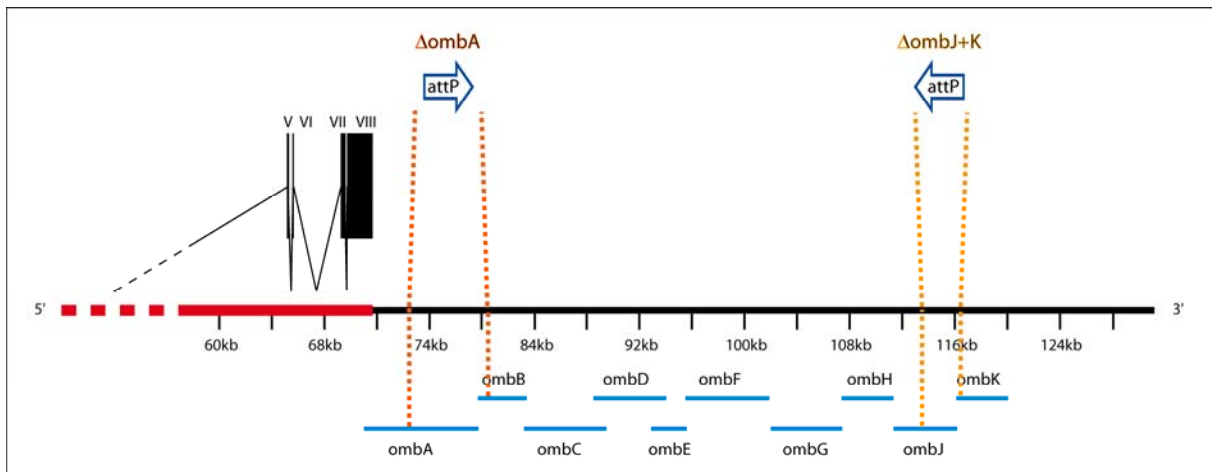


Abbildung 3.47: Endogene Deletionen in der OLR von *omb*. Zwei unabhängige Deletionen in der OLR von *omb* sollten durch homologe Rekombination erzeugt werden. $\Delta ombA$ mit ca. 5,8kb und $\Delta ombJ+K$ mit ca. 2,8kb.

Sequenzausschnitt pGW-attP: UAS-Anteil

```

1  ggcgcgccta ggcctattcg aatctgcagc tcgagtgcag gtcggagtac
51  tgcctccga gcggagtaact gtccctccgag cggagtaactg tcctccgagc
101 ggagtaactgt cctccgagcg gagtaactgtc ctccgagcgg agactctag

```

<u>ggcgcgcc</u>	AscI
<u>cggagta</u>	UAS-Sequenz
unterstrichen	im <i>ombA</i> -Deletionskonstrukt enthaltene Sequenz

Abbildung 3.48: UAS-Sequenz des pGW-attP Deletionsvektors. Der UAS-Anteil des pGW-attP enthält fünf Wiederholungen der UAS-Sequenz (pink). Stromaufwärts der hier abgebildeten Sequenz liegt die 3'MCS und stromabwärts das *reaper*-Gen (gesamte Sequenz siehe 7.5). Im *ombA*-Deletionskonstrukt wurde die *dsh*-Region an ihrem 3'-Ende über die AscI-Schnittstelle (grün) in die 3'MCS des Vektors ligiert (Hau, 2010). Die im *ombA*-Deletionskonstrukt enthaltene Sequenz ist hier unterstrichen. Es fehlen Teile der zweiten Wiederholung der UAS-Sequenz, sowie die dritte und vierte Wiederholung.

3.2.5.1 Diskussion

Die Methode zur Erzeugung endogener Deletionen durch homologe Rekombination wird im Kapitel 4.1.6.1 diskutiert.

Der UAS-*rpr* Anteil des zur homologen Rekombination verwendeten Vektors wurde von Huang et al. (2008) zur negativen Selektion von nicht-gerichteten Rekombinationen eingeführt (siehe Abbildung 3.19). Ektopische Expression des Zelltodgens *rpr* führt zur Letalität (White et al., 1996). Bis dahin repräsentierten 95-99,9% der potentiell rekombinanten Fliegen falsch positive Ereignisse (Huang et al., 2008). Bei korrekter homologer Rekombination am Ziellocus geht UAS-*rpr* verloren. Findet aber eine ungerichtete Insertion statt, ist es wahrscheinlich dass der UAS-*rpr* Anteil integriert wird. Durch Kreuzung mit ubiquitären Gal4-Linien können diese eliminiert werden. Für die Letalität sind die Position des UAS-*rpr* Transgens im Genom, sowie die Stärke seiner Aktivierung ausschlaggebend. Wie hier gezeigt wurde, sind zwei intakte UAS-Sequenzen nicht ausreichend um die durch *rpr* erzeugte Letalität zu erreichen.

3.2.6 Molekulare Charakterisierung der Heindel-Linie 667 und Untersuchung ihrer Expression in Augenimaginalscheiben

In der Tbx2 Unterfamilie der Tbx-Gene stellen *omb* und seine Vertebraten Homologe Tbx2 und Tbx3 transkriptionelle Repressoren dar (Porsch et al., 2005; Rowley et al., 2004). Weitere Gene der Tbx2 Unterfamilie stellen transkriptionelle Aktivatoren dar. Die meisten der bislang untersuchten Tbx-Proteine binden an eine der aus zwei palindromischen *half-sites* (2 x 10bp) bestehenden consensus Sequenz, das *Tbx-binding element* (TBE). In einer Diplomarbeit (Heindel, 1998) wurden Enhancer-Reporter Vektoren, mit denen eine transkriptionsstimulierende Wirkung von Tbx-Proteinen in Abhängigkeit der Struktur des TBE untersucht werden konnten, hergestellt. Als Transformationsvektor wurde pX27, der *lacZ* als Reportergen unter der Kontrolle eines hsp70 Promotors trägt, verwendet (Segalat et al., 1994). Vier verschiedene Variationen der TBE consensus Sequenz wurden in den Vektor kloniert: Ein einzelnes Halbpalindrom (*half-site*) in der Orientierung TTTCACACCT, das gleiche Halbpalindrom in umgekehrter Orientierung AGGTGTGAAA, eine einzige Kopie des Palindroms TTTCACACCT/AGGTGTGAAA und zwei Kopien des Palindroms. Untersuchungen der Imaginalscheiben der transformanten Linien sollten zeigen, ob Tbx-Proteine in ihrer endogenen Expressionsdomäne durch Bindung an artifizielle minimale TBEs in der Lage sind die Transkription des Reportergens zu aktivieren. Xgal-Färbungen der Linie 667, die das einzelne Halbpalindrom in der Orientierung TTTCACACCT enthielt, zeigten in den Augenimaginalscheiben ein *omb*-ähnliches Expressionsmuster. Der optische Stiel, der Bereich posterior zur morphogenetischen Furche und die

dorsalen und ventralen Augenränder waren gefärbt (Eichinger, 2011). *Omb* wird in der Augenimaginalscheibe in basalen subretinalen Gliazellen exprimiert. Um zu klären ob *lacZ* in der Linie 667 in Gliazellen exprimiert wird, wurden Antikörperfärbungen gegen β -Galactosidase und *reversed-polarity (repo)* als glialen Marker durchgeführt. Das in der Xgal-Färbung gesehene Expressionsmuster konnte durch die Antikörperfärbung reproduziert werden. Diese zeigte auch, dass die *lacZ*-Expression durch das einzelne Halbpalindrom ausschließlich in Gliazellen getrieben wurde. In zwei der drei hier abgebildeten Scheiben ist auch eine *lacZ*-Expression in Gliazellen des ‚Bolwigschen‘-Nerven zu sehen. Jedoch zeigten nicht alle Gliazellen, posterior zur morphogenetischen Furche und im ‚Bolwigschen‘-Nerven, *lacZ*-Expression (Abbildung 3.49). Um auszuschließen, dass *lacZ* durch benachbarte Enhancer am Insertionsort des P-Elements, die zu glialen Genen gehören, getrieben wurde, wurde der Insertionsort durch eine iPCR bestimmt. Die Sequenzanalyse zeigte, dass der Insertionsort auf dem Chromosom 3L an Position 11,039,941 lag und sich damit stromaufwärts der Transkriptionsstartpunkte von RA und RB des Gens CG43693 befand. Bei CG43693 handelt es sich um ein Protein-kodierendes Gen dessen molekulare und biologische Funktion unbekannt ist. Sein Expressionsmuster soll noch durch *in situ* Hybridisierung bestimmt werden

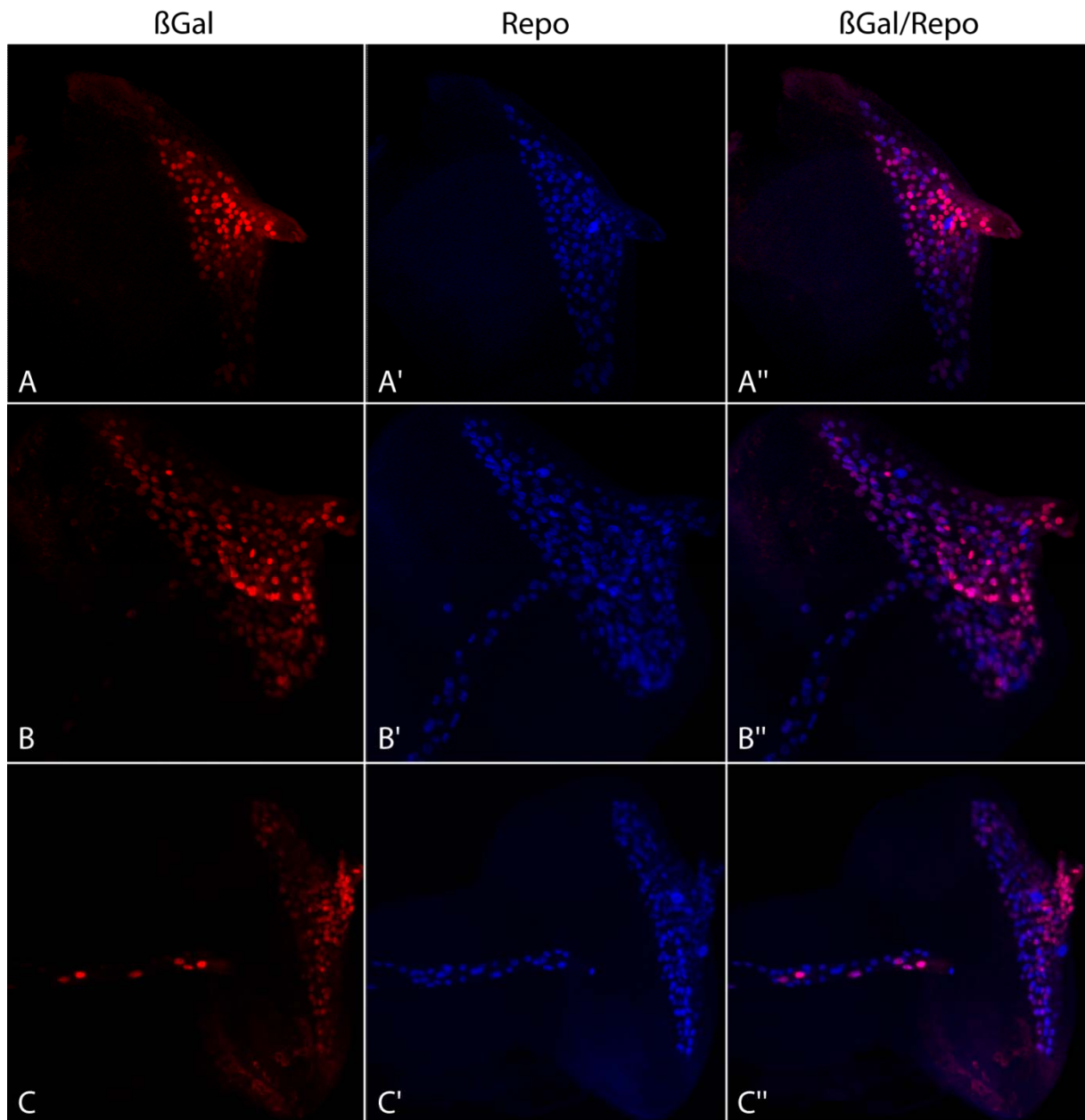


Abbildung 3.49: Konfokale Aufnahme einer Antikörperfärbung an Augenimaginalscheiben der Heindel-Linie 667 gegen β -Galactosidase (β -Gal) und Reversed-Polarity (Repo). Dargestellt ist die Maximum Projektion der konfokalen Aufnahme dreier Augenimaginalscheiben. Posterior ist rechts, ventral unten. Repo wird in Gliazellen exprimiert.

4 Diskussion

4.1 Abdominale Expression und Regulation von *omb*

4.1.1 Der Einfluss von *Omb* auf Zellschicksal und Zellpolarität des adulten Abdomens

Ein typisches dorsales Segment des adulten Abdomens von *Drosophila melanogaster* unterliegt einer Abfolge an verschiedenen Cuticula-Typen (Madhavan and Madhavan, 1980). Struhl et al. (1997) unterteilen die Cuticula-Typen nach Muster und Pigmentierung in a1 – a6 des anterioren Kompartiments und in p3 – p1 des posterioren Kompartiments. Der anteriore Rand jedes Segments besteht aus der unbehaarten, unpigmentierten und sklerosierten Acrotergite, der a1 Region. Darauf folgt die leicht pigmentierte und behaarte anteriore Tergite, die die Region a2 und die Mikrochaeten enthaltende Region a3 umfasst. Die posteriore Tergite beinhaltet die dunkel pigmentierte und mit Mikrochaeten besetzte Region a4 sowie die dunkel pigmentierte und eine Reihe Makrochaeten enthaltenden Region a5. Die darauf folgende *posterior hairy zone* (PHZ) ist unpigmentiert und behaart und beinhaltet sowohl die a6 Region des anterioren Kompartiments als auch die p3 Region des posterioren Kompartiments. Am posterioren Rand des Segments befindet sich die intersegmentale Membran (ISM), die die unpigmentierten und unbehaarten Regionen p2 und p1 enthält. Alle Borsten und Haare haben die gleiche Polarität und sind von anterior nach posterior orientiert.

Das posteriore Kompartiment der abdominalen Segmente wird durch die Expression des Selektorgens *engrailed* (*en*) definiert (Lawrence and Struhl, 1996). Dieses aktiviert das Segmentpolaritätsgen *hedgehog* (*hh*) (Lee et al., 1992). Hh agiert als Morphogen und diffundiert über die A/P-Kompartimentgrenze ins anteriore Kompartiment und aktiviert dort die Expression seiner Zielgene, zu denen *Cubitus interruptus* (*Ci*), *patched* (*ptc*), *decapentaplegic* (*dpp*) und *wingless* (*wg*) gehören (Alexandre et al., 1996; Dominguez et al., 1996; Hepker et al., 1997; Ingham, 1993; Sanicola et al., 1995). Im Gegensatz zu den Imaginalscheiben, in denen Hh wiederum die sekundären Morphogene *dpp* und *wg* aktiviert (Lawrence and Struhl, 1996; Tabata et al., 1995; Zecca et al., 1995), nimmt Hh im pupalen Abdomen direkt Einfluss auf anteroposteriore Musterbildung und vermittelt der posterioren Tergite ihr posteriores Schicksal (Struhl et al., 1997). *wg* und *dpp* haben auf die anteroposteriore Musterbildung der lateralen dorsalen Tergite keinen Einfluss (Struhl et al., 1997), sondern spezifizieren dorsoventrales Schicksal (Kopp et al., 1999).

Zusätzlich zur Diffusion über die Kompartimentgrenze, diffundiert Hh über die Segmentgrenze und spezifiziert die a1 Region des darauffolgenden Segments (Kopp and Duncan, 2002). Diese Signalgebung setzt jedoch erst ein, nachdem die letzten LECs von den Histoblasten verdrängt und

extrudiert wurden. Diese letzte Reihe von LECs stellen spezialisierte ‚Grenz‘-LECs dar und isolieren die Histoblasten benachbarter Segmente voneinander. So diffundiert Hh erst bei direktem Kontakt der posterioren Histoblasten mit anterioren Histoblasten des darauf folgenden Segments über die Segmentgrenze.

