

„Die Rolle von *optomotor-blind* bei der Entwicklung der dorso-ventralen (D/V)  
Kompartimentsgrenze und der Gelenkregion in der Flügelimaginalscheibe von  
*Drosophila melanogaster*“

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor  
der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Fred Christian Eichinger

geb. in Homburg

Mainz, den 07.05.2019

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2019

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung: Omb-Funktion an der Flügel D/V-Grenze (Thema 1)	4
1.1	Entwicklung des Flügels bei <i>Drosophila</i>	4
1.2	Kompartimente in der Flügelimaginalscheibe	4
1.3	Omb-Expression in der Flügelentwicklung	6
1.4	Omb-Funktion in der Flügelentwicklung	7
1.5	<i>bifid</i>	8
1.6	Entwicklung der D/V-Grenze im Flügel	9
1.7	Die Rolle des EGFR-Signalweges in der Flügelentwicklung	12
1.8	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Ergebnisse und Diskussion (Thema 1)	15
2.1	<i>apterous (ap)</i>	15
2.1.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>ap-lacZ</i> -Expression	15
2.1.2	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>Ap</i> -Expression	16
2.1.3	Klonaler <i>omb</i> -Verlust und <i>ap-lacZ</i> -Expression	25
2.1.4	Klonale <i>omb</i> -Überexpression und <i>ap-lacZ</i> -Expression	34
2.2	NRE-GFP Reporter	36
2.2.1	Klonaler <i>omb</i> -Verlust und NRE-GFP-Expression	36
2.3	Diskussion: <i>apterous</i> und Notch	39
2.4	<i>kohtalo (kto)</i>	45
2.4.1	Klonaler <i>kto</i> -Verlust und <i>Wg</i> -Expression	46
2.4.2	Klonaler <i>kto</i> -Verlust und <i>Vg</i> -Expression	48
2.4.3	Klonaler <i>kto</i> -Verlust und <i>Omb</i> -Expression	48
2.4.4	Klonaler <i>kto</i> -Verlust und <i>Ap</i> -Expression	50
2.5	Diskussion: <i>kohtalo</i>	51
2.6	<i>capricious (caps)</i> und <i>tartan (trn)</i>	54
2.6.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>trn-lacZ</i> - und <i>caps-lacZ</i> -Expression	54
2.6.2	Klonale <i>omb</i> -Überexpression und <i>caps-lacZ</i> -Expression	56
2.6.3	Diskussion: <i>capricious</i> und <i>tartan</i>	57
2.7	<i>pointed (pnt)</i>	59
2.7.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>pnt-lacZ</i> -Expression	59
2.8	<i>kekkon1 (kek1)</i>	60
2.8.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>kek1-lacZ</i> -Expression	61
2.9	Diskussion: EGFR Signalaktivität	62
3	Einleitung: Omb-Funktion in der Flügelgelenkentwicklung (Thema 2)	65
3.1	Entwicklung des Flügelgelenks bei <i>Drosophila</i>	65
4	Ergebnisse und Diskussion (Thema 2)	67
4.1	<i>decapentaplegic (dpp)</i>	67
4.1.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>dpp-lacZ</i> -Expression	67

4.2	<i>wingless (wg)</i> .....	70
4.2.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>Wg</i> -Expression .....	71
4.2.2	Klonaler <i>omb</i> -Verlust und <i>Wg</i> -Expression .....	72
4.2.3	<i>omb</i> -Knockdown und <i>Wg</i> -Expression.....	74
4.2.4	<i>omb</i> -Überexpression und <i>Wg</i> -Expression .....	75
4.2.5	Klonale <i>omb</i> -Überexpression und <i>Wg</i> -Expression .....	76
4.3	<i>vestigial (vg)</i> .....	77
4.3.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>Vg</i> -Expression .....	78
4.3.2	Diskussion: <i>vestigial</i> und <i>wingless</i> .....	80
4.4	<i>zinc finger homeodomain-2 (zfh2)</i> .....	81
4.4.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>Zfh2</i> -Expression.....	81
4.4.2	Klonaler <i>omb</i> -Verlust und <i>Zfh2</i> -Expression .....	84
4.4.3	Diskussion: <i>zinc finger homeodomain-2</i> .....	85
4.5	<i>nab</i> .....	86
4.5.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>Nab</i> -Expression .....	87
4.5.2	Diskussion: <i>Nab</i> , <i>Zfh2</i> und <i>Wg</i> .....	88
4.6	<i>homothorax (hth)</i> .....	89
4.6.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>hth-lacZ</i> -Expression .....	90
4.6.2	Klonaler <i>omb</i> -Verlust und <i>hth-lacZ</i> -Expression .....	92
4.7	<i>teashirt (tsh)</i> .....	93
4.7.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>tsh-lacZ</i> -Expression .....	94
4.7.2	Diskussion: <i>teashirt</i> .....	95
4.8	JAK/STAT .....	95
4.8.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und JAK/STAT-Signalisierung .....	96
4.8.2	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>STAT92E-lacZ</i> -Expression .....	106
4.8.3	Diskussion: JAK/STAT .....	106
4.9	Proliferation und Apoptose .....	109
4.9.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und Proliferation.....	110
4.9.2	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und Apoptose.....	114
4.9.3	Diskussion: Proliferation und Apoptose .....	117
4.10	<i>four-jointed (fj)</i> und <i>dachsous (ds)</i> .....	118
4.10.1	Systemischer <i>omb</i> -Verlust und <i>fj-lacZ</i> -Expression.....	119
4.10.2	Klonaler <i>omb</i> -Verlust und <i>fj-lacZ</i> -Expression .....	120
4.10.3	<i>omb</i> -Überexpression und <i>fj-lacZ</i> -Expression .....	121
4.10.4	Klonale <i>omb</i> -Überexpression und <i>fj-lacZ</i> -Expression .....	122
4.10.5	<i>ds-lacZ</i> -Expression .....	125
4.10.6	Klonaler <i>omb</i> -Verlust und <i>ds-lacZ</i> -Expression .....	125
4.10.7	Klonale <i>omb</i> -Überexpression und <i>ds-lacZ</i> -Expression .....	126
4.10.8	Diskussion: <i>four-jointed</i> und <i>dachsous</i> .....	128
5	Material und Methoden .....	130
5.1	Material.....	130

5.1.1	Puffer und Lösungen .....	130
5.1.2	Antikörper .....	130
5.1.3	Präabsorption des Omb Antikörpers .....	131
5.1.4	Fliegenstämme .....	131
5.1.5	Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte .....	133
5.2	Methoden .....	133
5.2.1	Präparation von Drittstadien Larven .....	133
5.2.2	Präparation von Imaginalscheiben .....	134
5.2.3	X-Gal Färbung von L3 Imaginalscheiben .....	134
5.2.4	Immunfluoreszenzfärbung von L3 Imaginalscheiben (Antikörperfärbung) .....	134
5.2.5	Detektion proliferierender Zellen in Imaginalscheiben .....	135
5.2.6	Fliegenhaltung .....	135
5.2.7	Fliegenkreuzung .....	135
5.2.8	Untersuchung von enhancer-trap bzw. reporter Linien im <i>omb</i> mutanten Hintergrund .....	136
5.2.9	Das GAL4/UAS System .....	136
5.2.10	Die TARGET Technik .....	137
5.2.11	Kreuzungsexperimente mit der TARGET Technik .....	137
5.2.12	RNA-Interferenz .....	138
5.2.13	Das FLP/FRT System .....	139
5.2.14	Das FLPout-GAL4 System .....	140
5.2.15	Mikroskopie und Dokumentation der Imaginalscheiben .....	141
5.2.16	Durchlicht-Mikroskopie (X-Gal Färbung) .....	141
5.2.17	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (Immunfluoreszenzfärbung) .....	142
5.2.18	Bildbearbeitung .....	142
5.2.19	Allgemeine Software .....	142
6	Zusammenfassung .....	143
7	Literaturverzeichnis .....	145
8	Anhang .....	158
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	158
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	159
8.3	Ergänzende Abbildungen .....	162
8.4	Versicherung .....	186
8.5	Danksagung .....	187
8.6	Lebenslauf .....	188

# 1 Einleitung: Omb-Funktion an der Flügel D/V-Grenze (Thema 1)

## 1.1 Entwicklung des Flügels bei *Drosophila*

Die Flügelimaginalscheibe wird während der Embryogenese als Invagination des embryonalen Ektoderms gebildet (Wolpert et al., 2002). Zu Beginn des ersten Larvenstadiums besteht sie aus 20-30 Zellen (Bate und Arias, 1991) und erscheint als hohler ovaler Sack (Madhavan und Schneiderman, 1977). In den darauffolgenden Larvenstadien wächst die Flügelscheibe bis sie ihre endgültige Größe von 30-50.000 Zellen erreicht hat (Bryant und Levinson, 1985, Martín et al., 2009). Im Verlauf der drei Larvenstadien (L1-L3) erfährt die Flügelimaginalscheibe eine morphologische Spezialisierung. Während im L1 alle Zellen kubisch sind (Pflasterepithel), bilden sie im L2 zwei unterscheidbare Schichten, das Hauptepithel und die sogenannte Peripodialmembran (Madhavan und Schneiderman, 1977). Das Hauptepithel besteht aus einem einschichtigen Säulenepithel (auch als Zylinderepithel bezeichnet) aus länglichen säulenförmigen Zellen und die Peripodialmembran besteht aus einem dünnen einschichtigen Plattenepithel. Die Übergangszone zwischen beiden Epithelschichten wird von kubischen Zellen gebildet. Das Hauptaugenmerk lag in bisherigen Studien meist auf dem Hauptepithel der Flügelscheibe. Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass die Entwicklung des Hauptepithels durch Signale aus dem gegenüberliegenden Plattenepithel beeinflusst wird (Pallavi und Shashidhara, 2003; Paul et al., 2013).

## 1.2 Kompartimente in der Flügelimaginalscheibe

Imaginalscheiben sind in benachbarte Zellpopulationen unterteilt, die sogenannten Kompartimente (García-Bellido et al., 1973). Sobald die Zellidentitäten hinsichtlich der Kompartimentzugehörigkeit etabliert sind, bleiben sie im weiteren Verlauf der Larvalentwicklung und im Adultstadium stabil. Die Kompartimentgrenzen in den Imaginalscheiben werden von allen Zellen respektiert, so dass Zellen aus unterschiedlichen Kompartimenten sich nicht mischen (García-Bellido et al., 1973). Kompartimentgrenzen fungieren als Organisationszentren für Musterbildung und Wachstum (Milan und Cohen, 1999).

Die Flügelimaginalscheibe ist in vier Kompartimente unterteilt; anterior (A) und posterior (P) sowie dorsal (D) und ventral (V). In der Flügelscheibe bilden die Zellen an der Grenze zwischen anteriorem und posteriorem sowie dorsalem und ventralem Kompartiment jeweils eine Signalregion, die die Musterbildung in der Flügelscheibe entlang der Flügelachsen steuert. An den Kompartimentgrenzen treten keine augenfälligen morphologische Grenzen auf, die Zellen von zwei gegenüberliegenden Kompartimenten stoßen unmittelbar aneinander.