In dem stark hypermorphen *hh* Allel *hh^{Mirable}* (*hh^{Mir}*) (Kopp et al., 1997) wurde die anteriore Tergite durch eine gespiegelte Duplikation der posterioren Tergite, der PHZ und Teilen der ISM ersetzt (Abbildung 3.1 C) (Cuticula-Muster nach Struhl et al. (1997): p2-p3-a6-a5-a5-a6-p3-p2). Hh wird hier ektopisch im anterioren Kompartiment exprimiert. Dies verursacht wiederum eine ektopische Expression von *en* und endogenem *hh* im anterioren Kompartiment (Kopp et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass diese lokalisierte Aktivierung von endogenem *hh* nicht für den doppelt posterioren Phänotyp verantwortlich ist (Kopp and Duncan, 2002). Das Phänomen der Aktivierung von endogenem *en* und *hh* durch ektopisches *hh* im anterioren Kompartiment wurde bereits in Flügelimaginalscheiben gesehen (Guillen et al., 1995).

Schwächere ektopische Expressionen von *hh*, vermittelt durch ein *hs-hh* Transgen, zeigten Phänotypen mit verschiedenen Transformationen von anterioren zu posterioren Strukturen, die abhängig von dem Zeitpunkt des Hitzeschocks waren. Dies reichte von Transformationen der Mikrochaeten zu Makrochaeten bei einer frühen *hh*-Induktion bis zur Expansion des dunklen Pigmentbandes zum Anterioren hin bei einer späten *hh*-Induktion. Die Zellpolarität wurde dabei nicht beeinflusst (Kopp et al., 1997).

Reziprok zu den Transformationen von anterioren zu posterioren Strukturen, wurde bei Verlust von *hh* durch das Temperatur-sensitive Allel *hh^{ts2}* eine Transformation von posterioren zu anterioren Strukturen beobachtet. In manchen Fällen wurde die posterioren Tergite, die PHZ und die ISM durch eine gespiegelte Duplikation der anterioren Tergite ersetzt (a1-a2-a3-a4-a4-a3-a2-a1) (Kopp et al., 1997). Große Teile der anterioren Tergite (a2 und a3) entwickelten sich in *hh^{ts2}* Tieren normal, was andeutet, dass Hh in diesen Teilen nicht für die anteroposteriore Musterbildung verantwortlich ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass Hh dem posterioren Teil des anterioren Kompartiments der Tergite sein posteriores Schicksal verleiht.

Die Klasse der hypermorphen *omb*-Allele *Quadroon* (*Qd*) zeigen Transformationen anteriorer zu posterioren Strukturen. Das in Abbildung 3.1B abgebildete Allel *Qd^{FOR}* zeigte eine Expansion des Pigmentbandes bis hin zur Acrotergite. Ubiquitäre *omb* Expression sowie das stärkste *Qd* Allel *Qd^{Fab}* zeigten einen doppelt posterioren Phänotyp, in dem die anteriore Tergite und die ISM deletiert und durch eine gespiegelte Duplikation der posterioren Tergite und der PHZ ersetzt waren (a6-a5-a4-a4-a5-a6) (Kopp and Duncan, 1997). Dieser Phänotyp ähnelt stark dem doppelt-posterioren Phänotyp, der bei dem stark hypermorphen *hh* Allel *hh^{Mir}* gesehen wurde. Die Deletion der ISM bei *Qd^{Fab}* im

Vergleich zu hh^{Mir} deutet an, dass omb keinen Einfluss auf die Entwicklung der ISM hat. Schwächere Qd Allele, sowie ubiquitäre omb Expression im anterioren Kompartiment korrelieren mit der Expansion des Pigmentbandes zum Anterioren hin und haben keinen Einfluss auf die Polarität oder die Art der Borsten (Kopp and Duncan, 1997). Die Stärke der ektopischen omb Expression scheint verantwortlich für die Transformation der Zelltypen oder Zellpolaritäten zu sein. Bei dem hier gezeigten Allel Qd^{FOR} ist der expandierte Pigmentstreifen von unpigmentierten Flecken durchzogen, die auch in anderen Qd Allelen zu sehen waren (Kopp and Duncan, 1997). Hier scheint die ektopische omb Expression nicht stark genug zu sein um den Zellen eine posteriore Identität zu verleihen.

Wie bei dem Verlust von hh zeigen omb Nullmutante Tiere ein doppelt anterioren Phänotyp, bei dem im extremsten Fall die posteriore Tergite und die PHZ deletiert sind und durch eine gespiegelte Duplikation der anterioren Tergite ersetzt sind (a2-a3-a4-a4-a3-a2). Die ISM bleibt davon unbeeinflusst. Im posterioren Kompartiment scheint omb für die Entwicklung der PHZ notwendig zu sein (Kopp and Duncan, 1997).

Dass omb ein Hauptmediator des von Hh determinierten posterioren Schicksals ist, wurde in omb^- ; hh^{Mir} Doppelmutanten gezeigt (Kopp and Duncan, 1997; Kopp and Duncan, 2002). Der doppelt-posteriore Phänotyp von hh^{Mir} wird von dem omb Nullallel reprimiert. Somit zeigen die Doppelmutanten den für omb^- typischen doppelt-anterioren Phänotyp. In der Pupalentwicklung zeigt die Omb Expression eine Hh-Abhängigkeit. In hh -Nullmutanten ist die Omb Expression in Histoblasten und LECs reduziert und im hypermorphen Allel hh^{Mir} ist die Omb Expression expandiert (Kopp and Duncan, 1997). Ob Hh die omb Transkription direkt oder indirekt über ein weiteres Morphogen aktiviert ist noch unklar.

Die hier induzierten omb^- Klone im adulten Abdomen (Abbildung 3.2) bestätigten die Rolle von omb in der Vermittlung des posterioren Schicksals. Klone, die im anterioren der Tergite lagen, zeigten keine Veränderung der Pigmentierung oder Zellpolarität im Vergleich zu umliegendem wildtypischen Gewebe. Den Klonen, die in der posterioren Tergite lokalisiert waren, fehlte die dunkle Pigmentierung, wiesen jedoch keine erkennbare Veränderung der Zellpolarität auf. Die von Kopp und Duncan (1997) induzierten omb^- Klone in der posterioren Tergite wiesen, zusätzlich zur fehlenden Pigmentierung, eine umgekehrte Zellpolarität auf. Kopp und Kollegen verwendeten zur Induktion von omb^- Klonen das omb Nullallel $l(1)omb^{3198}$, während hier das Allel $l(1)omb^{282}$ verwendet wurde. Bei $l(1)omb^{3198}$ handelt es sich um eine nonsense Mutation, bei $l(1)omb^{282}$ dagegen um eine missense Mutation (Sen et al., 2010).

Kopp und Duncan (1997) postulieren, dass die Zellpolarität der abdominalen Segmente durch einen unterliegenden spiegelsymmetrischen Gradienten bestimmt wird, der unabhängig von der Hh-Signaltransduktionskaskade ist. Dieser wird durch den doppelt-anterioren Phänotyp der hh^{ts2} und

omb⁻ Allele aufgedeckt (a2-a3-a4-a4-a3-a2). Die normale Entwicklung der anterioren Tergite (a2 und a3) dieser doppelt-anterioren Phänotypen gibt einen Hinweis auf die *hh*-Unabhängigkeit. In der Anwesenheit von *hh*, dessen Funktion von *omb* vermittelt wird, wird die durch den unterliegenden Gradienten bestimmte Polarität in der posterioren Tergite umgekehrt und den Zellen posteriore Identität verliehen. Werden *hh* oder *omb* wie in den Allelen *hh*^{MIR} oder *Qd*^{Fab} ektopisch exprimiert, wird die durch den unterliegenden Gradienten bestimmte Polarität der anterioren Tergite umgekehrt und den Zellen der anterioren Tergite posteriores Schicksal verliehen (Kopp and Duncan, 1997; Kopp et al., 1997). In beiden Fällen, *hh*^{MIR} und *Qd*^{Fab}, wurde gezeigt, dass die Aktivierung von endogenem *hh* nicht für die doppelt-posteriore Duplikation verantwortlich war (Kopp and Duncan, 2002). Die Identität des unterliegenden Gradienten und wie er vermittelt wird bleibt noch zu klären.

4.1.2 Omb Expression in der Entwicklung des adulten Abdomens

Ein Großteil der Musterbildung der abdominalen Segmente geschieht in den ersten 48h der Pupalentwicklung. Wie die anderen Musterbildungsgene *en*, *hh* und *ptc* zeigt *omb* ein distinktes Expressionsmuster. Vor der Fusion des anterioren und posterioren dorsalen Histoblastennestes eines Segments wird Omb am posterioren Rand des anterioren und am anterioren Rand des posterioren Histoblastennests exprimiert. Verschmelzen diese zu einem dorsalen Histoblastennest, wird Omb am stärksten an der A/P-Grenze, mit einem beidseitig gleichförmigen Gradienten, exprimiert (Kopp and Duncan, 2002). Kurz vor der Fusion der Histoblastennester der benachbarten Segmente wird der beidseitige Gradient ungleichförmig, und die Omb-Expression reicht von der A/P-Grenze mit einem schwachen abfallenden Gradienten weit ins anteriore Kompartiment hinein. Im posterioren Kompartiment wird Omb nur in ein bis zwei Zellreihen posterior der A/P-Grenze exprimiert (Abbildung 3.3). Die frühe gleichförmige Omb Expression ist Hh unabhängig, während die späte ungleichförmige Expression eine Hh-Abhängigkeit zeigt (Kopp and Duncan, 2002). Wie es in späteren Stadien der Pupalentwicklung zur Reprimierung der Omb Expression im posterioren Kompartiment kommt, ist unklar. Ektopische Expression von *en* hat keinen Einfluss auf Omb (Kopp and Duncan, 2002). Also scheint *en* nicht für die Reprimierung verantwortlich zu sein. Kopp et al. (2002) spekulieren, dass diese Funktion von dem zu *en* paralogen Gen *invected* (*inv*) ausgeübt werden könnte. Wie oben beschrieben wurde, ist Omb für die Entwicklung der posterioren Tergite (a4, a5 und a6 des anterioren Kompartiments), sowie die Entwicklung der PHZ (p3 des posterioren Kompartiments) essentiell (Kopp and Duncan, 1997). Möglicherweise ist die frühe symmetrische Omb Expression für die Spezifikation des Zellschicksals von p3 und die späte, *hh*-abhängige anteriore Expression für die Zellidentitäten von a4, a5 und a6 verantwortlich (Kopp and Duncan, 2002).

En und Hh werden im kompletten posterioren Kompartiment vor der Fusion der Histoblastennester der benachbarten Segmente exprimiert, mit der stärksten Expression an der A/P-Grenze und nach posterior hin abfallend. Nach 40h APF, sobald die segmentale Fusion komplett ist, werden die En und Hh Expressionen am posterioren Ende des Segments hochreguliert. Kurze Zeit sind die Expressionen beider Gene an den posterioren und am anterioren Rändern des Kompartiments am höchsten, bevor sie innerhalb des posterioren Kompartiments uniform werden (Kopp and Duncan, 2002). Diese Beobachtungen konnten nur zum Teil durch die Antikörperfärbung gegen Inv reproduziert werden. In Abbildung 3.12A zeigte Inv innerhalb des posterioren Kompartiments einen von anterior nach posterior abfallenden Gradienten. Hier wurden die Histoblastennester der benachbarten Segmente durch die ‚Grenz‘-LECs voneinander isoliert. Mit einem Alter von 32-34h APF, bei dem En und Hh noch einen deutlichen Gradienten von anterior nach posterior zeigen, war die Inv Expression innerhalb des posterioren Kompartiments bereits uniform (Abbildung 3.3 A). Die in der En und Hh Expression deutlich gesehene Hochregulation der Expression am posterioren Rand des Kompartiments blieb bei der Inv Expression aus. Dies könnte die These von Kopp et al. (2002) unterstützen, dass die späte schmale Expression von Omb im posterioren Kompartiment durch eine Reprimierung durch *inv* zustande kommt.

Die Zielgene von Omb in der Entwicklung des adulten Abdomens und deren Einfluss auf die Pigmentierung sind noch nicht bekannt.

4.1.3 Die *omb* Tergiten-Enhancer Region

In den hier durchgeführten Enhancer-Reporter Untersuchungen wurden in der proximalen Region von Intron IV Sequenzen identifiziert, die Reportergergen Expression während der Pupalentwicklung trieben. Diese Tergiten-Enhancer Region reicht von einschließlich Fragment ombTU10A bis einschließlich ombTU12A (Abbildung 3.8). Die Region zeigte zwei unterschiedliche charakteristische Muster. Zum einen war ein *omb*-ähnliches Expressionsmuster der Fragmente ombTU10 und ombTU11, mit einem beidseitigen gleichförmigen Gradienten in frühen Stadien, der später ungleichförmig wurde, zu sehen. Zum anderen war ein *ptc*-ähnliches Muster zu sehen, das auf die Expression des Fragments ombTU12Amin reduziert werden konnte. Das *pct*-ähnliche Muster zeigte in frühen Stadien, in denen die Histoblastennester konsekutiver Segmente voneinander isoliert waren, einen schmalen Expressionsstreifen direkt anterior zur A/P-Grenze (Abbildung 3.12 A). Sobald die Histoblasten eines posterioren Kompartiments mit den anterioren Histoblasten des darauf folgenden Segments in Kontakt kamen, war am anterioren Rand des anterioren Kompartiments eine Expression zu sehen (Abbildung 3.12 B). Der Expressionsstreifen anterior der A/P-Grenze wurde zu

diesem Zeitpunkt breiter. Das Expressionsmuster von *ptc* reflektiert die Hh-Verteilung im anterioren Kompartiment (Kopp and Duncan, 2002). Hh diffundiert schon früh in der Pupalentwicklung vom posterioren Kompartiment über die A/P-Grenze in das anteriore Kompartiment. Diffusion über die Segmentgrenze setzt erst nach der Extrusion der ‚Grenz‘-LECs ein, was einen Hinweis darauf gibt, dass die ‚Grenz‘-LECs die Histoblastennester der benachbarten Segmente voneinander isolieren. ‚Grenz‘-Zellen exprimieren *en*. Jedoch konnte weder Hh Protein noch *hh*-Transkript detektiert werden (Kopp et al., 1997). Die Ähnlichkeit des Expressionsmusters von ombTU12, ombTU12A und ombTU12Amin mit *ptc* weist darauf hin, dass sich in diesen Fragmenten ein *hh* responsives Element befinden könnte.

In den LECs war in vielen Fällen eine ubiquitäre Expression (ombTU10, ombTU10C, ombTU12A), in einem Fall eine ubiquitäre Expression mit einer Hochregulation auf der A/P-Grenze (ombTU11) und in zwei Fällen ein Expressionsstreifen auf der A/P-Grenze zu sehen (ombTU10B, ombTU12A) (siehe Abbildung 3.5, Abbildung 3.9 und Abbildung 3.11). Die ubiquitäre Färbung ist nicht auf einen Vektorartefakt zurückzuführen, da sie bei allen verwendeten Vektoren gesehen wurde und nicht durchgängig bei allen Konstrukten eines Vektors auftauchte. Eine frühe ubiquitäre Expression in den LECs wurde auch bei einzelnen Enhancer-Trap Linien beobachtet (Kopp and Duncan, 2002).

Die Fragmente ombTU10 und ombTU11 trieben ebenfalls in den Imaginalscheiben Reportergergen Expression (Abbildung 3.32). Die Tergiten-Enhancer Region ist in verschiedenen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung aktiv. Im *omb* Locus wurden zahlreiche Enhancer Fragmente identifiziert, die beispielsweise in den Flügelimaginalscheiben aktiv sind (Abassi, 2007; Mayer, 2008; Sivasankaran et al., 2000). Diese Enhancer treiben zum Teil in überlappenden Regionen Reportergergen Expression. Das komplexe *omb* Expressionsmuster entsteht jedoch nur teilweise durch die additive Wirkung der Enhancer. Repressor Regionen haben einen Einfluss auf die Aktivität der Enhancer. Dabei können sie in nächster Nähe oder auch über große Entfernungen hinweg auf Enhancer wirken (Dunipace et al., 2011). Beispielsweise zeigte das Fragment ombTU12 in den Flügelimaginalscheiben kein charakteristisches Expressionsmuster (Abbildung 3.32 U). Sein Subfragment ombTU12A, das die ersten 1,9kb von ombTU12 enthält, trieb dagegen eine breite Expression (Abbildung 3.35 A). In ombTU12B oder ombTU12C sind anscheinend Repressoren lokalisiert, die auf die Expression von *omb* in der Flügelimaginalscheibe eine Wirkung haben, im Abdomen jedoch nicht. Ein weiteres Beispiel für die zeitliche Spezifität und das Zusammenspiel der Enhancer und Repressoren ist das Expressionsmuster von ombTU12A, das im Abdomen das gleiche Expressionsmuster wie das *hh*-abhängige *ptc-lacZ* zeigt (Abbildung 3.12 und Kopp and Duncan, 2002) während das Muster in der Flügelimaginalscheibe wesentlich breiter als das von Hh-regulierten Genen ist (Abbildung 3.35 A). Dies könnte durch die Mad-Bindestelle in ombTU12A vermittelt werden. Es ist bekannt, dass *dpp* keinen Einfluss auf die Musterbildung der dorsalen lateralen Tergite

und *omb* Expression hat (Kopp et al., 1999), wogegen *omb* in der Flügelscheibe durch *dpp* reguliert wird (Grimm and Pflugfelder, 1996). In *ombTU12* befindet sich also ein *hh*-sensitiver Abdomenenhancer und möglicherweise ein *dpp*-sensitiver Flügelenhancer, auf den jedoch im genomischen Kontext Repressoren wirken.