Die Unterteilung der Flügelimaginalscheibe in ein anteriores und posteriores Kompartiment erfolgt bereits während der Embryonalentwicklung, durch die begrenzte Expression und Aktivität des Homöodomänen Proteins *Engrailed* (En) in den posterioren Zellen (Kornberg, 1981; Tabata et al., 1995; Zecca et al., 1995). Die Expression des posterioren Selektorgens *engrailed* (und dessen Schwester gens *invected* (*inv*)) im P-Kompartiment ist essentiell für die Aufrechterhaltung der A/P-Kompartimentgrenze (Morata und Lawrence, 1975; Kornberg et al., 1985; Brower, 1986; Coleman et al., 1987). Posteriore Zellklone die für *en* mutant sind, trennen sich von den anderen posterioren Zellen und sind in der Lage in das A-Kompartiment zu wechseln (Hidalgo, 1994; Blair und Ralston,

1997). En vermittelt die Zellsegregation an der A/P-Kompartimentgrenze indirekt, indem es die Hh-Signalisierung kontrolliert (Blair und Ralston, 1997; Rodriguez und Basler, 1997). Damit ist die Bildung der A/P-Kompartimentsgrenze von dem diffusiblen Signalprotein Hedgehog (Hh) abhängig. Hh wird unter der Kontrolle von *en* in posterioren Zellen exprimiert, sezerniert und diffundiert dann über die A/P-Kompartimentsgrenze, um als kurzreichendes Signalmolekül zu wirken (Blair und Ralston, 1997; Rodriguez und Basler, 1997).

Der Hh-Signaltransduktionsweg umfasst eine Abfolge repressiver Interaktionen, deren wesentliche Schritte von *Drosophila* bis zum Menschen konserviert sind. In *Drosophila* bindet das diffusible Hh-Protein an den Transmembranrezeptor Patched (Ptc), wodurch die Ptc-vermittelte Inhibition von Smoothed (Smo), einem Transmembranprotein und Co-Rezeptor, abgeschwächt wird (Tabata und Kornberg, 1994; Chen und Struhl, 1996; Kalderon, 2000; Taipale et al., 2002; Bidet et al., 2011). Aktiviertes Smo fördert wiederum die Akkumulation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors Cubitus interruptus (Ci) im gesamten Zytoplasma über einen komplexen Mechanismus (Jiang und Hui, 2008; Lum und Beachy, 2004). Letztendlich transloziert das aktivierende, full-length Molekül Ci (CiA) in den Nukleus und aktiviert die Gentranskription. Im Hh-Signalweg wird der Transkriptionsfaktor Ci benötigt um Zielgene zu aktivieren oder zu unterdrücken. In Abwesenheit von Hh-Liganden wird eine verkürzte Form von Ci gebildet (CiR), welche die Hh-Zielgentranskription reprimiert (Aza-Blanc et al., 1997; Méthot und Basler, 1999). Smo wird in der ganzen Flügelscheibe exprimiert. Indem En in posterioren Zellen die Expression von Hh aktiviert und die Transkription von Ci reprimiert, wird die Hh-Signalwegtransduktion im P-Kompartiment verhindert und im A-Kompartiment – aufgrund der Diffusionsfähigkeit des Hh-Proteins – ermöglicht (Eaton und Kornberg, 1990; Tabata et al., 1992; Dominguez et al., 1996).

Hh bildet einen morphogenetischen Gradienten und steuert so die Transkription von Zielgenen, wie z.B. *decapentaplegic (dpp)*, die wiederum das Zellschicksal beeinflussen. Dpp wird in einem schmalen Zellstreifen entlang der A/P-Grenze im A-Kompartiment exprimiert und wirkt als weitreichendes (long-range) Morphogen in beiden Kompartimenten entlang der A-P Achse (Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996).

Die Unterteilung der Flügelimaginalscheibe in ein dorsales und ventrales Kompartiment erfolgt im zweiten Larvenstadium, durch die Expression und Aktivität des LIM-Homöodomänen Proteins Apterous (Ap) in dorsalen Zellen (Cohen et al., 1992; Diaz-Benjumea und Cohen, 1993; Blair et al., 1994). An der D/V-Kompartimentsgrenze der Flügelscheibe induziert Ap den Notch-Signalweg. Die Aktivität des Notch-Signalwegs induziert wiederum die Expression von Wingless (Wg), in Zellen entlang der D/V-Grenze. Die kombinierte Aktivität von Notch und Wg organisiert Musterbildung und Wachstum in der Flügelimaginalscheibe (Giraldez und Cohen, 2003). Als Selektorgen des dorsalen Kompartiments ist Ap erforderlich um einen Affinitätsunterschied zwischen dorsalen und ventralen Zellen herzustellen und aufrechtzuerhalten (Diaz-Benjumea und Cohen, 1993; Blair et al., 1994). Damit ist Ap für die Zellsegregation an der D/V-Kompartimentsgrenze notwendig. Die Bildung der D/V-Kompartimentsgrenze und die Funktion von Apterous wird unten ausführlich erläutert (siehe 1.6).