Für verschiedene Gene, die an der dorsoventralen Spezifizierung des frühen *Drosophila* Embryos beteiligt sind, wurden zwei weit auseinander gelegene Enhancer mit ähnlichen Expressionsmustern identifiziert, ein Promotor-naher und einen proximal oder distal zur Transkriptionseinheit liegender (Hong et al., 2008). Diese distalen oder proximalen Enhancer wurden als *shadow* Enhancer bezeichnet. Sie entwickelten sich, trotz ihrer hohen Konservierung innerhalb der 12 sequenzierten *Drosophila* Spezies, im Laufe der Evolution schneller als die primären Enhancer. So konnte die morphologische Evolution voran getrieben werden, ohne dass die kritischen proximalen Enhancer in Gefahr waren zerstört zu werden. Es wird postuliert, dass *shadow* Enhancer durch ihre redundante Funktion die robuste Expression ihres Gens unter verschiedenen äußeren und inneren Einflüsse sicherstellen (Dunipace et al., 2011; Hong et al., 2008; Roy et al., 2010). Wie oben beschrieben, wurden auch in *omb* eine Reihe an Enhancern mit redundanten Wirkungen identifiziert. Die konservierte Größe des *omb* Locus, seiner stromaufwärts und stromabwärts gelegener regulatorischen Regionen sowie die konservierte Größe der Introns, gibt ein Hinweis auf die funktionale Notwendigkeit dieser regulatorischen Regionen und der sich darin befindenden Enhancer (Pflugfelder, 2009). Der Tergiten-Enhancer wurde innerhalb der *omb* Transkriptionseinheit vermutet, da Defizienzen im *up*- und im *downstream* Bereich von *omb* keinen abdominalen Phänotyp aufwiesen. Ob die hier identifizierte Region die einzige Region im *omb* Locus ist, die Expression in der Tergitenentwicklung treibt, bleibt noch zu klären. Hierfür müssen alle bisher noch nicht getesteten Enhancer-Reporter Konstrukte des *omb*-Locus auf Reporterexpression in den pupalen Tergiten untersucht werden.

4.1.4 Identifikation eines Hedgehog abhängigen Fragments im *omb* Tergiten-Enhancer

Bereits das Expressionsmuster des Fragments *ombTU12* deutete an, dass es sich bei diesem Fragment um ein Hh responsives Fragment handeln könnte. Der Einfluss von Hh wurde durch Einkreuzen der transgenen Linien *ombTU10* und *ombTU12* in das temperatursensitive Allel *hh^{ts}* untersucht. Das Fragment *ombTU10* zeigte im *hh*-mutanten Hintergrund keine veränderte Expression (Abbildung 3.13). Dagegen trieb *ombTU12* in frühen wie in späteren Stadien im *hh*-mutanten Hintergrund nur eine schwache bis keine Reporterexpression (Abbildung 3.14). Diese zwei Regionen könnten für die *hh*-unabhängige frühe und die *hh*-abhängige späte Expression von *Omb*

verantwortlich sein (Kopp and Duncan, 2002). Die *hh*-Abhängigkeit des Fragments ombTU11 muss noch untersucht werden. Die Region ombTU10 könnte durch den von Kopp et al. (1997) beschriebenen unterliegenden symmetrischen Gradienten reguliert werden. ombTU10 sowie ombTU11 zeigten in frühen Stadien eine starke Expression auf der A/P-Grenze des Histoblastennests. Diese entsprach zu diesem und zu späteren Zeitpunkten der Omb Expression (Kopp and Duncan, 2002) und (Abbildung 3.6 B). Später in der Pupalentwicklung könnte ombTU12 die Regulation von Omb übernehmen und der posterioren Region des anterioren Kompartiments sein durch Hh determiniertes posteriores Schicksal verleihen. In den anterioren Zellen des anterioren Kompartiments, in denen ab 40h APF ombTU12 und *ptc-lacZ* Expression (Kopp and Duncan, 2002) getrieben wird, wird zu keinem Zeitpunkt der Pupalentwicklung *omb* exprimiert. Entweder erreicht das Hh-Signal diese Zellen zu einem Zeitpunkt in dem ihre Zellschicksale schon festgelegt sind, oder es ist ein weitere Hinweis darauf, dass anteriore und posteriore Zellen des anterioren Kompartiments auf verschiedene Art und Weise auf das Hh-Signal reagieren (Struhl et al., 1997).

Bei der Reproduktion der *hh*-Abhängigkeit von ombTU12 traten Probleme auf, die wahrscheinlich auf einen Defekt des *hh^{ts}* Merkmals zurückzuführen waren. Um eine klare *hh*-Abhängigkeit nachzuweisen, müssten *smoothend (smo)* mutante Klone induziert werden und deren Effekt auf die Expression von ombTU12 untersucht werden. Smo ist ein Transmembranprotein der *hh*-Signaltransduktionskaskade, ohne welches Zellen das *hh* Signal nicht verarbeiten können (Chen and Struhl, 1996).

4.1.5 Analyse der in ombTU12Amin enthaltenen konservierten Bindestellen

Das Fragment ombTU12A wurde durch Elimination von proximalen und distalen nicht konservierten Sequenzen auf das Minimalfragment ombTU12Amin reduziert. Dieses Fragment spiegelt das bekannte ombTU12 sowie ombTU12A Expressionsmuster wieder. In dem Fragment wurden vier konservierte Bindestellen identifiziert: Zwei Bindedomänen des Effektors der *hh*-Signaltransduktionskaskade Cubitus interruptus (Ci), eine putatives Tbx Bindeelement (*Tbx binding element* – TBE) und eine Bindedomäne des Effektors der *dpp*-Signaltransduktionskaskade Mothers against Dpp (Mad) (Abbildung 3.15). Die Ci Bindestellen wurden gemäß ihrer Nummerierung im *screen* Ci21 und Ci22 benannt. Deletionskonstrukte, in denen entweder die TBE *site* alleine, die TBE *site* zusammen mit Ci21 oder die Mad *site* deletiert waren, zeigten ebenfalls das bekannte ombTU12Amin Expressionsmuster. So kann eine Regulation von ombTU12Amin in der lateralen Tergite über Omb selbst oder andere Tbx-Proteine oder über die *dpp*-Signaltransduktionskaskade als unwahrscheinlich gelten. Es wurde bereits gezeigt, dass *dpp* an der dorsalen Mittellinie für

dorsoventrale Musterbildung eine Rolle spielt, jedoch nicht in der lateralen Tergite exprimiert wird (Kopp et al., 1999). In allen Deletionskonstrukten war die Ci22 Bindestelle enthalten. Vermutlich ist diese alleine oder in redundanter Weise zusammen mit Ci21 für die Expression des Fragments im *hh*-abhängigen Muster verantwortlich.

Der Transkriptionsfaktor Ci wird in der embryonalen Epidermis und in Imaginalscheiben ausschließlich in Zellen des anterioren Kompartiments exprimiert, da seine Expression im posterioren Kompartiment durch *en* reprimiert wird (Schwartz et al., 1995). In Anwesenheit von Hh liegt Ci in einer Aktivatorform (Ci^{ACT}) und in Abwesenheit von Hh in einer Repressorform (Ci^{REP}) vor (Aza-Blanc and Kornberg, 1999). Der Hh Gradient im anterioren Kompartiment resultiert im entgegengesetzten Gradienten von Ci^{ACT} und Ci^{REP} . Beide Formen von Ci konkurrieren um dieselben Bindestellen in den regulatorischen Regionen ihrer Zielgene. Basierend auf den Ci Bindestellen in den regulatorischen Regionen der *hh*-Zielgene *dpp* und *ptc*, wurden Ci-Bindestellen in hoch- und nieder affine Bindestelle eingestuft (Parker et al., 2011). Die Bindestelle Ci22 in ombTU12Amin entspricht der hoch-affinen im *ptc*-Enhancer vorkommenden Sequenz. Diese Sequenz wurde schon zuvor als Ci consensus Sequenz identifiziert (Von Ohlen et al., 1997). In Ci21 ist im Vergleich zu Ci22 eine Base ausgetauscht (Position 2 G → T). Im *dpp*-Enhancer sind in den Ci-Bindestellen im Vergleich zur hoch-affinen Ci Bindestelle zwei bis drei Basen ausgetauscht. Diese haben eine niedrigere Affinität und sind weniger konserviert (Parker et al., 2011). Parker und Kollegen entwickelten ein neues Modell der transkriptionellen Regulation durch Ci, in dem Ci^{REP} bei geringer Hh-Konzentration eine entscheidende Rolle spielt. Beim Binden von Ci^{REP} an eine Ci Bindestelle, wird die Bindung eines weiteren Ci^{REP} an benachbarte Bindestellen durch Interaktion der beiden Repressorformen favorisiert. Handelt es sich bei den Ci Bindestellen um hoch-affine Bindestellen, wird selbst in Regionen höherer Hh-Konzentration, folglich in Regionen niedriger Ci^{REP} Konzentration, die Bindung zweier oder mehrerer Ci^{REP} gegenüber Ci^{ACT} favorisiert (Repressor-Kooperativitäts Modell). So begrenzen hoch-affine Ci-Bindestellen die Transkription ihrer Zielgene auf eine Region hoher Hh-Konzentration. Enthält der Enhancer des Zielgens zwei oder mehrere nieder-affine Ci-Bindestellen, wird erst in Regionen hoher Ci^{REP} Konzentration, also in Regionen niedriger Hh-Konzentration, die Bindung zweier Repressoren über die der Aktivatorform favorisiert. Hh-Zielgene mit nieder-affinen Ci-Bindestellen in ihrem Enhancer haben folglich eine breitere Expressionsdomäne. So produzieren nieder-affine Bindestellen bei geringen Hh-Konzentrationen eine Aktivierung ihrer Zielgene, während hoch-affine Bindestellen hier eine Reprimierung ihrer Zielgene veranlassen.

Es ist denkbar, dass die hoch-affine Ci22 *site* in ombTU12A durch den Austausch von drei Basenpaaren in eine nieder-affine Bindestelle mutiert wurde. Die Mutagenese wurde einmal im Minimalfragment ombTU12Amin und, um eine redundante Wirkung der Ci21 und Ci22 *sites* auszuschließen, im Subfragment ombTU12Amin-deltaTBE20,Ci21 durchgeführt. Um die Bedeutung der

hoch-affinen Ci22 weiter zu charakterisieren, wurden zwei zusätzliche hoch-affine Ci22 Bindestellen in ombTU12A ligiert (Abbildung 3.17). Die Veränderungen des Expressionsmusters im Vergleich zum unmutierten ombTU12Amin waren eher subtil. Im Fragment ombTU12Amin-delTBE20,Ci21-Ci22mut ist die Ci21 *site* deletiert und die hoch-affine Ci22 *site* durch die potentiell nieder-affine Bindestelle ersetzt. Hier war der anterior der A/P-Grenze liegende Expressionsstreifen in beiden betrachteten Stadien breiter als im wildtypischen ombTU12A. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit dem von Parker et al. (2011) postulierten Repressor-Kooperativitäts Modell. Die nieder-affine Ci *site* bindet Ci^{REP} erst in Regionen in der dieses in hoher Konzentration vorliegt und sich gegen eine Bindung von Ci^{ACT} durchsetzen kann. Dies geschieht in Regionen niedriger Hh-Konzentration und folglich wird die Expressionsdomäne dieses Fragments zum Anterioren hin breiter (Abbildung 3.18 D und H weißer Pfeil). Dieses Verhalten war auch bei dem später in der Entwicklung auftretendem Expressionsstreifen am anterioren Rand des anterioren Kompartiments zu sehen. Hier diffundiert Hh über die Segmentgrenze in das benachbarte anteriore Kompartiment. ombTU12Amin-delTBE20,Ci21-Ci22mut zeigte entlang dieses Gradienten eine breitere Färbung als ombTU12Amin (Abbildung 3.18 H). Im frühen betrachteten Stadium war eine schwache lacZ Expression im posterioren Kompartiment zu sehen (Asterisk Abbildung 3.18 D). Da im posterioren Kompartiment weder die Aktivator- noch die Repressorform von Ci vorliegt, muss die Reportergenexpression durch einen anderen Faktor ausgelöst werden. Allerdings könnten hier auch die bei der Xgal Färbung entstandenen Farbstoffe in das posteriore Kompartiment diffundiert sein, was ein Resultat der vergleichsweise starken Färbung dieses Präparats sein könnte. Dies müsste durch eine Antikörperfärbung gegen β -Gal überprüft werden.

Das Fragment ombTU12Amin-Ci22oligo enthält drei hoch-affine Ci22 Bindestellen, sowie die natürlich vorkommende Ci21 *site*. Dieses Fragment reagiert ebenfalls wie von Parker et al. vorhergesagt. Die Anwesenheit von drei hoch-affinen Ci Bindestellen begünstigt bei hohen Hh-Konzentrationen eine kooperative Bindung der Ci^{REP} Form. Dadurch wird die Expression des Reportergens in Regionen höherer Hh-Konzentration reprimiert und der Expressionsstreifen wird auf einen schmalen Bereich anterior der A/P-Grenze im Vergleich zum wildtypischen ombTU12A begrenzt.

Das Fragment ombTU12Amin-Ci22mut trägt die natürlich vorkommende Ci21 *site* und die mutierte potentiell nieder-affine Ci22 *site*. Der anterior der A/P-Grenzen liegende Expressionsstreifen scheint in beiden betrachteten Stadien schmaler als im wildtypischen ombTU12Amin. Stellt Ci21 eine nieder-affine *site* dar, steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu Parker et al. (2011). Auch hier würde man in diesem Fall eine Verbreiterung des Expressionsstreifens erwarten.

Die subtilen Veränderungen der Expressionsmuster könnten eine Folge des recht steilen Hh-Gradienten in der posterioren Tergite sein. Im Gegensatz zu der Flügelimaginalscheibe, in der der

entgegen gesetzte Gradient von Ci^{ATC} und Ci^{REP} weit ins anteriore Kompartiment hinein reicht, scheint er im anterioren Kompartiment der Tergite auf einen schmalen Bereich begrenzt zu sein.

Die Affinitäten der hier beschriebenen Ci Bindestellen müssten durch *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) ermittelt werden. Erst dann kann eine klare Aussage über Affinität der mutierten und oligomerisierten Ci22 sowie der Ci21 Bindestelle getroffen werden. Um einen besseren Vergleich der Breite der Expressionsstreifen zu bekommen müssten Antikörper-Doppelfärbungen gegen β -Gal des Fragments und einem endogenen Marker, beispielsweise *ptc*, durchgeführt werden. Ein weiterer wichtiger Versuch wäre die Hh-Abhängigkeit aller Fragmente nachzuweisen. Dies könnte, wie oben beschrieben, durch Erzeugung von Mutanten im Hh-Signalweg untersucht werden. Aus zeitlichen Gründen konnten diese Versuche nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden.