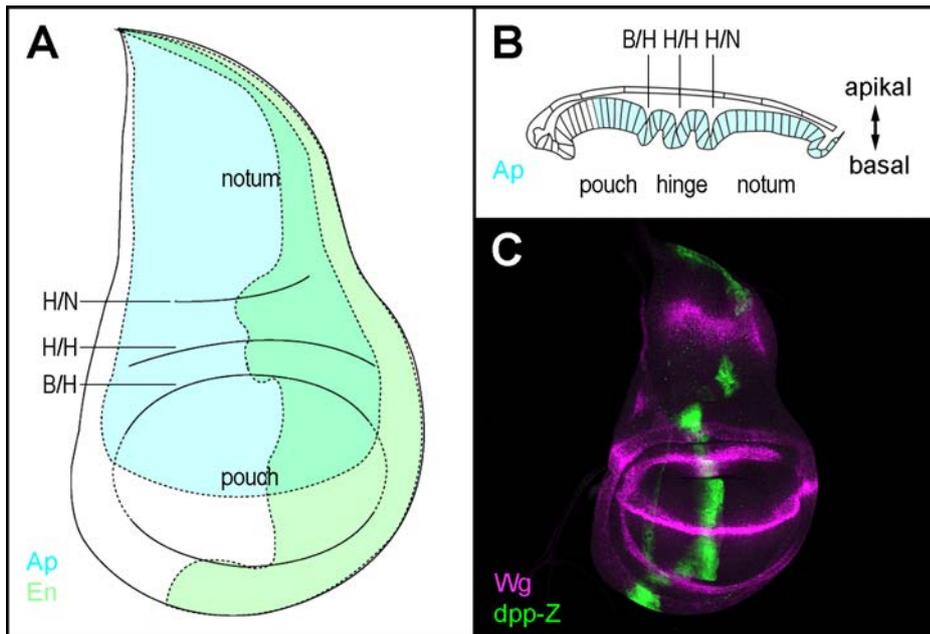


Abbildung 1 Kompartimente in der Flügelimaginalscheibe

(A) schematische Zeichnung der Flügelimaginalscheibe des dritten Larvenstadiums. Dorsales Kompartiment: hellblau (Ap-Expression), posteriores Kompartiment: hellgrün (En-Expression). Die drei apikalen Falten (B/H, H/H, H/N) in der dorsalen Hinge sind gekennzeichnet. (B) schematische Zeichnung der Flügelimaginalscheibe im XZ-Schnitt entlang der D-V Flügelachse. (C) Immunfluoreszenzfärbung gegen *dpp* (*dpp-lacZ*, grün) und *Wg* (magenta) an einer Flügelimaginalscheibe des dritten Larvenstadiums. Entlang der A/P-Grenze wird *dpp-lacZ* exprimiert. In der pouch wird *Wg* an der D/V-Grenze exprimiert. In A, C ist anterior links und dorsal oben. Verändert nach (Pflugfelder et al., 2017).

### 1.3 Omb-Expression in der Flügelentwicklung

Als pleiotropes Gen ist *optomotor-blind* (*omb*) an verschiedenen Entwicklungsprozessen beteiligt. Während der Larvalentwicklung wird *omb* u.a. in den Bein-, Antennen-, Augen- und Flügelimaginalscheiben exprimiert. In der Flügelimaginalscheibe wird *omb* in der pouch sowie in der dorsalen und ventralen Hinge prominent exprimiert (Grimm und Pflugfelder, 1996). Zusätzlich wird *omb* am anterior-ventralen Rand der Flügelscheibe, im Bereich der zukünftigen Mesopleura exprimiert (die einen Teil der Körperwand der adulten Fliege bildet) wie auch am posterioren Rand der Scheibe, in der Anlage der Alula. Im späten dritten Larvenstadium füllt die *Omb*-Expression fast die gesamte pouch, reicht jedoch im lateralen Bereich nicht an den inneren Ring der *Wg*-Expression (*Wg*-IR) heran (Abb. 2 A`).

Die *omb*-Expression steht in der Hinge unter der Kontrolle von Dpp und in der pouch unter der gemeinsamen Kontrolle von *Wg* und Dpp (Grimm und Pflugfelder, 1996). Der Verlust der *dpp*-Expression (wie in *dpp* mutanten Flügelscheiben) resultiert im Verlust der *omb*-Expression in der Flügelscheibe (Grimm und Pflugfelder, 1996; Lecuit et al., 1996). Ektopische Expression von Dpp in der Flügelscheibe führt zu einer Ausbreitung der *omb*-Expression in der pouch und in der umliegenden Hinge sowie zu einem lateralen Überwachsen der Flügelscheibe (Grimm und Pflugfelder, 1996; Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996). Die Expression von *omb* wird nicht direkt durch das Morphogen Dpp induziert. Vielmehr, reprimiert die Dpp-Signalisierung die Transkription von *brinker* (*brk*), das für einen Transkriptionsrepressor kodiert, wodurch in der Flügelscheibe ein Brk-

Gradient gebildet wird der gegenläufig zum Dpp-Gradienten verläuft – mit einem Minimum im Zentrum und einem Maximum in der lateralen Flügelscheibe. Es konnte gezeigt werden, dass Brk die Transkription von *omb* direkt reprimiert (Sivasankaran et al., 2000). In der distalen Flügelscheibe (pouch) bildet Omb gleichfalls einen symmetrischen Gradienten beiderseits der A/P-Kompartimentsgrenze, entlang der A-P Achse, mit einer hohen Expression medial und einer niedrigen Expression lateral (Shen et al., 2010).