4.1.6 Endogene Deletionen in der Tergiten-Enhancer Region

4.1.6.1 Die Methode

Die endogene Deletion einer Zielregionen durch homologe Rekombination wurde in *Drosophila* erstmals im Jahr 2000 von Y.S. Rong und K.G. Golic beschrieben (Rong and Golic, 2000). Die hier angewandte Methode des *genomic engineerings* (Huang et al., 2009) basiert auf dem Ersetzen endogener genomischer Zielregionen durch extrachromosomale Sequenzen. Dabei wird die homologe Rekombination von der endogenen DNA-Reparatur- und Rekombinationsmaschinerie vollzogen (Rong and Golic, 2000). Die extrachromosomale Donorsequenz wird durch eine transgene Flippase in einer zirkulären Form mobilisiert. Da lineare DNA-Strukturen besser als zirkuläre Strukturen rekombinieren, wird diese durch eine transgene Endonuklease einem Doppelstrangbruch unterzogen. Die transgene Flippase und die transgene Endonuklease IScelI stehen unter der Kontrolle eines Hitzeschock Promotors. Das sogenannte *gene targeting* durch homologe Rekombination kann über zwei Strategien erzielt werden. Der ‚*ends-in*‘ Strategie, bei der ein Doppelstrangbruch des extrachromosomalen Donors innerhalb einer mutierten Kopie des Zielgens erfolgt und eine Duplikation des Zielgens am Zielort generiert. Diese Strategie wird meist angewendet um ein wildtypisches durch ein mutantes Allel zu ersetzen. Mit der ‚*ends-out*‘ Strategie wird das komplette Zielgen oder die Zielregion durch den transgenen Donor ersetzt um ein Nullallel erschaffen zu können. Hierfür werden die Doppelstrangbrüche an beiden Seiten flankierend zur homologen Donorsequenz induziert (Gong and Golic, 2003; Rong and Golic, 2000). Es wurde gezeigt, dass beide Strategien ähnlich effizient sind (Gong and Golic, 2003). Die hier angewandte Methode basiert auf der ‚*ends-out*‘ Strategie. Bislang wurden in *Drosophila* nur etwas mehr als 20 Gene durch ‚*ends-out*‘-*targeting* modifiziert (Huang et al., 2008). Die Größe der deletierten Regionen reichte dabei von

160bp der microRNA *miR-278* (Teleman et al., 2006) bis zu fast 47kb des *hsp70B* Gens (Gong and Golic, 2004). Der limitierende Faktor dieser Methode ist die Frequenz der homologen Rekombination an der Zielregion. Diese kann von mehr als 1/200 Gameten (Manoli et al., 2005) bis zu weniger als 1/350000 Gameten (Jones et al., 2007) variieren. Dabei korreliert die Frequenz der homologen Rekombination nicht notwendigerweise mit der Größe der zu deletierenden Zielregion. Die Frequenz der homologen Rekombination scheint mit dem Insertionsort des transgenen Donors zu variieren (Gong and Golic, 2004; Rong et al., 2002). Auch die Größe der Homologie-Regionen des transgenen Donors stellt einen kritischen Faktor dar. Optimalerweise sollten diese zwischen 3 und 5kb lang sein (Rong et al., 2002). Es gibt einige Hinweise darauf, dass eine starke transkriptionelle Aktivität eines Ziellocus einen positiven Einfluss auf die Frequenz der Rekombination hat (Nickoloff and Reynolds, 1990; Thyagarajan et al., 1995). Jedoch stellt dies keine universelle Korrelation dar. Entgegen der Annahme, dass *gene targeting* eher an Genen, die in Telomernähe liegen, erfolgt (Engels, 2000), wurde gezeigt, dass Gene, die bis zu 20Mb von einem Telomer entfernt sind, mit einer annehmbaren Effizienz (>1/4000 Gameten) modifiziert werden können (Rong et al., 2002).

Ein Vorteil des *gene targetings* im Vergleich zur EMS-Mutagenese oder durch Röntgenstrahlen induzierte Mutagenese ist, dass der Phänotyp der gewünschten Mutation nicht bekannt sein muss. Der Erfolg der Methode kann durch genetische und molekulare Tests bestätigt werden. In den meisten publizierten Fällen wurde *gene targeting* zur Mutation oder kompletten Deletion einer kodierenden Region angewandt (Gong and Golic, 2004; Huang et al., 2009; Rong and Golic, 2000). In dieser Arbeit wurden nicht kodierende regulatorische Sequenzen des Tergiten Enhancers deletiert und deren Effekt auf die Genregulation untersucht.

4.1.6.2 Deletionen innerhalb der Tergiten-Enhancer Region

Zwei der drei gewünschten Deletionen in Intron IV von *omb* konnten erzielt werden (Abbildung 3.20). Dabei wurde die kleinste Deletion $\Delta ombTU12A$ mit der etwa dreifachen Effizienz im Vergleich zur nächstgrößeren Deletion $\Delta ombTU10-2$ erzielt ($3,9 \cdot 10^{-3}$ vs. $1,2 \cdot 10^{-3}$, respektive). Die große Deletion $\Delta ombTU10-1$ mit einer Größe von ca. 21kb konnte nicht erzielt werden. Diese Ergebnisse deuten, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Deletionen, eine Korrelation der Größe und der Effizienz der Deletion an. Da alle drei Deletionen im gleichen Genlocus erfolgten, kann der transkriptionelle Status und die Genposition hier nicht ausschlaggebend für die Effizienz der homologen Rekombination gewesen sein.

In allen drei *Targeting*-Experimenten wurden einige nicht-gerichtete Insertionen erhalten (Tabelle 3.3, Tabelle 3.5, Tabelle 3.7). In den meisten Fällen handelt es sich dabei wahrscheinlich um nicht

erfolgte Mobilisationen der Donorkonstrukte durch die Flippase. Gegen diese Ereignisse sollte die UAS-*rpr* Sequenz in der Donorkassette selektieren. Jedoch hatte die *rpr*-Selektion, abhängig von dem Insertionsort der Donorkassette und der verwendeten Gal4-Linie, nicht in allen Fällen eine 100%ige Effizienz. Aufgrund des Arbeitsaufwandes wurde der Lokalisation des Donorkonstrukts bei falschpositiven Tieren, die eine zum Donorstamm vergleichbare Augenfarbe zeigten, nicht nachgegangen.

Im ‚*Targeting*‘-Experiment $\Delta ombTU10-1$ wurden zwei nicht-gerichtete Insertionen nachgewiesen (Tabelle 3.3). Eine davon wurde auf dem zweiten Chromosom, die andere auf dem Y-Chromosom lokalisiert. Die zweitchromosomale Insertion zeigte einen Steifenaugenphänotyp, ähnlich zu dem der bei w^+ -markierten Insertionen in *omb* zu sehen ist. Die Insertion wurde 58bp stromaufwärts der *wg*-Transkriptionseinheit kartiert. Die Donorkassette wurde nicht durch ungerichtete homologe Rekombination, sondern durch ihre P-Element Enden in diesen Locus inseriert (Abbildung 3.21). Diese nicht-gerichtete Insertion entstand aus einer Donorlinie, die die Donorkassette auf dem zweiten Chromosom trug. Eventuell fand hier bereits während der Gametenbildung eine Rekombination statt, so dass die Donorkassette in die Nähe des *wg*-Transkriptionsstartpunkts gelangen konnte. An dieser Stelle befindet sich ein beliebter P-Element Insertionsort (Bellen et al., 2004; Bier et al., 1989). Eine weitere Möglichkeit wäre eine nicht-gerichtete homologe Rekombination an einem Ende des transgenen Donors und eine illegitime Insertion des anderen Endes des transgenen Donors (Gong and Golic, 2004).

Im Fall der Deletion $\Delta ombTU12A$ trat ein weiteres interessantes Phänomen auf. Ein Defekt in der extrachromosomalen Donor-DNA wurde in zwei von fünf Fällen während der homologen Rekombination behoben. Die stromabwärts zur Zielregion gelegene Homologie-Region (*dsh*) enthielt kodierende Sequenzen. Während der Amplifikation dieser Sequenzen bei der Herstellung des Deletionskonstrukts müssen in der kodierenden Sequenz von Exon V Punktmutationen unterlaufen sein, die zu zwei Aminosäureaustauschen in der T-Domäne von Omb und somit zu einer Letalmutation führen. Da zwischen dem Anfang der *dsh* und den Mutationen in Exon V nur wenige 100 Basenpaare liegen, ist es unwahrscheinlich, dass die homologe Rekombination in dem Bereich vor den Mutationen stattgefunden hat und die mutierte Sequenz verloren ging. Wahrscheinlicher ist, dass die Mutationen durch die endogene Rekombinationsreparatur mit Hilfe des homologen Schwesterchromosoms behoben wurden. Diese Art der Rekombinationsreparatur wurde bereits bei ‚*ends-in*‘ Versuchen von Rong und Golic für das Auftreten unerwarteter Rekombinationsereignisse verantwortlich gemacht (Engels, 2000; Rong and Golic, 2000).

4.1.6.3 Bedeutung und Redundanz der deletierten Regionen

Weder die Δ ombTU10-2 noch die Δ ombTU12A Deletion zeigte einen drastischen Phänotyp in der Pigmentierung der adulten Abdomen. In Δ ombTU12A Tieren war weder bei Weibchen noch bei Männchen eine Veränderung der Pigmentierung zu sehen (Abbildung 3.27). Weibchen der Δ ombTU10-2 Tiere zeigten eine hohe Variabilität in der Pigmentierung der posterioren Segmente A5 und A6 (Abbildung 3.26). Bei etwa einem Drittel der Tiere war der breite Pigmentstreifen in A6 abwesend oder nur in einem reduzierten Maße zu sehen. Der Pigmentstreifen in A5 war in diesen Tieren ebenfalls reduziert. In Männchen war keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp zu sehen. Die abdominale Pigmentierung in *Drosophila melanogaster* unterliegt einem sexuellen Dimorphismus. Die Segmente A1 bis A6 der Weibchen sind mit einem dunklen Pigmentstreifen in der posterioren Tergite versehen. In Männchen ist dieser Streifen ebenfalls in den Segmenten A1 bis A4 zu sehen, die Segmente A5 und A6 sind komplett pigmentiert. Dieser Sexualdimorphismus wurde erst spät in der Evolution entwickelt. In dem Subgenus *Sophophora* tritt dieser nur in der *melanogaster* Subgruppe auf. In den meisten *Drosophila* Spezies ist eine monomorphe Pigmentierung des Abdomens zu sehen (Kopp et al., 2000). Die nicht-geschlechtsspezifische Pigmentierung wird durch den Transkriptionsfaktor *omb* kontrolliert (Kopp and Duncan, 1997). Die Männchen-spezifische Pigmentierung wird durch einen separaten Mechanismus des Gens *bric-a-brac* (*bab*) kontrolliert, das regulatorische Eigenschaften der homöotischen Gene *Abdominal-B* (*Abd-B*) und *abdominal-A* (*abd-A*) und der Geschlechtsdeterminationsgene integriert (Kopp et al., 2000). *bab* reprimiert die Männchen-spezifische Pigmentierung in Weibchen und wird in den Segmenten A2 bis A6 stufenweise schwächer exprimiert, während *bab* in Männchen nur in den Segmenten A2 bis A4 exprimiert wird. Der reprimierende Effekt von *bab* wird in der posterioren Tergite durch die *omb* kontrollierte Pigmentierung überschrieben (Kopp et al., 2000). Durch die Deletion der regulatorischen Sequenz ombTU10 zeigte die Pigmentierung der Segmente A5 und A6 in Weibchen der Δ ombTU10-2 Tieren eine höhere Variabilität als im Wildtyp. Anscheinend enthält dieser Bereich regulatorische Sequenzen, die für die korrekte Pigmentierung der Segmente A5 und A6 von Bedeutung sind, eventuell um einer Repression durch *bab* bei geringen *bab* Konzentrationen entgegen zu wirken. In Spezies außerhalb der *melanogaster* Subgruppe mit monomorpher Pigmentierung ist die *bab* Expression in beiden Geschlechtern und allen Segmenten identisch. Somit spielte die Regulation von *bab* durch die homöotischen und die Geschlechtsdeterminationsgene eine wichtige Rolle in der Entwicklung der sexual dimorphen Pigmentierung (Kopp et al., 2000). Weibchen in natürlich vorkommenden Populationen von *Drosophila melanogaster* können eine hohe Variabilität in der Pigmentierung des Segments A6 aufweisen. Dabei kann diese von der völligen Abwesenheit bis zur kompletten Pigmentierung des Segments reichen. Der *bab*-Locus wurde dabei

als Locus mit dem höchsten Effekt auf diese Variation identifiziert (Robertson, 1977). Möglicherweise korrelierten in der Evolution der sexuell dimorphen Pigmentierung die Varianten der *bab* Expression mit der Regulation von *omb* in den Segmenten A5 und A6.

Innerhalb der *D. melanogaster* Populationen existiert eine Temperaturabhängigkeit der abdominalen Pigmentierung. Ursprüngliche Populationen der Subsahara Region sind weniger pigmentiert als europäische Populationen. So haben sich die Phänotypen durch Selektion ihren Umweltbedingungen angepasst. Durch adaptive phänotypische Plastizität passten sich die Genotypen optimal an ihre äußeren Bedingungen an. In der Süd-Amerikanischen Spezies *Drosophila polymorpha* korrelieren Polymorphismen in der N-terminalen Region von *Omb* mit heller und dunkler Pigmentierung (Brisson et al., 2004). Jedoch wurde in dieser Arbeit nur ein kleiner Teil des *omb*-Locus analysiert, so dass weitere Veränderungen in *omb* und deren Auswirkung auf die abdominale Pigmentierung nicht ausgeschlossen werden können. Die Modifikation von nicht-kodierenden regulatorische Sequenzen leistete einen großen Beitrag zur morphologischen Evolution (Prud'homme et al., 2007) und unterliegt dabei weniger Einschränkungen als die Modifikation von kodierenden Sequenzen. Mutationen in regulatorischen Regionen unterliegen nicht dem pleiotropen Effekt der kodierenden Mutationen und können sich auf spezifische Funktionen eines Gens beschränken (Rebeiz et al., 2009). Verschiedene regulatorische Regionen können auch als Puffer gegen Umwelteinflüsse oder genetische Perturbationen wirken und unter verschiedenen Bedingungen für die korrekte Genexpression sorgen (Sato and Siomi, 2010). Im Fall der Deletion von *ombTU10-2* scheint die Abpufferung gegen interne Faktoren geringer geworden zu sein, und die korrekte Pigmentierung der letzten beiden abdominalen Segmente der Weibchen nicht in allen Fällen gewährleistet.

Die korrekte Pigmentierung des adulten Abdomens wird durch regulatorische Regionen mit redundanter Funktion sichergestellt. Die Deletion $\Delta ombTU10-2$ sowie $\Delta ombTU12A$ der Tergiten Enhancer Region führen nicht zu einem kompletten Verlust der abdominalen Pigmentierung. Auch in Vertebraten wurde gezeigt, dass Gene mehrere regulatorische Regionen besitzen die zueinander redundant wirken und dass die Deletion einer dieser Regionen keinen Effekt auf die Genexpression haben muss (Xiong et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit zur Sicherstellung der korrekten Pigmentierung könnten Gene sein, die in redundanter Weise zu *omb* agieren. Ein Phänomen, das auch zur Erklärung des *omb* Flügelphänotyps herangezogen wurde (Grimm and Pflugfelder, 1996). Kopp und Duncan (1997) identifizierten ein Gen, *Scruffy* (*Scf*), das in der abdominalen Pigmentierung parallel zu *omb* wirkt und ein mögliches weiteres Hh-Zielgen darstellen könnte.

Um die Relevanz der Regionen *ombTU10* und *ombTU12A* besser charakterisieren zu können, müsste $\Delta ombTU10-2$ im Hintergrund von $\Delta ombTU12A$ erzeugt werden, so dass beide Deletionen endogen enthalten sind. Durch die im Prozess des *genomic engineering* eingefügten attP sites an der Stelle der Regionen *ombTU10* und *ombTU12A* könnte die dazwischen liegende Region mittels

Recombinase-Mediated Cassette Exchange (RMCE) (Bateman et al., 2006) deletiert werden. Dabei wird die zwischen zwei attP sites liegende Sequenz gegen eine von attB sites flankierende Donorkassette ausgetauscht. Möglicherweise existieren neben der hier identifizierten Region weitere Tergitenspezifische regulatorische Regionen. Durch die Deletion der kompletten identifizierten Region und deren Effekt auf den abdominalen Phänotyp, könnte man einen Hinweis auf die Existenz weiterer regulatorischer Regionen bekommen. Die Bedeutung von redundant zu *omb* wirkenden Genen müssten durch deren Mutation im Hintergrund der Deletion der regulatorischen Region von *omb* untersucht werden.