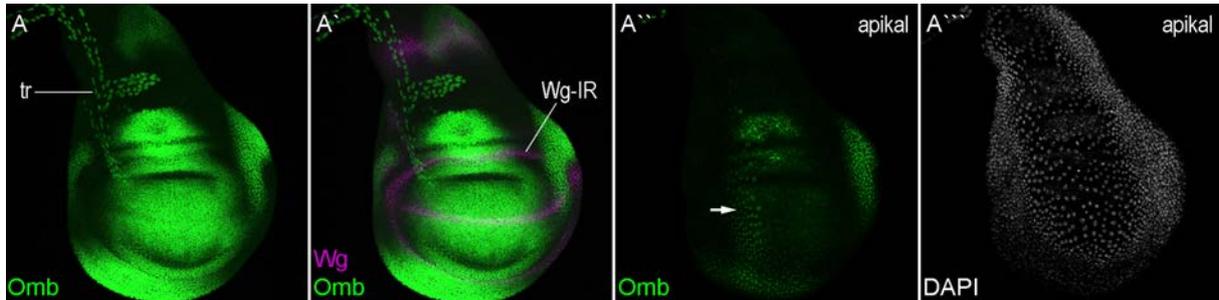


Abbildung 2 Omb-Expression in der Flügelimaginalscheibe

Flügelimaginalscheibe des dritten Larvenstadiums. (A und A') Maximalprojektion des Z-Bildstapels. (A) Immunfluoreszenz gegen Omb (grün) (tr, Trachee). (A') Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen Omb (Grün) und Wg (Magenta) (Wg-IR, innerer Ring der Wg-Expression). (A'' und A''') apikale Einzelbilder des Z-Bildstapels. Omb (Grün) und DAPI (Weiß). In der Peripodialmembran wird Omb in einer anterioren Zellgruppe exprimiert. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Verändert nach (Pflugfelder et al., 2017).

#### 1.4 Omb-Funktion in der Flügelentwicklung

*omb* ist für die Flügelentwicklung essentiell, was am Flügel-Phänotyp von *omb* Mutanten ersichtlich ist. Null-Mutationen von *omb* (*l(1)omb*) sind pupal letal (Pflugfelder et al., 1992a; Grimm und Pflugfelder, 1996). Im *omb* Nullmutanten Hintergrund ist die Flügelentwicklung stark gestört und die Flügel von pharat-adulten *omb* Nullmutanten sind massiv reduziert (Grimm und Pflugfelder, 1996). Hiervon betroffen ist vorwiegend das Flügelblatt, so dass nur ein kleines Flügelrudiment ausgebildet wird, in der Gelenkregion ist vor allem der zentrale Bereich beeinträchtigt; die anteriore und posteriore Gelenkstrukturen – Costa bzw. Alula – erscheinen weitgehend normal, wohingegen zwischenliegende Strukturen kaum noch eine reguläre Gelenkorganisation erkennen lassen (del Alamo Rodríguez et al., 2004; Grimm und Pflugfelder, 1996) (Abb. 3 D). Große distale *l(1)omb* mutante Klone resultieren im adulten Flügel im Verlust distaler Regionen des Flügelblattes (Grimm und Pflugfelder, 1996; Simon und Guerrero, 2015). Ein Knockdown von *omb* (mittels RNAi) kann gleichfalls zum Verlust des distalen Flügelblattes führen (Shen et al., 2008). Dieser Phänotyp ist wahrscheinlich auf Apoptose zurückzuführen, welche durch den Jun N-terminal protein kinase (JNK) -Signalweg vermittelt wird (Adachi-Yamada et al., 1999). Entsprechend können in *l(1)omb* mutante Flügelimaginalscheiben die Apoptosemarker *puckered* (*puc*) (kodiert für die einzige *Drosophila* JNK-spezifische MAPK-Phosphatase) und aktivierte Caspase-3 (eine zentrale Effektorcaspase des Apoptose-Signalweges) nachgewiesen werden (Simon und Guerrero, 2015). Im *omb* Hypomorph *bifid* ist die Flügelgröße reduziert, dies ist auf ein leicht vermindertes Expressionsniveau von Omb in der Flügelimaginalscheibe zurückzuführen (Grimm und Pflugfelder, 1996; Shen et al., 2008). *bifid* Mutanten zeigen – ähnlich wie *l(1)omb* – eine Aktivierung der apoptotischen JNK-Signalisierung in der

Flügelscheibe (Adachi-Yamada et al., 1999; del Alamo Rodríguez et al., 2004).

In der ventralen Flügelimaginalscheibe wurde für Omb eine repressive Wirkung auf das Wachstum festgestellt (del Alamo Rodríguez et al., 2004; Umemori et al., 2007). Gezielte Manipulationen der *omb*-Expression entlang der D/V-Grenze zeigten, dass Omb im Zentrum der pouch die Proliferation hemmt, in der Peripherie aber fördert (Zhang et al., 2013).

## 1.5 *bifid*

*bifid* (*omb<sup>bi</sup>*) ist das erste *omb* Allel das isoliert wurde (Morgan und Brigdes, 1916). Bei *bifid* handelt es sich um ein hypomorphes *omb* Allel, das eine 12-kb-Insertion direkt stromabwärts (downstream) des ersten *omb* Exons enthält (Pflugfelder, 2009). In *bifid* Mutanten ist die *omb*-Expression in allen Imaginalscheiben reduziert (Shen et al., 2008).

In wildtypischen Flügeln verschmelzen die Logitudinalvenen 1-3 (L1-3) bzw. 4-5 (L4-5) an der Basis des Flügels (in der Gelenkregion) zu zwei separaten Venenstränge (Abb. 3 A). Der *bifid* Phänotyp ist gekennzeichnet durch die Fusion aller fünf Longitudinalvenen (L1-5) zu einem einzelnen Venenstrang im Zentrum der Flügelbasis (Morgan und Brigdes, 1916), durch den Verlust des dazwischenliegenden Gewebes (Grimm und Pflugfelder, 1996; Pflugfelder, 2009). Zusätzlich zeigen *bifid* mutante Flügel mit variabler Expressivität eine leichte Verkürzung des Flügelblattes entlang der proximo-distalen (P-D) Achse (Shen et al., 2008). Ein starker *bifid*-ähnlicher Phänotyp in der Gelenkregion (d.h. eine Fusion der Flügelvenen (L1-5) in einen Venenstrang), kann auch durch einen gelenkspezifischen *omb* Knockdown (mittels RNAi) erzeugt werden (Abb. 3 B). Möglicherweise beruht der gelenkspezifische Phänotyp von *bifid* Mutanten auf einem höheren Bedarf an Omb in der hinge oder ist auf eine etwas stärkere Reduktion der Omb-Expression in der hinge zurückzuführen, die jedoch zu gering ist, um ohne Quantifizierung erkannt zu werden (Pflugfelder, 2009). So erscheint in *bifid* mutanten Flügelimaginalscheiben die Omb-Expression gleichmäßig reduziert (Shen et al., 2008).