4.1.6.4 Streifenaugenphänotyp der Deletionsfliegen

Der hier gesehene Streifenaugenphänotyp der Deletionsfliegen, die statt der deletierten Region die w^+ -markierte Donorkassette tragen, ist bereits von vielen w^+ -markierten P-Elementinsertionen im *omb*-Locus bekannt. Dabei ist er unabhängig von der Position und Orientierung der Insertion (Peter et al., 2002; Sun et al., 1995; Tang and Sun, 2002; Tsai et al., 1997). Meist resultieren w^+ -markierte transgene Insertionen in uniformer w -Expression im Auge. Der Streifenaugenphänotyp entsteht durch eine Repression von w im Bereich der D/V-Grenze (Pflugfelder, 2009). Dabei kann die Breite des dorsalen und ventralen Pigmentbandes variieren. Hier scheint die Breite der Pigmentbänder in beiden Fällen ähnlich zu sein, jedoch sind die Augen der $\Delta ombTU10-2$ Tiere deutlich stärker pigmentiert als Augen der $\Delta ombTU12A$ Tiere. Das Enhancer-Reporter Fragment *ombTU10* treibt in den Augenimaginalscheiben eine polare Reporterexpression in den dorsalen und ventralen Augenrändern (Abbildung 3.32 L), während *ombTU12A* lediglich eine schwache Expression im posterioren Pol der Augenscheibe treibt (Abbildung 3.35 L). Eventuell wurde durch die Deletion von $\Delta ombTU10-2$ nicht die komplette Augenspezifische regulatorische Sequenz entfernt, so dass diese noch aktivierend auf die w^+ -markierte Insertion an der Stelle von *ombTU10* wirken kann.

4.1.7 Expressionstreue der Enhancer-Trap Insertionen in der Abdominalentwicklung

Von den 13 untersuchten Enhancer-Trap Stämmen zeigten ausschließlich drei der vier PGawB Insertionen Reporterexpression im pupalen Abdomen. Dabei handelt es sich um die Stämme *ombP3*, *ombP6* und *ombP7*. Der Stamm *ombP4* zeigte als einziger PGawB Stamm keine Expression. Auch in den Imaginalscheiben war *ombP4* der einzige PGawB-Stamm, der die endogene *Omb* Expression nicht komplett widerspiegelte (Abassi, 2007). Die Expressionsdomänen in der dorsalen Hälfte der Beinimaginalscheibe, sowie im ventralen Bereich der Antennenimaginalscheibe fehlten.

Alle weiteren PlacW und PGalW Enhancer-Trap Insertionen gaben die endogene Omb Expression in den Imaginalscheiben zum größten Teil wieder (Abassi, 2007; Tsai et al., 1997), im pupalen Abdomen jedoch nicht.

Es gibt einige Mögliche Erklärungen für das spezielle Verhalten der ombP4 Insertion. ombP4 ist an Position 12 282 des *omb*-Locus inseriert. Die umgebende Region wurde in den Enhancer-Reporter Fragmenten pomb20 und pomb27A kloniert (Sivasankaran et al., 2000; diese Arbeit). Bei dem „Landeanflug“ des P-Elements könnten Enhancer, die für die Expression in der dorsalen Bein- und der ventralen Antennenimaginalscheibe sowie in den pupalen Tergiten verantwortlich sind, zerstört worden sein. Da in den umliegenden Regionen, pomb20 und pomb27A, keine spezifischer Enhancer für einen dieser Bereiche enthalten sind (Abassi, 2007), kann dies nicht für das Phänomen verantwortlich sein. Nur eine weitere Region im *omb*-Locus, die etwa 40kb stromabwärts der ombP4 Insertion liegt, treibt Reporterexpression in allen drei erwähnten Geweben (ombTU10). Eine Sequenzierung dieses Bereichs des ombP4 Stammes müsste Aufschluss über Defekte dieses Bereichs geben.

Eine weitere Möglichkeit ist die Orientierung der ombP4 Insertion. Als einzige der PGawB Insertionen liegt ombP4 in der Orientierung der Transkriptionsrichtung von *omb*. PGawB könnte Isolatoren enthalten, die eine Kommunikation zwischen den proximalen Enhancern von *omb* und dem P-Element Promotor verhindern. Bei einer reversen Orientierung von PGawB könnte diese stattfinden. Dies ist jedoch relativ unwahrscheinlich, da zahlreiche Enhancer auch stromabwärts der ombP4 Insertion liegen.

Eine Erklärung für die ausbleibende Expression der PlacW und PGalW Insertionen im pupalen Abdomen könnte sein, dass die Promotorregionen dieser Insertionen nicht mit den Tergitenehancer-Regionen interagieren und somit keine Reporterexpression aktiviert wird.

5 Zusammenfassung

Die zeitliche und räumliche Expression von Genen trägt zu einem entscheidenden Ausmaß zu der Entwicklung eines Organismus bei. Unter vielen Faktoren spielt dabei die transkriptionelle Regulation eine wichtige Rolle. Diese basiert auf Anwesenheit und Binden von regulatorischen Proteinen an *cis*-regulatorischen Sequenzen (CRMs) und deren Einfluss auf die Transkriptionsmaschinerie am Promotor. Veränderungen der CRMs können zu Veränderungen der Genexpression führen, und somit einen Beitrag zur morphologischen Evolution leisten.

In dieser Arbeit wurde die transkriptionelle Regulation des *Drosophila melanogaster* Gens *optomotor-blind* insbesondere in den pupalen Tergiten untersucht. In einem Enhancer-Reporter *screen* wurde eine regulatorische Region in Intron IV, die Reporter-Gen-Expression in den pupalen Tergiten treibt, identifiziert. Große Teile dieser Region (ombTU10 und ombTU11) trieben Reporter-Gen-Expression in einem *omb*-ähnlichen Muster. Eine weitere Region (ombTU12) trieb Expression in einem für Hh-Zielgene typischen Expressionsmuster. Für ombTU12 konnte eine Hh-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Die für Hh-Zielgene typische Enhanceraktivität konnte in dem Subfragment ombTU12Amin lokalisiert werden, welches zwei konservierte Bindestellen des Effektors der Hh-Signaltransduktionskaskade, Cubitus interruptus (Ci), enthält. Eine deutliche Abhängigkeit der Expression dieses Fragments von den Ci-Bindestellen konnte bisher aber noch nicht nachgewiesen werden.

Deletionen verschiedener Bereiche dieser Tergitenehancer-Region aus dem endogenen Gen sollten Aufschluss über deren Notwendigkeit in der Regulation von *omb* geben. Die Deletion des Fragments ombTU10 (Δ ombTU10-2) führte zu einer Variabilität in der Pigmentierung der Abdominalsegmente A5 und A6 der Weibchen. Eine Deletion von Teilen des *hh*-responsiven Fragments ombTU12 (Δ ombTU12A) zeigte keinen abdominalen Phänotyp. Dies deutet auf eine redundante Wirkung der Fragmente untereinander, oder mit einem weiteren bisher nicht identifizierten Tergitenehancer im *omb*-Locus hin.

Fragmente, die in den pupalen Tergiten Reporter-Gen-Expression trieben, waren zum Teil auch in Imaginalscheiben von Larven aktiv. Desweiteren wurde gezeigt, dass Fragmente, die in Isolation Reporter-Gen-Expression trieben, als Fusionskonstrukt mit benachbarten genomischen Sequenzen keine Expression zeigten und somit im genomischen Kontext inaktiv sein können. Demzufolge sind nicht nur Aktivator- sondern auch Repressorregionen für die korrekte Expression eines Gens von Bedeutung.

Die Analyse von *omb* Enhancer-Trap Insertionen zeigte, dass von drei untersuchten Typen (PlacW, PGalW und PGawB) nur Insertionen vom letzteren in den pupalen Tergiten aktiv waren. Von vier PGawB Insertionen waren nur drei aktiv. Es ist denkbar, dass die Orientierung der inaktiven Insertion für die mangelnde Responsivität verantwortlich ist.

6 Literatur

- Abassi, Y.** (2007). Regulation im *Drosophila* Gen *optomotor-blind*: Cis-regulatorische Regionen und Expressionstreue von Enhancer-trap Insertionen. *Bachelorarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Alexandre, C., Jacinto, A. and Ingham, P. W.** (1996). Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev* **10**, 2003-13.
- Arnosti, D. N. and Kulkarni, M. M.** (2005). Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards? *J Cell Biochem* **94**, 890-8.
- Aza-Blanc, P. and Kornberg, T. B.** (1999). Ci: a complex transducer of the hedgehog signal. *Trends Genet* **15**, 458-62.
- Banerji, J., Rusconi, S. and Schaffner, W.** (1981). Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* **27**, 299-308.
- Barolo, S., Carver, L. A. and Posakony, J. W.** (2000). GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*. *Biotechniques* **29**, 726, 728, 730, 732.
- Barth, S.** (2008). *Bachelorarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Bateman, J. R., Lee, A. M. and Wu, C. T.** (2006). Site-specific transformation of *Drosophila* via phiC31 integrase-mediated cassette exchange. *Genetics* **173**, 769-77.
- Beinert, N., Werner, M., Dowe, G., Chung, H. R., Jackle, H. and Schafer, U.** (2004). Systematic gene targeting on the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **113**, 271-5.
- Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., Stephen, S., Kent, W. J., Mattick, J. S. and Haussler, D.** (2004). Ultraconserved elements in the human genome. *Science* **304**, 1321-5.
- Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M. et al.** (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* **167**, 761-81.
- Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E. et al.** (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes Dev* **3**, 1273-87.
- Binbas, H.** (2009). Identifizierung potentieller *Tbx*-Zielgene im *Drosophila*-Genom unter Einsatz bioinformatischer und molekulargenetischer Methoden. *Diplomarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K.** (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3312-7.
- Bischoff, M. and Cseresnyes, Z.** (2009). Cell rearrangements, cell divisions and cell death in a migrating epithelial sheet in the abdomen of *Drosophila*. *Development* **136**, 2403-11.
- Bongers, E. M., Duijf, P. H., van Beersum, S. E., Schoots, J., Van Kampen, A., Burckhardt, A., Hamel, B. C., Losan, F., Hoefsloot, L. H., Yntema, H. G. et al.** (2004). Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome. *Am J Hum Genet* **74**, 1239-48.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Brisson, J. A., Templeton, A. R. and Duncan, I.** (2004). Population genetics of the developmental gene *optomotor-blind* (*omb*) in *Drosophila polymorpha*: evidence for a role in abdominal pigmentation variation. *Genetics* **168**, 1999-2010.
- 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.
- Butler, M. J., Jacobsen, T. L., Cain, D. M., Jarman, M. G., Hubank, M., Whittle, J. R., Phillips, R. and Simcox, A.** (2003). Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* **130**, 659-70.

- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G.** (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-5.
- Campbell, G. and Tomlinson, A.** (1999). Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of *Drosophila*: regulation of Dpp targets by brinker. *Cell* **96**, 553-62.
- 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.
- Chen, Y. and Struhl, G.** (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**, 553-63.
- Dejardin, J., Rappailles, A., Cuvier, O., Grimaud, C., Decoville, M., Locker, D. and Cavalli, G.** (2005). Recruitment of *Drosophila* Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. *Nature* **434**, 533-8.
- Dobrovolskia-Zavadskia.** (1927). Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouvelle et sur l'existence d'un caractère héréditaire 'non-viable'.
- Dominguez, M., Brunner, M., Hafen, E. and Basler, K.** (1996). Sending and receiving the hedgehog signal: control by the *Drosophila* Gli protein Cubitus interruptus. *Science* **272**, 1621-5.
- Dorner, C.** (2008). *Cis-* und *trans-*Regulation bei *Drosophila* T-Box Genen. *Doktorarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Dorsett, D.** (1993). Distance-independent inactivation of an enhancer by the suppressor of Hairy-wing DNA-binding protein of *Drosophila*. *Genetics* **134**, 1135-44.
- Dunipace, L., Ozdemir, A. and Stathopoulos, A.** (2011). Complex interactions between cis-regulatory modules in native conformation are critical for *Drosophila* snail expression. *Development* **138**, 4075-84.
- Eichinger, F.** (2011). Molekulargenetische Charakterisierung potentieller TBX Zielgene in *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Engels, W. R.** (2000). Reversal of fortune for *Drosophila* geneticists? *Science* **288**, 1973-5.
- Epple, S.** (2011). *Drosophila melanogaster optomotor-blind*: Suche nach omb-Kontrollelementen und Omb-Zielgenen. *Bachelorarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Gerlitz, O., Nellen, D., Ottiger, M. and Basler, K.** (2002). A screen for genes expressed in *Drosophila* imaginal discs. *Int J Dev Biol* **46**, 173-6.
- Geyer, P. K. and Corces, V. G.** (1992). DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev* **6**, 1865-73.
- Geyer, P. K., Green, M. M. and Corces, V. G.** (1988). Mutant gene phenotypes mediated by a *Drosophila melanogaster* retrotransposon require sequences homologous to mammalian enhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8593-7.
- Golic, K. G.** (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* **252**, 958-61.
- Gong, W. J. and Golic, K. G.** (2003). Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2556-61.
- Gong, W. J. and Golic, K. G.** (2004). Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster* Hsp70 genes. *Genetics* **168**, 1467-76.
- Grimaud, C., Bantignies, F., Pal-Bhadra, M., Ghana, P., Bhadra, U. and Cavalli, G.** (2006). RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell* **124**, 957-71.
- 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.
- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R. and Calos, M. P.** (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics* **166**, 1775-82.
- Guillen, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sanchez-Herrero, E., Morata, G. and Guerrero, I.** (1995). The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development* **121**, 3447-56.
- Hau, A.-C.** (2010). Migration mediating potential of *Optomotor-blind* and further characterization of the *optomotor-blind* optic lobe regulatory region. *Diplomarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.

- Heindel, U.** (1998). Untersuchungen zur Omb Funktion bei *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- Heisenberg, M. W., R.; Wolf, R.** (1978). Optomotor-blindH31 - a *Drosophila* mutant of the lobula plate giant neurons. *J. Comp. Physiology* **124**, 287-296.
- Hepker, J., Wang, Q. T., Motzny, C. K., Holmgren, R. and Orenic, T. V.** (1997). *Drosophila cubitus interruptus* forms a negative feedback loop with patched and regulates expression of Hedgehog target genes. *Development* **124**, 549-58.
- Hoffmann, I.** (2011). Untersuchung potentieller Zielgene von Optomotor-blind bei *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Hofmeyer, K.** (2001). The optic lobe regulatory region of the *Drosophila melanogaster* gene *optomotor-blind*. *Doktorarbeit. Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- Hofmeyer, K., Kretzschmar, D. and Pflugfelder, G. O.** (2008). Optomotor-blind expression in glial cells is required for correct axonal projection across the *Drosophila* inner optic chiasm. *Dev Biol* **315**, 28-41.
- Hong, J. W., Hendrix, D. A. and Levine, M. S.** (2008). Shadow enhancers as a source of evolutionary novelty. *Science* **321**, 1314.
- Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A. M. and Hong, Y.** (2009). From the Cover: Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8284-9.
- Huang, J., Zhou, W., Watson, A. M., Jan, Y. N. and Hong, Y.** (2008). Efficient ends-out gene targeting in *Drosophila*. *Genetics* **180**, 703-7.
- Ingham, P. W.** (1993). Localized hedgehog activity controls spatial limits of wingless transcription in the *Drosophila* embryo. *Nature* **366**, 560-2.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K. and Levine, M.** (1992). dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **6**, 1518-30.
- Istrail, S. and Davidson, E. H.** (2005). Logic functions of the genomic cis-regulatory code. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4954-9.
- 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.
- Jaenisch, R. and Bird, A.** (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**, 245-54.
- Jones, W. D., Cayirlioglu, P., Kadow, I. G. and Vosshall, L. B.** (2007). Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. *Nature* **445**, 86-90.
- Kayar, H.** (2012). Charakterisierung potentieller *Tbx*-kontrollierter Enhancer im Genom von *Drosophila melanogaster*. *Bachelorarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Kim, A., Terzian, C., Santamaria, P., Pelisson, A., Purd'homme, N. and Bucheton, A.** (1994). Retroviruses in invertebrates: the gypsy retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1285-9.
- Kim, J., Johnson, K., Chen, H. J., Carroll, S. and Laughon, A.** (1997). *Drosophila* Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* **388**, 304-8.
- Kim, J., Sebring, A., Esch, J. J., Kraus, M. E., Vorwerk, K., Magee, J. and Carroll, S. B.** (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* **382**, 133-8.
- Kirk, E. P., Sunde, M., Costa, M. W., Rankin, S. A., Wolstein, O., Castro, M. L., Butler, T. L., Hyun, C., Guo, G., Otway, R. et al.** (2007). Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **81**, 280-91.
- 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.
- Knipple, D. C. and MacIntyre, R. J.** (1984). Cytogenic mapping and isolation of mutations of the beta-Gal-1 locus of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **198**, 75-83.
- Kopp, A., Blackman, R. K. and Duncan, I.** (1999). Wingless, decapentaplegic and EGF receptor signaling pathways interact to specify dorso-ventral pattern in the adult abdomen of *Drosophila*. *Development* **126**, 3495-507.
- Kopp, A. and Duncan, I.** (1997). Control of cell fate and polarity in the adult abdominal segments of *Drosophila* by optomotor-blind. *Development* **124**, 3715-26.
- Kopp, A. and Duncan, I.** (2002). Anteroposterior patterning in adult abdominal segments of *Drosophila*. *Dev Biol* **242**, 15-30.
- Kopp, A., Duncan, I., Godt, D. and Carroll, S. B.** (2000). Genetic control and evolution of sexually dimorphic characters in *Drosophila*. *Nature* **408**, 553-9.
- Kopp, A., Muskavitch, M. A. and Duncan, I.** (1997). The roles of hedgehog and engrailed in patterning adult abdominal segments of *Drosophila*. *Development* **124**, 3703-14.
- 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.
- Landy, A.** (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* **58**, 913-49.
- Lausch, E., Hermanns, P., Farin, H. F., Alanay, Y., Unger, S., Nikkel, S., Steinwender, C., Scherer, G., Spranger, J., Zabel, B. et al.** (2008). TBX15 mutations cause craniofacial dysmorphism, hypoplasia of scapula and pelvis, and short stature in Cousin syndrome. *Am J Hum Genet* **83**, 649-55.
- Lawrence, P. A. and Struhl, G.** (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *drosophila*? *Cell* **85**, 951-61.
- Lee, J. J., von Kessler, D. P., Parks, S. and Beachy, P. A.** (1992). Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. *Cell* **71**, 33-50.
- Levine, M. and Davidson, E. H.** (2005). Gene regulatory networks for development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4936-42.
- Levis, R., Hazelrigg, T. and Rubin, G. M.** (1985). Effects of genomic position on the expression of transduced copies of the white gene of *Drosophila*. *Science* **229**, 558-61.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-70.
- Ma, C., Zhou, Y., Beachy, P. A. and Moses, K.** (1993). The segment polarity gene hedgehog is required for progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **75**, 927-38.
- Madhavan, M. M. and Madhavan, K.** (1980). Morphogenesis of the epidermis of adult abdomen of *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* **60**, 1-31.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.** (1982). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Manoli, D. S., Foss, M., Villella, A., Taylor, B. J., Hall, J. C. and Baker, B. S.** (2005). Male-specific fruitless specifies the neural substrates of *Drosophila* courtship behaviour. *Nature* **436**, 395-400.
- Mayer, L.** (2008). Analyse der Enhancer Region des Gens *optomotor-blind* von *Drosophila*. *Diplomarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y. and Kingston, R. E.** (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-87.
- Negre, N., Brown, C. D., Ma, L., Bristow, C. A., Miller, S. W., Wagner, U., Kheradpour, P., Eaton, M. L., Loriaux, P., Sealfon, R. et al.** (2011). A cis-regulatory map of the *Drosophila* genome. *Nature* **471**, 527-31.
- Nickoloff, J. A. and Reynolds, R. J.** (1990). Transcription stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **10**, 4837-45.
- Ninov, N., Chiarelli, D. A. and Martin-Blanco, E.** (2007). Extrinsic and intrinsic mechanisms directing epithelial cell sheet replacement during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **134**, 367-79.

- Ninov, N., Menezes-Cabral, S., Prat-Rojo, C., Manjon, C., Weiss, A., Pyrowolakis, G., Affolter, M. and Martin-Blanco, E.** (2010). Dpp signaling directs cell motility and invasiveness during epithelial morphogenesis. *Curr Biol* **20**, 513-20.
- O'Kane, C. J. and Gehring, W. J.** (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9123-7.
- Oktaba, K., Gutierrez, L., Gagneur, J., Girardot, C., Sengupta, A. K., Furlong, E. E. and Muller, J.** (2008). Dynamic regulation by polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in *Drosophila*. *Dev Cell* **15**, 877-89.
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W. and Rothstein, R. J.** (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6354-8.
- Packham, E. A. and Brook, J. D.** (2003). T-box genes in human disorders. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 1**, R37-44.
- Papaioannou, V. E.** (2001). T-box genes in development: from hydra to humans. *Int Rev Cytol* **207**, 1-70.
- Papaioannou, V. E. and Silver, L. M.** (1998). The T-box gene family. *Bioessays* **20**, 9-19.
- Parker, D. S., White, M. A., Ramos, A. I., Cohen, B. A. and Barolo, S.** (2011). The cis-regulatory logic of Hedgehog gradient responses: key roles for gli binding affinity, competition, and cooperativity. *Sci Signal* **4**, ra38.
- Peter, A., Schottler, P., Werner, M., Beinert, N., Dowe, G., Burkert, P., Mourkioti, F., Dentzer, L., He, Y., Deak, P. et al.** (2002). Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep* **3**, 34-8.
- Pfeiffer, B. D., Jenett, A., Hammonds, A. S., Ngo, T. T., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J. W., Wan, K. H., Laverly, T. R. et al.** (2008). Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9715-20.
- Pflugfelder, G. O.** (2009). omb and circumstance. *J Neurogenet* **23**, 15-33.
- 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.** (1992). 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., 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.
- Pirrotta, V.** (1999). Transvection and chromosomal trans-interaction effects. *Biochim Biophys Acta* **1424**, M1-8.
- 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.
- Prud'homme, B., Gompel, N. and Carroll, S. B.** (2007). Emerging principles of regulatory evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104 Suppl 1**, 8605-12.
- Rebeiz, M., Pool, J. E., Kassner, V. A., Aquadro, C. F. and Carroll, S. B.** (2009). Stepwise modification of a modular enhancer underlies adaptation in a *Drosophila* population. *Science* **326**, 1663-7.
- Riddiford, L. M.** (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor* **3**, 203-9.
- Ringrose, L., Rehmsmeier, M., Dura, J. M. and Paro, R.** (2003). Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Dev Cell* **5**, 759-71.
- Robertson, A. B., D.A.; Louw, J.H.** (1977). Variation in abdomen pigmentation in *Drosophila melanogaster* females. *Genetica*, 73-76.
- Rong, Y. S. and Golic, K. G.** (2000). Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* **288**, 2013-8.

- Rong, Y. S., Titen, S. W., Xie, H. B., Golic, M. M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B. M., Brodsky, M., Rubin, G. M. and Golic, K. G. (2002). Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev* **16**, 1568-81.
- Rowley, M., Grothey, E. and Couch, F. J. (2004). The role of Tbx2 and Tbx3 in mammary development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 109-18.
- Roy, S., Ernst, J., Kharchenko, P. V., Kheradpour, P., Negre, N., Eaton, M. L., Landolin, J. M., Bristow, C. A., Ma, L., Lin, M. F. et al. (2010). Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science* **330**, 1787-97.
- Rubin, G. M. and Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-53.
- Ruvinsky, I., Silver, L. M. and Gibson-Brown, J. J. (2000). Phylogenetic analysis of T-Box genes demonstrates the importance of amphioxus for understanding evolution of the vertebrate genome. *Genetics* **156**, 1249-57.
- 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.
- Sagai, T., Hosoya, M., Mizushina, Y., Tamura, M. and Shiroishi, T. (2005). Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb. *Development* **132**, 797-803.
- Sanchez, L., Gorfinkiel, N. and Guerrero, I. (2001). Sex determination genes control the development of the *Drosophila* genital disc, modulating the response to Hedgehog, Wingless and Decapentaplegic signals. *Development* **128**, 1033-43.
- Sanicola, M., Sekelsky, J., Elson, S. and Gelbart, W. M. (1995). Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal disks: negative regulation of decapentaplegic and patched expression by engrailed. *Genetics* **139**, 745-56.
- Sato, K. and Siomi, H. (2010). Is canalization more than just a beautiful idea? *Genome Biol* **11**, 109.
- Schrack, K. (2011). *Drosophila melanogaster optomotor-blind*: Suche nach omb-Kontrollelementen und Omb-Zielgenen Bachelorarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.
- Schwartz, C., Locke, J., Nishida, C. and Kornberg, T. B. (1995). Analysis of cubitus interruptus regulation in *Drosophila* embryos and imaginal disks. *Development* **121**, 1625-35.
- Schwartz, Y. B., Kahn, T. G., Stenberg, P., Ohno, K., Bourgon, R. and Pirrotta, V. (2010). Alternative epigenetic chromatin states of polycomb target genes. *PLoS Genet* **6**, e1000805.
- Segalat, L., Berger, G. and Lepesant, J. A. (1994). Dissection of the *Drosophila* pourquoi-pas? promoter: complex ovarian expression is driven by distinct follicle cell- and germ line-specific enhancers. *Mech Dev* **47**, 241-51.
- Sen, A., Gadomski, C., Balles, J., Abassi, Y., Dorner, C. and Pflugfelder, G. O. (2010). Null mutations in *Drosophila* Optomotor-blind affect T-domain residues conserved in all Tbx proteins. *Mol Genet Genomics* **283**, 147-56.
- Shen, J. and Dahmann, C. (2005). The role of Dpp signaling in maintaining the *Drosophila* anteroposterior compartment boundary. *Dev Biol* **279**, 31-43.
- Shen, J., Dahmann, C. and Pflugfelder, G. O. (2010). Spatial discontinuity of optomotor-blind expression in the *Drosophila* wing imaginal disc disrupts epithelial architecture and promotes cell sorting. *BMC Dev Biol* **10**, 23.
- Shen, J., Dorner, C., Bahlo, A. and Pflugfelder, G. O. (2008). optomotor-blind suppresses instability at the A/P compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Mech Dev* **125**, 233-46.
- Sinclair, C. S., Adem, C., Naderi, A., Soderberg, C. L., Johnson, M., Wu, K., Wadum, L., Couch, V. L., Sellers, T. A., Schaid, D. et al. (2002). TBX2 is preferentially amplified in BRCA1- and BRCA2-related breast tumors. *Cancer Res* **62**, 3587-91.
- 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.
- Struhl, G., Barbash, D. A. and Lawrence, P. A. (1997). Hedgehog organises the pattern and polarity of epidermal cells in the *Drosophila* abdomen. *Development* **124**, 2143-54.

- Sun, Y. H., Tsai, C. J., Green, M. M., Chao, J. L., Yu, C. T., Jaw, T. J., Yeh, J. Y. 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**, 1075-86.
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. and Kornberg, T. B.** (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development* **121**, 3359-69.
- Tang, C. Y. and Sun, Y. H.** (2002). Use of mini-white as a reporter gene to screen for GAL4 insertions with spatially restricted expression pattern in the developing eye in *Drosophila*. *Genesis* **34**, 39-45.
- Teleman, A. A., Maitra, S. and Cohen, S. M.** (2006). *Drosophila* lacking microRNA miR-278 are defective in energy homeostasis. *Genes Dev* **20**, 417-22.
- 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.
- Thyagarajan, B., Johnson, B. L. and Campbell, C.** (1995). The effect of target site transcription on gene targeting in human cells in vitro. *Nucleic Acids Res* **23**, 2784-90.
- Tower, J.** (2004). Developmental gene amplification and origin regulation. *Annu Rev Genet* **38**, 273-304.
- Tsai, S. F., Jang, C. C., Prikhod'ko, G. G., Bessarab, D. A., Tang, C. Y., Pflugfelder, G. O. and Sun, Y. H.** (1997). Gypsy retrotransposon as a tool for the in vivo analysis of the regulatory region of the optomotor-blind gene in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3837-41.
- Von Ohlen, T., Lessing, D., Nusse, R. and Hooper, J. E.** (1997). Hedgehog signaling regulates transcription through cubitus interruptus, a sequence-specific DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2404-9.
- White, K., Tahaoglu, E. and Steller, H.** (1996). Cell killing by the *Drosophila* gene reaper. *Science* **271**, 805-7.
- Wilson, V. and Conlon, F. L.** (2002). The T-box family. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3008.
- Xiong, N., Kang, C. and Raulet, D. H.** (2002). Redundant and unique roles of two enhancer elements in the TCRgamma locus in gene regulation and gammadelta T cell development. *Immunity* **16**, 453-63.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 2265-78.

7 Anhang

7.1 In dieser Arbeit hergestellte Fliegenstämme

Bezeichnung	Stamm	Chromosom	Zweck
pomb 25A	1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	3B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	6B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
pomb 27A	1-1A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	1-2A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	3-2A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	3-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5-1A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	6-1A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	6-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	6-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	7-1A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	7-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
ombA	1-2A	II	Enhancer-Reporter Analyse
	2-1A	II	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1A	III	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1C, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	3-2C, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	4-2B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
Jmin+WRE	1-1aA, homo	III	Enhancer-Reporter Analyse
	1-2aA, homo	n.d.	Enhancer-Reporter Analyse
	2-1C, Tb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	2-2A, homo	n.d.	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1A, homo	III	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1C, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	4-1B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	5-1A, homo	II	Enhancer-Reporter Analyse
	5-1B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	5-2A, homo	n.d.	Enhancer-Reporter Analyse
	6-1A, homo	II	Enhancer-Reporter Analyse
	6-1B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	7-2aA, homo	n.d.	Enhancer-Reporter Analyse

	8-1F, FM-GFP	X	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU8	1-1C, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	1-2A, homo	X	Enhancer-Reporter Analyse
	1-2F, FM-GFP	X	Enhancer-Reporter Analyse
	2-2B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1C, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	3-2A, homo	III	Enhancer-Reporter Analyse
	3-2C, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	4-1A, homo	II	Enhancer-Reporter Analyse
	4-1B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	4-2A, homo	II	Enhancer-Reporter Analyse
	4-2B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU9	1-1A, homo	III	Enhancer-Reporter Analyse
	1-1C, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	1-2A, homo	II	Enhancer-Reporter Analyse
	1-2A, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	2-1A, homo	II	Enhancer-Reporter Analyse
	2-1B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	2-2A, homo	III	Enhancer-Reporter Analyse
	2-2E, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	4-1A, homo	X	Enhancer-Reporter Analyse
	4-1F, FM-GFP	X	Enhancer-Reporter Analyse
	4-2A, homo	n.d.	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU10	2-2A, homo	III	Enhancer-Reporter Analyse
	2-2C, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	3-2B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	4-1A, homo	n.d.	Enhancer-Reporter Analyse
	5-1A, homo	II	Enhancer-Reporter Analyse
	5-1B, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	6-2aA, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	7-1A, homo	n.d.	Enhancer-Reporter Analyse
	7-2A, homo	X	Enhancer-Reporter Analyse
	7-2F, FM-GFP	X	Enhancer-Reporter Analyse
	8-2A, homo	n.d.	Enhancer-Reporter Analyse
	9-1F, FM-GFP	X	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU10A	1-1B, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	1-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	1-2B, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	1-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2-2B, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU10B	GOP 765	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse

	GOP 767	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	GOP 769	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	GOP 770	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	GOP 772	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU10C	3B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	4B, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	4B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	6B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU11	1-1D, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	1-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2-1A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2-2A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU12	1-1C, Tb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	1-2C, Tb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1aA, homo	III	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1bA, homo	III	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1bC, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	4-2C, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
	5-2aA, homo	X	Enhancer-Reporter Analyse
	5-2aF, FM-GFP	X	Enhancer-Reporter Analyse
	6-1aB, CyO	II	Enhancer-Reporter Analyse
	7-1C, Sb	III	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU12A	1-1aA, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	1-1aB, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	3-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	4-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	4-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	6-1aB, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	7-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	7-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	8-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	8-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU12B	1-1B, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	1-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2-1B, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	4-1B, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5-1.1B, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5-1.1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5-1.2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse

ombTU12C	1-1aB, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	1-1bB, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2-2A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	3-2A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	3-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	4-2A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	4-2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5-1A, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5-1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU12Amin	1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	3B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU12Amin Δ TBE20	1B, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	3B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU12Amin Δ TBE20,Ci21	3B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	4B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	5B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	6B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	11B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU12Amin Δ Mad	1B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2B, homo	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	2B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	3B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	4B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
	6B, CyO	II (58A)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU12Amin-Ci22oligo	2B, CyO	II (25C6)	Enhancer-Reporter Analyse
	3B, CyO	II (25C6)	Enhancer-Reporter Analyse
	5B, CyO	II (25C6)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU12Amin-Ci22mut	1B, CyO	II (25C6)	Enhancer-Reporter Analyse
	2B, CyO	II (25C6)	Enhancer-Reporter Analyse
	3B, CyO	II (25C6)	Enhancer-Reporter Analyse
	4B, CyO	II (25C6)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU12Amin Δ TBE20,Ci21-Ci22mut	1B, CyO	II (25C6)	Enhancer-Reporter Analyse
	2B, CyO	II (25C6)	Enhancer-Reporter Analyse
	4B, CyO	II (25C6)	Enhancer-Reporter Analyse
ombTU10; hhts/TM6,Tb			Test der Hh-Abhängigkeit von ombTU10
ombTU12; hhts/TM6, Tb			Test der Hh-Abhängigkeit von ombTU12
del donor ombTU10-1	1-1A, homo	X	Deletions Donorlinie für

			homologe Rekombination
	1-1F, FM-GFP	X	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	2-1B, CyO	II	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	2-2B, CyO	II	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	3-1A, homo	II	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
del donor ombTU10-2	2-1C, Sb	III	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	2-2C, Sb	III	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	3-1C, Sb	III	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	4-1B, CyO	II	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
del donor ombTU12A	GOP 630	II	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	GOP 640 1-2A, CyO	II	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	GOP 642 5-1B	II	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	GOP 673	II	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	GOP 674 8-1B	II	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	GOP 675	II	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	GOP 960 10-4	II	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
	GOP 962	III	Deletions Donorlinie für homologe Rekombination
Δ ombTU10-2	homo	X	Deletionslinie ombTU10-2
	FM-GFP	X	Deletionslinie ombTU10-2
Δ ombTU12A	A1, FM-GFP	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot letal
	A1, FM7	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot letal
	B1, FM-GFP	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot letal
	B2, FM-GFP	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot letal
	B2, FM7	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot letal
	C1-1, homo, yw	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot lebensfähig
	C1-1, FM-GFP	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot lebensfähig
	C1-2, homo, yw	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot lebensfähig