Der *bifid* Phänotyp verstärkt sich, wenn die Omb Dosis weiter reduziert wird, wie beispielsweise bei *omb<sup>bi</sup>/(1)omb* transheterozygoten Mutanten (Grimm und Pflugfelder, 1996). Der Phänotyp von *omb<sup>bi</sup>/(1)omb* Mutanten zeichnet sich in der Gelenkregion durch den offensichtlichen Verlust des medialen Teils der Basalzelle (BZ) aus, wie auch durch Venendefekte wie beispielsweise den Verlust eines Venenstranges (Abb. 3 C). Die Basalzelle liegt in der Gelenkregion des adulten Flügels, zwischen den beiden Venensträngen die von den Flügelvenen L1/2/3 bzw. L4/5 gebildet werden.

Der offensichtliche Verlust des Intervenengewebes im Flügelgelenk von *bifid* Mutanten kann mehrere (sich gegenseitig nicht ausschließende) Ursachen haben: wie eine verringerte Proliferation, eine verstärkte Apoptose oder eine Schicksalsänderung von Interven- zu Venengewebe (Pflugfelder et al., 2017).

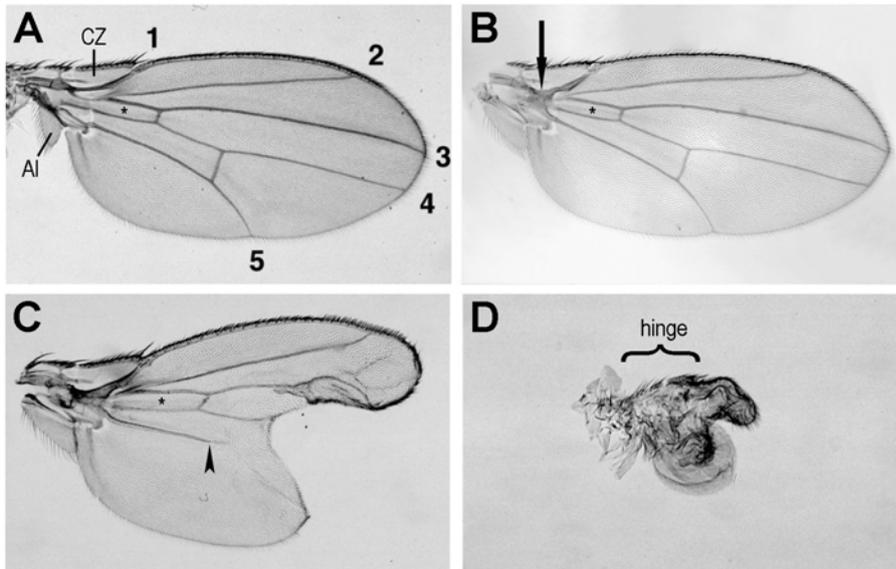


Abbildung 3 Einfluss von *omb* Verlust auf die Flügelentwicklung (A-C) adulte Flügel und (D) pharat-adulter Flügel. In allen Flügeln ist anterior oben, proximal links. (A) Wildtyp Flügel mit dem stereotypen Venenmuster. Es gibt fünf Longitudinalvenen (L1-5) und zwei Quervernen (antere Querverne, ACV zwischen L3 und L4; posteriore Querverne, PCV zwischen L4 und L5). Die Longitudinalvenen (L1-5) sind gekennzeichnet. CZ Costalzelle, Al Alula. Die Basalzelle ist durch einen Stern markiert (A-C). (B) *bifid*-ähnlicher Phänotyp (induziert durch gelenkspezifischen *omb* Knockdown (CCKLR-17D3>*omb*-RNAi)). Alle fünf Longitudinalvenen (L1-5) sind in der Gelenkregion in einen gemeinsamen Venenstrang fusioniert (Pfeil). (C) Verstärkter *bifid* Phänotyp in *omb*<sup>bi/1(1)</sup>*omb*<sup>3198</sup> Flügel. Die Longitudinalvene L5 ist verkürzt (Pfeilspitze). (D) pharat-adulter *I(1)omb*<sup>3198</sup> Flügel. Flügelrudiment mit fast vollständigem Verlust des Flügelblattes und verbleibender Gelenkregion (hinge; Klammer). Verändert nach (Grimm und Pflugfelder, 1996).