	C1-2, FM-GFP	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot lebensfähig
	C1-3, homo, yw	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot lebensfähig
	C1-3, FM-GFP	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot lebensfähig
	C2, homo	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot lebensfähig
	C2, homo, yw	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot lebensfähig
	C2, FM-GFP	X	Deletionslinie ombTU12A homozygot lebensfähig

7.2 Verwendete Oligonukleotide

Nr.	Sequenz	bp	Zweck	Name
451	CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT	24	P-element ampl primer; 5' out (s. BDGP)	plac1
477	CAA TCA TAT CGC TGT CTC ACT CA	23	downstream gerichteter PCR primer aus dem 3' ende von PGawB oder PlacW bis zum Ende des p-El. werden 131 bp amplific.	Pry4
580	ACT GTG CGT TAG GTC CTG TTC ATT GTT	27	primer für iPCR vonp-Elementen	plac4
818	AGACTGGATCCGCAATAA AGTGAATATGGCGAAGT A	36	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis XIII,35-1	us-omb30012for
819	AGACTGGATCCCCGTGT CCCGCCCTTTGTAGTTCT	36	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis XIII,35-1	us-omb34157rev
832	TGTGCTCTCCCCTCAACG AGTG	22	subcloning of region from omb missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis pomb27	omb-TU-12226for
833	GACACCTGGCCAGACGT ATTCC	22	subcloning of region from omb-us missing in Sivasankaran enhancer reporter analysis pomb27	omb-TU-17879rev
880	ACGCCAGGGTTTTCCAG TCA	21	for sequencing of CPLZ inserts rev comp is:	lacZ-5-out2 (rev)

			TGACTGGGAAAACCCTGGCGT	
931	AGTTAGGTACC TTTAAGTGCCGCTGGTCA CGTT	33	for enhancer analysis of omb intron 4. S. Barth Bachelor 2007	ombTu8-for
932	AGTTAGGTACC TCGCAATTTGTCATCGCC TTGA	33	for enhancer analysis of omb intron 4. S. Barth Bachelor 2007	ombTu8-rev
933	AGTTAGGTACC CACCGAAAGCACCTATA CTCT	33	for enhancer analysis of omb intron 4. S. Barth Bachelor 2007	ombTu9-for
934	AGTTAGGTACC CAGGCCAAAACAAATTCG AACT	33	for enhancer analysis of omb intron 4. S. Barth Bachelor 2007	ombTu9-rev
935	GTGTGTATGAAACCGGTC GGTC	22	for enhancer analysis of omb intron 4. S. Barth Bachelor 2007	ombTu10-for
936	ACACCATACATTTGCGTC GAAT	22	for enhancer analysis of omb intron 4. S. Barth Bachelor 2007	ombTu10-rev
937	AGTTAGGTACC TTTGGTGGACAATCGCTT AATG	33	for enhancer analysis of omb intron 4. S. Barth Bachelor 2007	ombTu11-for
938	AGTTAGGTACC TTTGTTGCTACAGCGAAC GAAC	33	for enhancer analysis of omb intron 4. S. Barth Bachelor 2007	ombTu11-rev
939	AGTTAGGTACC GCTTGATTGAATGCGCAG TTCT	33	for enhancer analysis of omb intron 4. S. Barth Bachelor 2007	ombTu12-for
940	AGTTAGGTACC GGCCATGTGGATACAGG TAAGG	33	for enhancer analysis of omb intron 4. S. Barth Bachelor 2007	ombTu12-rev
982	AAGGAAAGTAAAGGGGA CTCTC	22	for subcloning of KH WRE including potential distal repressor elements	ombWRE-JK- 52for
983	TGCGACAGCATTCAATTA AGTT	22	for subcloning of KH WRE including potential distal repressor elements	ombWRE-JK- 512rev
1002	AACACACTGGTTTCCGCC TGA	21	remake of primers for bi loc	bifid985for

1003	ATTGCTCTGTAAACGCGA ATG	21	remake of primers for bi loc	bifid2156rev
1004	GGATTCGCGGAGGAGAT CGTA	21	remake of primers for bi loc	bifid1824for
1005	CTGAGGCCAAAGGAAGT TGCT	21	remake of primers for bi loc	bifid3065rev
1006	ACTCGTATATGGATGCGT GTA	21	remake of primers for bi loc	bifidfor2886
1007	AAATGCGCCAAATTGTTA GAC	21	remake of primers for bi loc	bifidrev3784
1016	CAAATAACCGGGCCAAG ACGA	21	iPCR strategy for bi characterization -LM	bifid526rev
1017	GGCTATTATCATTTCGCGT TTA	21	iPCR strategy for bi characterization -LM	bifid2147for
1018	GGTCCTAGGCGGCTACG ATCT	21	iPCR strategy for bi characterization -LM	bifid1837rev
1025	GTCCTTAAACAAAGCGTG GTG	21	potential PCR primers for ampl of 412 element in bi LM	bi412-1216for
1027	GACTATTCGCGGCACATA ACA	21	potential PCR primers for ampl of 412 element in bi LM	bi412-6147for
1028	TCCGATTTGTTGCGCTT GAG	21	potential PCR primers for ampl of 412 element in bi LM	bi412-8900rev
1040	AGGTATGTAAAGCGGCTT GTA	21	subcloning of ombTU10 to identify tergite enhancer LM	ombTU10- 1540for
1041	TACGGCAAGGAGATGTA CTTT	21	subcloning of ombTU10 to identify tergite enhancer LM	ombTU10- 3222rev
1042	GAGGCAAGGAAACCAA TATGA	22	subcloning of ombTU10 to identify tergite enhancer LM	ombTU10- 2786for
1044	CAGTTCTTATGCCGATTG AGA	21	subcloning of ombTU12 to identify tergite enhancer LM	ombTU12-16for
1045	AGCACTTGATGACTCCCG TAT	21	subcloning of ombTU12 to identify tergite enhancer LM	ombTU12- 1890rev

1046	ATCCTGAAGCTGCCGTAC TCC	21	subcloning of ombTU12 to identify tergite enhancer LM	ombTU12- 1640for
1047	AATCCAGCCAACGTATCT GAC	21	subcloning of ombTU12 to identify tergite enhancer LM	ombTU12- 4569rev
1048	AAATTGGTGAGAAGCGG TCCT	21	subcloning of ombTU12 to identify tergite enhancer LM	ombTU12- 4496for
1049	CGAGTGGCTGAGCGGGA GTAG	21	subcloning of ombTU12 to identify tergite enhancer LM	ombTU12- 5765rev
1092	AGTTAGGTACCCTTTATG GCCGGCGATCATCC	32	for Lisa omb tergite enhancer deletion project. For cloning flanking homologies into pGX-attP	ombTU63509re v
1093	AGTTAAGATCTTTTCGCC GTTTCAGTTT09-10- 08AGAGT	32	for Lisa omb tergite enhancer deletion project. For cloning flanking homologies into pGX-attP	ombTU65134fo r
1094	AGTTAGGCGCGCCCGGG ACACACATGCGAATGGT	34	for Lisa omb tergite enhancer deletion project. For cloning flanking homologies into pGX-attP	ombTU68494re v
1101	AGTTAGCGGCCGCATATG GCAAGTCAAATAGTGG	34	for Lisa omb tergite enhancer deletion project. For cloning flanking homologies into pGX-attP Initial primer 1091 contained NheI that cannot be used because it is contained in 3' homology	ombTU60326fo rNot
1114	AGTTACTCGAGCGCAAGC AGCCAAGATTTAGAT	33	ombTU10 ends out deletion	ombTU10ush- 547for
1115	AGTTAGGCGCGCCGGTA TCGTTGAGTTTTGGATCG	35	ombTU10 ends out deletion	ombTU10ush- 3765rev
1116	AGTTAGGTACCTTATCGC AGCAAATAGTTGGC	33	ombTU10 ends out deletion	ombTU10dsh- 176for
1117	AGTTAGCGGCCGCCCGG GTGACAACTGATTGAGC	35	ombTU10 ends out deletion	ombTU10dsh- 3421rev
1128	atactgttccgagcaca	18	seq primers for pGX-attP ends-out gene targetting vector	pGX-attP- 1369for
1129	actccggcgctcgtaga	18	seq primers for pGX-attP ends-out gene	pGX-attP-

			targetting vector	4846rev
1131	CAGGAAACAGCTATGAC	17	general plasmid seq primer	M13rev
1132	GTA AACGACGGCCAG	16	general plasmid seq primer	M13FOR
1151	CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT	26	inverse PCR am 3' Ende von placW (aus BDGP) (up)	Pry1
1152	CTT GCC GAC GGG ACC ACC TTA TGT TAT T	28	inverse PCR am 3' Ende von placW (aus BDGP) (down)	Pry2
1168	GCACCCGAAGAGCAGGC GTAT	21	for verification of targeted deletion ombTU12A, LM. source file: ombTU12A del verific primers	ombTU12A-331for
1169	GTTTGCTGCCTCCGCGAA TTA	21	for verification of targeted deletion ombTU12A, LM. source file: ombTU12A del verific primers	ombTU12A-4739rev
1170	CCTCTCATGGTTCCGTTA CGC	21	for verification of targeted deletion ombTU12A, LM. source file: ombTU12A del verific primers	ombTU12A-6531for
1171	TTCACACATCAAAGCCGA AAC	21	for verification of targeted deletion ombTU12A, LM. source file: ombTU12A del verific primers	ombTU12A-10414rev
1172	GCCGATTGAGAGGGGGA TTTA	21	for verification of targeted deletion ombTU12A, LM. source file: ombTU12A del verific primers	ombTU-71-63739for
1173	AATTGCGAATGTGCGGA GTCA	21	for verification of targeted deletion ombTU12A, LM. source file: ombTU12A del verific primers	ombTU-71-65010rev
1184	TTTGCCCGCAATTTATGG ACT	21	for the characterization of deletions in ombTU12A deletion project (LM)	ombTU12A-3725for
1185	GGAAACGCGGCTGGTAC TTGT	21	for the characterization of deletions in ombTU12A deletion project (LM)	ombTU12A-7182rev
1241	CTGCCCCGTTTCCCATTA	18	analysis of ombTU12A-deletion dsH region, because of lethality associated with some of the deletions. Lisa mayer see ombTU12A del verific primers.doc	ombTU65852rev
1247	TGGTGAGAAGCGGTCCT	21	sequencing primer to understand the	ombTU68213fo

	GGAG		mechanism by which lethal mutations arose during the construction of ombTU12A deletion LM, 2nd attempt	r
1248	GCCGGCACCAGTATCACG AAA	21	sequencing primer to understand the mechanism by which lethal mutations arose during the construction of ombTU12A deletion LM, 2nd attempt	ombTU65541rev
1256	AGTTAGGCGCGCCTTTAT CCATTTGCCGAATCGAG	35	back-up attempt for obtaining a smaller ombTU10 deletion (for LM)	ombTU10- 50418for
1257	AGTTAACTAGTAAGGAA GCGACAACCGACCGAC	33	back-up attempt for obtaining a smaller ombTU10 deletion (for LM)	ombTU10- 53722rev
1269	TGCGCTTTATGTGGGTGG	18	ombTU10dsh seq primer	ombTU10dsh- 614for
1270	GCTCCCGCCAATCGACT	18	ombTU10dsh seq primer	ombTU10dsh- 1139for
1271	TTGGTCGGCCGTATTCG	18	ombTU10dsh seq primer	ombTU10dsh- 1691for
1272	AAGCCATCACGCCATCAG	18	ombTU10dsh seq primer	ombTU10dsh- 2342for
1273	TGTGCTGGCCCCGTGAGT	18	ombTU10ush seq primer	ombTU10ush- 809for
1274	TTGGCCCGCTTATCCCTC	18	ombTU10ush seq primer	ombTU10ush- 1541for
1275	GCAAGCAGAACCCGTAC A	18	ombTU10ush seq primer	ombTU10ush- 2273for
1276	GGCTGGCTGGCAAAAGG T	18	ombTU10ush seq primer	ombTU10ush- 2833for
1312	CGGCGGCTCAATCAGTTT GTC	21	iPCR primers for determination of insertion site of striped eye non-homologous recombinant, Lisa	ombTU10- 1dsh-3241for
1313	GCTGTCGCCGTTGTTGTC TTT	21	iPCR primers for determination of insertion site of striped eye non-homologous recombinant, Lisa	ombTU10- 1dsh-2869rev
1314	TTTCGGGCCGGGCTAATT	21	iPCR primers for determination of	ombTU10-1-

	GAT		insertion site of striped eye non-homologous recombinant, Lisa	ush-425for
1315	TTGGGTTGGGCTCCGAG CAAA	21	iPCR primers for determination of insertion site of striped eye non-homologous recombinant, Lisa	ombTU10-1-ush-377rev
1324	TGGGCGCGGAAGTGCTA CCTA	21	for LM: third attempt to amplify ombTU10C	ombTU10-3063for
1339	ACTTCTCCGCCCGCATC TGC	21	for verification of pGX-attP constructs (suspicion of defective reaper gene), LM	pGX-attP-4353for
1340	CCCGTCGCTGGCCATATT TAG	21	for verification of pGX-attP constructs (suspicion of defective reaper gene), LM	pGX-attP-5485rev
1345	TGTGACTCCCGCAAGCGA AGG	21	primer for verification of intactness of UAS-reaper region in pGX-attP derivatives (lisa)	pGX-attP-5200rev
1346	CGACGCAAGGAGTAGCC GACA	21	primer for verification of intactness of UAS-reaper region in pGX-attP derivatives (lisa)	pGX-attP-4451for
1347	AGTTAGCGGCCGCAATCT ACCTGATCCGGCAACT	34	primer for amplific of ush and dsh to create ombV+ VI deletion LM	ombV-VI-ush-61300for-NotI
1348	AGTTAGGTACCAGGGAG CCCGTGTGCCAATAC	32	primer for amplific of ush and dsh to create ombV+ VI deletion LM	ombV-VI-ush-64644rev-KpnI
1349	AGTTAAGATCTCAGCTTC CGTATTCCTCGAA	32	primer for amplific of ush and dsh to create ombV+ VI deletion LM	ombV-VI-dsh-65794for-BglII
1350	AGTTAGGCGCGCCA GTGCATCGCCCCTGAA	34	primer for amplific of ush and dsh to create ombV+ VI deletion LM	ombV-VI-dsh-68832rev-AscI
1351				
1361	ATCCAAATGCCGCAATCA ACT	21	new rev primer for amplific of ombTU10C (LM)	ombTU10-5527rev
1362	CGCATTAGTCACACCTTC GTT	21	ombTU12A subcloning primer, LM	ombTU12A-296for