## 1.6 Entwicklung der D/V-Grenze im Flügel

Die *apterous*-Expression wird anfänglich durch den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) - Signalweg, der durch das Signalprotein Vein (Vn) aktiviert wird, in zukünftigen dorsalen Zellen, induziert (Wang et al., 2000; Zecca und Struhl, 2002a,b). Vn ist der einzige aktivierende Ligand des EGF-Rezeptors. Der EGF-Rezeptor wird in der Flügelimaginalscheibe zunächst ubiquitär exprimiert und im späten dritten Larvenstadium, innerhalb der pouch an der D/V- und A/P-Kompartimentsgrenze herunterreguliert (Guichard et al., 1999, Molnar et al., 2011a). Sein Ligand Vein wird im zweiten Larvenstadium in einem proximalen (dorso-proximalen) Bereich und *wg* in einem distalen (anterior-ventralen) Bereich exprimiert (Simcox et al., 1996). Bereits im ersten Larvenstadium kann die *vn*- und *wg*-Expression in einigen proximalen bzw. distalen Zellen nachgewiesen werden (Paul et al., 2013). Wie die komplementären Expressionsdomänen von *vn* und *wg* etabliert werden, ist umstritten. Erste Beobachtungen legen nahe, dass *Wg*-Signalaktivität die *vn*-Expression auf den proximalen Bereich der Flügelscheibe begrenzt und damit als Antagonist der Aktivität von Vn/EGFR entgegen wirkt (Wang et al., 2000). In *vn* mutanten Flügelscheiben erfolgt keine Veränderung der *wg*-Expression, während in *wg* mutanten Flügelscheiben eine distale Ausdehnung der *vn*-Expression stattfindet (Wang et al., 2000). Dahingegen zeigten Cavodeassi und Kollegen (Cavodeassi et al., 2002), dass in *wg* mutanten Flügelscheibe eine zweite, distale *vn* Expressionsdomäne gebildet wird, statt einer Ausdehnung der *vn*-Expression nach distal. Baonza und Kollegen (Baonza et al., 2000) zeigten, dass die EGFR-Signalisierung im Bereich des zukünftigen Notums die *wg*-Expression reprimiert.

Vor kurzem wurden zwei cis-regulatorische Elemente entdeckt, welche die Initiierung und Aufrechterhaltung der *vn*-Expression in der frühen Flügelimaginalscheibe vermitteln (Paul et al., 2013). Hierbei liefert Dpp das instruktive Signal für die Initiierung der *vn*-Expression durch parakrine Signalisierung zwischen der Peripodialmembran und dem Hauptepithel (Paul et al., 2013). Die Aufrechterhaltung und Amplifizierung der *vn*-Expression erfolgt hingegen durch autokrine Signalisierung, die durch den ETS-Transkriptionsfaktor PointedP2 (PntP2) vermittelt wird (Paul et al., 2013). Der Vn/EGFR-Signalweg wirkt nur transient auf *apterous*, um in der frühen Flügelimaginalscheibe (zwischen Mitte des L1- und Mitte des L2-Stadiums) die *ap*-Expression zu aktivieren (Wang et al., 2000; Zecca und Struhl, 2002a). Die Aufrechterhaltung der *ap*-Expression erfolgt unabhängig von der Aktivität des Vn/EGFR-Signalwegs (Wang et al., 2000; Zecca und Struhl, 2002a), wenn auch der Signalweg nach Beginn der *ap*-Expression weiterhin in der proximalen Flügelscheibe aktiv bleibt. Der genaue Mechanismus, der für die Aufrechterhaltung der *ap*-Expression und dessen Ausdehnung auf das gesamte dorsale Kompartiment der Flügelscheibe verantwortlich ist, ist bisher nicht bekannt. In diesem Zusammenhang werden epigenetische Mechanismen vermutet und diskutiert (Zecca und Struhl, 2002a; Bieli et al., 2015). Dahingehend postulierten Zecca und Struhl (Zecca und Struhl, 2002a), dass der Zustand der *ap*-Expression ("on" oder "off") in den Nachkommen erhalten bleibt. Sobald *apterous* durch den Vn/EGFR-Signalweg aktiviert wurde, behalten die Zellen ihren Zustand der *ap*-Expression ("on" oder "off"), für die restliche Flügelscheibenentwicklung und unabhängig vom EGFR-Signalweg, wobei die Zellen ihren Zustand ("on" oder "off") an alle ihre Tochterzellen weitergeben (Zecca und Struhl, 2002a,b). Wenn *ap* exprimierende Zellen proliferieren, bewegen sich einige dieser Zellen aus dem Bereich mit hoher EGFR-Signalisierung heraus (Zecca und Struhl, 2002b). Dies wird als Voraussetzung für die Schaffung der D/V-Kompartimentsgrenze und der Etablierung des Signalzentrums an der D/V-Grenze angesehen, da eine hohe EGFR-Signalaktivität diesen Prozess hemmt (Zecca und Struhl, 2002b).

Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit legt einen dreistufigen Mechanismus für die Expression von *ap* nahe, der eine initiale Aktivierung, eine positive Autoregulation und eine Aufrechterhaltung der Expression durch separate CRMs umfasst (Bieli et al., 2015). In dieser Studie wurde die Regulation der Transkription von *ap* am endogenen Gen-Locus analysiert und drei cis-regulatorische Module (CRMs) identifiziert. Diese drei AP-CRMs sind: apE, apDV und apP. Nur bei Kombination dieser drei regulatorischen Elemente (CRMs), wurde eine einheitliche und vollständige *ap*-Expression erhalten (Bieli et al., 2015). Als frühestes der drei ap-CRMs wird apE in den proximalen Zellen der Flügelscheibe durch den EGFR Signalweg aktiviert; später wird die apE-Expression in der pouch nachlassen. Eine Deletion dieses frühen Enhancers verhindert die Flügelbildung vollständig. (Bieli et al., 2015). Die Aktivierung des apDV Enhancers erfolgt erst nach Induktion von Ap durch den frühen apE Enhancer, da ein autoregulatorischer Einfluss von Ap erforderlich ist. Die apDV-Aktivierung erfolgt in einem Teil der dorsal gelegenen apE-positiven Zellen. Durch den positiven Einfluss von Ap und Vg/Sd auf apDV wird dessen Aktivität auf die dorsal-distale Domäne (D/V-Grenze) der pouch beschränkt (Bieli et al., 2015). Über den Notch Signalweg induziert Ap indirekt die Expression von *vg* an der D/V-Grenze (Kim et al., 1996). Folglich erfolgt die Aktivierung des apDV durch positive

Autoregulation direkt durch Ap und indirekt durch Vg/Sd, wodurch auch die räumliche Aktivität des Enhancers begrenzt wird (Bieli et al., 2015).