1363	AAAAAGATGTGGACGTC AGGA	21	ombTU12A subcloning primer, LM	ombTU12A- 1361rev
1364	CTTCGTTTCTTTGGGCCG AGT	21	ombTU12A subcloning primer, LM	ombTU12A- 310for
1365	GGCGCAGATACAAGATA CAAG	21	ombTU12A subcloning primer, LM	ombTU12A- 393for
1366	CAGCAACAGCAACATCG ACTG	21	ombTU12A subcloning primer, LM	ombTU12A- 1091rev
1367	TCGTGCCTTTTGGTGGGT GGTCGCGTTGC	29	synthetic Ci-S22 from ombTU12A, LM	Ci22-BSfor
1368	ACGAGCAACGCGACCAC CCACCAAAGGC	29	synthetic Ci-S22 from ombTU12A, LM	Ci22-BSrev
1374	ACGTCTGCTCGGCTCGAA CAT	21	rev primer for the sequencing of insertions in pGWattBlacZ (Inkas vector) (reads from attR site) LM	pGWattBlacZ18 74rev
1401	<i>CAGCAAGCAGAACCCGT</i> ACAA	21	LM: verification primer for ombTU10-2 targeted deletion	ombTU- 52688for
1402	<i>GGCGGCTGGCTAATGGT</i> TAGG	21	LM: verification primer for ombTU10-2 targeted deletion	ombTU- 59668rev
1422	CTCGTGCCTTTTGGTGGA TCCTCGCGTTGGCTGTGT TGC	39	for mutagenesis of Ci22 in ombTU12A, LM	ombTU12A- Ci22mutfor
1423	GCAACACAGCCAACGCG AGGATCCACCAAAGGC ACGAG	39	for mutagenesis of Ci22 in ombTU12A, LM	ombTU12A- Ci22mutfrev

7.3 Nukleotidaustausch in der Herstellung des ombTU12A-Deletionskonstrukts

7.3.1 Sequenz von Exon V im ombTU12A-Deletionskonstrukt

Das ombTU12A-Deletionskonstrukts wurde mit Sequenzierungsprimer 1248 sequenziert, der stromaufwärts des Exon V in des *dsh* von ombTU12A bindet und über die Sequenz von Exon V liest. Hier sind Teile des Sequenzalignments der experimentellen Sequenz (obere Sequenz) gegen die genomische Sequenz von Exon V und benachbarten Regionen gezeigt (untere Sequenz). Die wildtypische Sequenz von Exon V ist in blau abgebildet, Nukleotidaustausche in der *dsh* Sequenz in rot.

```

Query 62 TCATCGACTACAAGCTGAGTACTACTCACCTTCTCATTTTGACATGCTGTGACGGCGATG 121
      |||
Sbjct 7338 TCATCGACTACAAGCTGAGTACTACTCACCTTCTCATTTTGATATGCTGTGACGGCGATG 7279

Query 122 AACTCGGTCTCCTTGAAGACGTACGTGCGAAACGTGGAGTACGGCAGCTTCAGGATGTCA 181
      |||
Sbjct 7278 AACTCGGTCTCCTTGAAGACGTACGTGCGAAACGTGGAGTACGGCAGCTTCAGGATGTCA 7219

Query 182 TTGGCTCGCACCAGGTGGGAACGCGGCTGGTACTTGTGCATCGAGTTCAGGATCGTCTGC 241
      |||
Sbjct 7218 TTGGCTCGCACCAGGTGGAAACGCGGCTGGTACTTGTGCATCGAGTTCAGGATCGTCTGC 7159

Query 242 GGGCGGGCAAATAAAAAATAGATGCAAATGGACGGGGGATTAGTAAAATTGTCAGACGGCC 301
      |||
Sbjct 7158 GGGCGGGCAAATAAAAAATAGATGCAAATGGACGGGGGATTAGTAAAATTGTCAGACGGCC 7099

```

7.3.2 Sequenz von Exon V im homozygot letalen Stamm B2

Das PCR-Produkt, das durch Amplifikation mit den Primern 1170/1171 von genomischer DNA des homozygot letalen Stammes B2 erhalten wurde, wurde mit dem Primer 1093 sequenziert. Primer 1170/1171 binden im *white*-Markergen der Donorkassette sowie 3' der Deletion in der *dsh* Region. Ursprünglich diente Primer 1093 zur Amplifikation der *dsh* Region als *forward* Primer. Bei der Sequenzierung wurde also der 5' Bereich der *dsh* ansequenziert. Hier sind Teile des Sequenzalignments der experimentellen Sequenz (obere Sequenz) gegen die genomische Sequenz von Exon V und benachbarten Regionen gezeigt (untere Sequenz). Die wildtypische Sequenz von Exon V ist in blau abgebildet, Nukleotidaustausche in der *dsh* Sequenz in rot.

```

Query 121 ATTTGCCCGCCCGCAGACGATCCTGAACTCGATGCACAAGTACCAGCCGCGTTCCCACCT 180
      |||
Sbjct 7147 ATTTGCCCGCCCGCAGACGATCCTGAACTCGATGCACAAGTACCAGCCGCGTTTCCACCT 7206

Query 181 GGTGCGAGCCAATGACATCCTGAAGCTGCCGTACTCCACGTTTCGCACGTACGTCTTCAA 240
      |||

```

```

Sbjct 7207 GGTGCGAGCCAATGACATCCTGAAGCTGCCGTACTCCACGTTTCGCACGTACGTCTTCAA 7266
Query 241 GGAGACCGAGTTCATCGCCGTCACAGCATGTCAAATGAGAAGGTGAGTAGTACTCAGCT 300
      |||
Sbjct 7267 GGAGACCGAGTTCATCGCCGTCACAGCATATCAAATGAGAAGGTGAGTAGTACTCAGCT 7326
Query 301 TGTAGTCGATGAATCGACCATTAATCGTTTTCTTTCCACAGATAACTCAATTGAAAATC 360
      |||
Sbjct 7327 TGTAGTCGATGAATCGACCATTAATCGTTTTCTTTCCACAGATAACTCAATTGAAAATC 7386

```

7.3.3 Sequenz von Exon V im homozygot lebensfähigen Stamm C2

Das PCR-Produkt, das durch Amplifikation mit den Primern 1170/1171 von genomischer DNA des homozygot lebensfähigen Stammes C2 erhalten wurde, wurde mit dem Primer 1093 sequenziert. Primer 1170/1171 binden im *white*-Markergen der Donorkassette sowie 3' der Deletion in der *dsh* Region. Ursprünglich diente Primer 1093 zur Amplifikation der *dsh* Region als *forward* Primer. Bei der Sequenzierung wurde also der 5' Bereich der *dsh* ansequenziert. Hier sind Teile des Sequenzalignments der experimentellen Sequenz (obere Sequenz) gegen die genomische Sequenz von Exon V und benachbarten Regionen gezeigt (untere Sequenz). Die wildtypische Sequenz von Exon V ist in blau abgebildet.

```

Query 64 TAGCCATGGCCGTCTGACAATTTCACTAATCCCCGTCCATTTGCATCTATTTTTATTG 123
      |||
Sbjct 7092 TAGCCATGGCCGTCTGACAATTTCACTAATCCCCGTCCATTTGCATCTATTTTTATTG 7151

Query 124 CCCGCCCAGACGATCCTGAAGCTCGATGCACAAGTACCAGCCGCGTTTCCACCTGGTGC 183
      |||
Sbjct 7152 CCCGCCCAGACGATCCTGAAGCTCGATGCACAAGTACCAGCCGCGTTTCCACCTGGTGC 7211

Query 184 GAGCCAATGACATCCTGAAGCTGCCGTACTCCACGTTTCGCACGTACGTCTTCAAGGAGA 243
      |||
Sbjct 7212 GAGCCAATGACATCCTGAAGCTGCCGTACTCCACGTTTCGCACGTACGTCTTCAAGGAGA 7271

Query 244 CCGAGTTCATCGCCGTCACAGCATATCAAATGAGAAGGTGAGTAGTACTCAGCTTGTAG 303
      |||
Sbjct 7272 CCGAGTTCATCGCCGTCACAGCATATCAAATGAGAAGGTGAGTAGTACTCAGCTTGTAG 7331

Query 304 TCGATGAATCGACCATTAATCGTTTTCTTTCCACAGATAACTCAATTGAAAATCGATAA 363
      |||
Sbjct 7332 TCGATGAATCGACCATTAATCGTTTTCTTTCCACAGATAACTCAATTGAAAATCGATAA 7391

```

7.3.4 Aminosäuresequenzen Exon V

Wildtypische Exon 5 Aminosäure-Sequenz:

5'3' Frame 1

TILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRITYVFKETEFIAVTA YQNEK

Experimentelle Exon 5 Aminosäure-Sequenz:

TILNSMHKYQPRS HHLVRANDILKLPYSTFRITYVFKETEFIAVTA CQNEK

5'3' Frame 1

Exon V entspricht Position 446-494 des Omb ORFs.

Omb ORF:

```

1  MRYDVQELLL HQSAEDPFAR FANGMAYHPF LQLTQRPTDF SVSLLTAGS
51  NNNNSGNTNS GNNNSNSNNN TNSNTNNTNN LVAVSPTGGG AQLSPQSNHS
101 SSNTTTSNT NNSNNNNNN NSTHNNNNNH TNNNNNNNN TSQKQGHLS
151 TTEEPPSPAG TPPPTIVGLP PIPPPNNNS SSSSNNSASA AAHPSSHPTA
201 AHHSPSTGAA APPAGPTGLP PPTPPHHLQQ QQQQQHPAP PPPPYFPAAA
251 LAALAGSPAG PHPGLYPGGG LRFPPHHPGA HPHAHHLGSA YTTAEDVFLA
301 SAVAHQLHPA MRPLRALQPE DDGVVDDPKV TLEGKDLWEK FHKLGTEMVI
351 TKSGRQMFPO MKFRVSGLDA KAKYILLLDI VAADDYRYKF HNSRWMVAGK
401 ADPEMPKRMV IHPDSPTTGE QWMQKVVSFH KLKLTNNISD KHGFVSTTIL
451 NSMHKYQPRF HHLVRANDILK LPYSTFRITYV FKETEFIAVT AYQNEKITQL
501 KIDNPNPFAK LRDTGAGKRE KNCYRQALMS NRGSDSDKLN PTHVSSSRAP
551 LHLGHAGRPP HLHPHAALLD NQDDDDKLL DVVGPPQSPL LPLSHSLQOM
601 HAHQHSAAAL AWFNHLGAG AGASEHAAAA AANASAEDAL RRLQADADV
651 ERDGSDDSSC ESVDGSGTGA FRPTSTGSPK EAVGAAAAAA AAGLNPGGGS
701 YSPNISVGP PIHPSHLLP YLYPHGLYP PHLGLLHNP AAAAMSPAGL
751 NPGLLFNAQL ALAAQHPALF GHAYAAAGHT PVSPQLGLKS HRFSPYSLPG
801 SLGSAFDAVT PGSNANRSGD PPGGGGLGG GVVENGPRSL SSSPRPRPAS
851 HSPPTRPISM SPTTPPSLMK QPRGGGAGAG VAQSQHSPE LKSMEKMVNG
901 LEVQHNGSAA AAAAALQLAE EAAQHHTTQ AHQQQQHQS HHQQHHQQP
951 AQPHPHHQTH LSHHGATTG GTDQ

```

Rot Omb T-Domäne

Blau Mutierte Aminosäuren in homozygoten letalen Δ ombTU12A Stämmen (hier B2)

7.4 Sequenz der iPCR der *bi*-Insertion mit Primerpaar 1017/1018

Das 800bp lange Amplifikat der iPCR wurde in den pCR-XL-Topo Vektor (invitrogen) kloniert und mit den Standardsequenzierungsprimern *m13forward* sequenziert.

Experimentelle Sequenz:

```

1  GGGCGATTGG  GCCCTCTAGA  TGCATGCTCG  AGCGGCCGCC  AGTGTGATGG
51  ATATCTGCAG  AATTCGCCCT  TGGCTATTAT  CATTGCGGTT  TACAGAGCAA
101 TGTTTTGTAG  GAAAGGATTT  TCCCCAGCAC  CAAAATAAAT  TTCTCTTTCG
151 AGTAGTTTAT  TGCACTGCTT  ATTAGCGATT  AGTGACTTTT  ATGACTGCTT
201 AGAAACGTTG  AGCTGACAGA  ACCATTTCTG  CCTACTCTAA  AATCAAAGA
251 AGTAAAATTG  AATAAATATA  TGTCAGCCCG  ACGGCTGCCT  TCAACTTAAA
301 ACGGACTTGT  GTTCTGAATT  GGAGTTCATC  ATTACACAAC  CCCAGGAGA
351 TTCCCATCC  CGATCTGCTC  AAGCGCAACG  AAATCGGAAC  CATTATCCAA
401 TTAGCTAACT  CTTTCCGAAC  CCGTATCATC  AGTTTATCGC  CTCGTCAATT
451 GTTTTCTCAT  ACTTTTTCG  CTACTTAACT  GATGTGACAA  TTTGTAGCCA
501 TTAGCCGGAG  GCAGTCAGTC  AAACAGTCGC  TAGATTTGCA  AGTTGTTTCAG
551 GCATGACAAA  ACAAAAAAGA  AAAAAAAAAA  AACTATATAT  ATGCAATGTA
601 TGGCGATGGA  TAAGGGGGGG  GGGGAGAGTT  GGGGA

```

Unterstrichen

GAATTC

GGCTATTAT CATTGCGGTT TA

Blaue Sequenz (93-204)

ACGT

Fette Sequenz (205-336)

Blaue Sequenz (337-550)

pCR-XL-Topo Sequenz

EcoRI-Schnittstelle des pCR-XL-Topo Vektors

Oligo 1017

112bp genomische Sequenz (3' von Oligo 1017)

HpyCH4IV-Schnittstelle (= MaeII Schnittstelle)

132bp unbekannter Sequenz (putative *bi*-Insertion)

213 bp genomischer Sequenz (5' von Oligo 1018)

7.5 Sequenz des UAS-*rpr* Anteils des ombA-Deletionskonstrukts

Das von A. Hau, 2010 hergestellte Deletionskonstrukt wurde mit dem Sequenzierungsprimer 1351 sequenziert. 1351 bindet im *rpr*-Anteil des pGX-attP Vektors und liest von dort stromaufwärts über die UAS-Sequenzen und die 3'MCS in das dorthinein ligierte Fragment (hier *dsh ombA*). Dem ombA-Deletionskonstrukt fehlen die Positionen 568-619 des pGX-attP in dem Teile der zweiten Wiederholung der UAS-Sequenz, sowie die dritte und vierte Wiederholung enthalten sind.

Experimentelle Sequenz 1351:

```

1  CCGGATCAGC CTGCCATTCT AGAGCCTGTT CGCTAGGCCA ATTCCCTATT
51 CAGAGTTCTC TTCTTGTATT CAATAATTAC TTCTTGGCAG ATTTTCAGTAG
101 TTGCAGTTGA TTTACTTGGT TGCTGGTTAC TTTTAATTGA TTCACTTTAA
151 CTTGCACTTT AATGCAGATT GTTTAGCTTG TTCAGCTGCG CTTGTTTATT
201 TGCTTAGCTT TCGCTTAGCG ACGTGTTCAC TTTGCTTGTT TGAATTGAAT
251 TGTCGCTCCG TAGACGAAGC GCCTCTATTT ATACTCCGGC GCTCGCTAGA
301 GTCTCCGCTC GGAGGACAGT ACTCCGACCT GCACTCGAGC TGCAGATTTCG
351 AATAGGCCTA GGCGCGCCCA ATTTGTCACA GGGCAGCGTA AAAAGTGCCA
401 ATTGCAGGTC CGTATTTTGC TGCGGGGTCA GATGGCCAGG CGTAAATTA
451 ATCAACTCTA ATGTCTTTAA TTTGTTTGAG TTGTGCCACC CCCAACCCCC
501 GCCCACTGTT TATATACACA CCCCACCCAA TCCAATTTCC CCCCTGATCG
551 GGGCAGTCAG TATGCAGCGA TGCGTCCGAC GAGTCAGTCA ATTGTCAGTC
601 GGTCTGAAAT TCCTCGATTC TGGATTTGGC CACAGGAAAA AAACACAATT
651 TTATTTGGGT TTAAAACCTG AAGAGTATAG AAGTTATCAA GCTAGCACAA
701 CTTGAGCTGT TAGCAAGGTC ACCGTTCTTC GCCGTGTGGC TGTTCTAAGA
751 GAGCTTATGC AATATGACAC ACGCTAATGA CTAGCTTGTT ATACAAAATG
801 CAAGCTTATG TGAGAGAGCA TACCGAACTC GCGCATTACA AAACTTTCAA
851 CGTGAGGATT TCCAGGGTGC AAA

```

Grau pGX-attP (620-935)

Unterstrichen pGX-attP (567-502)

TACTCCG UAS-Sequenz

grün 3' *dsh ombA*

7.6 Eidesstattliche Erklärung

Versicherung gemäß §11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 30. April 1990

- 1) Ich habe die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und alle benutzten Quellen und Hilfsmittel in der Arbeit angegeben.
- 2) Ich habe die Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung eingereicht.
- 3) Ich habe weder die gleichen noch Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht.

Mainz, den 30.07.2012

7.7 Danksagung

Ich danke...

... meinem Doktorvater

... allen Kollegen und Mitarbeitern

... meinen Eltern