Im zweiten Larvenstadium wird – an der Schnittstelle zwischen ap exprimierenden und nicht-ap exprimierenden Zellen – die Etablierung der D/V-Kompartimentsgrenze wie auch des D/V-Signalzentrums eingeleitet. Hierbei kontrolliert Ap eine Kaskade an Genexpressionen, was schließlich zur Aktivierung von Notch an der D/V-Grenze führt. Die Hauptkomponenten des Notch-Signalweges bestehen in *Drosophila* aus dem Rezeptor Notch (N), den Liganden Delta (DI) und Serrate (Ser), sowie dem Effektor Suppressor of Hairless (Su(H)). Der Notch-Signalweg dient der Signalübertragung zwischen benachbarten Zellen, dabei befinden sich Rezeptor (N) und Ligand (DI bzw. Ser) auf verschiedenen Zellen (*in trans*) (zusammengefasst in Mumm und Kopan, 2000).

Durch die Aktivität von Ap wird *Ser* zunächst (Mitte bis spätes L2) nur in den dorsalen Zellen der Flügelimaginalscheibe exprimiert (Speicher et al., 1994; Kim et al., 1995). DI wird dagegen ubiquitär exprimiert, jedoch mit einem erhöhten Expressionsniveau in den ventralen Zellen der Flügelimaginalscheibe (de Celis und Bray, 1997). Notch selbst wird ebenfalls ubiquitär exprimiert. *fringe* (*fng*) wird durch Ap aktiviert (als eines der ersten Zielgene) und wie *Ser* in den dorsalen Zellen der Flügelscheibe exprimiert (Irvine und Wieschaus, 1994). Das Gen *fringe* kodiert eine N-acetylglucosaminyltransferase, welche die Aktivität des Notch-Rezeptors dahingehend modifiziert, dass sich dessen Bindungseigenschaften zu seinen Liganden verändert (Bruckner et al., 2000). Für die Bindung von *Ser* wurde eine inhibitorische Wirkung und für DI eine erhöhte Bindungsaffinität zu Notch beschrieben (Bruckner et al., 2000; Fleming et al., 1997; Panin et al., 1997). Die von *Fng* vermittelten Modifikationen führen dazu, dass *Ser* nur aus dorsalen Zellen in ventrale Zellen signalisieren kann, also aus *fng* exprimierende Zellen in Zellen ohne *fng*-Expression (Fleming et al., 1997; Klein und Arias, 1998b). DI signalisiert hingegen von ventralen zu dorsale Zellen (Doherty et al., 1996; Klein und Arias, 1998b). Infolgedessen wird der Notch-Signalweg in einem schmalen Zellstreifen zwischen dorsalem und ventralem Kompartiment aktiviert. Die Aktivierung des Notch-Rezeptors führt zur Transkription einer Reihe von Genen beiderseits der D/V-Grenze; unter anderem *wg*, *cut* und *vg* sowie N, DI und *Ser*. Durch mehrere positive und negative Rückkopplungsschleifen wird die Aktivität des Notch-Signalweges auf einen zwei Zellen breiten Zellstreifen entlang der D/V-Grenze begrenzt. Es wird angenommen, dass *Wg* und N durch eine positive Rückkopplungsschleife zur Aufrechterhaltung der *Ser*- und DI-Expression, an der D/V-Grenze, beitragen (Panin et al., 1997; de Celis und Bray, 1997). Das Gen *cut* kodiert einen transkriptionellen Repressor (Jack und DeLotto, 1995). Mit Beginn der *cut*-Expression an der D/V-Grenze, Mitte des dritten Larvenstadiums, reduziert sich das Niveau der Liganden *Ser* und DI in den beiden Zellreihen unmittelbar an der D/V-Grenze. *wg* kodiert für ein sekretiertes Glykoprotein, das in der Lage ist mehrere Zelldurchmesser weit zu diffundieren und in nahe gelegenen Zellen seine Rezeptoren Frizzled (Fz2) und Arrow (Arr) zu aktivieren (Bhanot et al., 1996; Seto und Bellen, 2004; Wehrli et al., 2000). *Wg* aktiviert die Expression von *Ser* und DI, in nahe gelegenen Zellen, entlang der D/V-Grenze (de Celis und Bray, 1997; Micchelli et al., 1997). Die hohe Konzentration der Liganden *Ser* und DI führt zur sogenannten *cis*-Inaktivierung, d.h. zur zellautonomen Inhibierung des Notch-Rezeptors, in den beiden Zellreihen die nicht unmittelbar an der D/V-Grenze lokalisiert sind (Micchelli et al., 1997). Die Restriktion der Notch-

Aktivität auf einen schmalen Zellstreifen entlang der D/V-Grenze ist erforderlich, um diesen Bereich als Signal- und Organisationszentrum der Flügelimaginalscheibe und für die Flügelentwicklung zu etablieren (de Celis et al., 1996).

Im dritten Larvenstadium induziert *apterous* die Expression des kompetitiven Inhibitors dLMO, der die Ap-Aktivität negativ reguliert (Milán et al., 1998; Milán und Cohen, 2003). Dadurch wird der Zeitraum begrenzt, in dem Ap die asymmetrischen Expressionsmuster von *Ser* und *fng* induzieren kann (Milan und Cohen, 2000). Aufgrund des ansteigenden dLMO Levels, in der ersten Hälfte des dritten Larvenstadiums, wird die Aktivität von Ap reduziert und folglich auch die *apterous*-abhängige Expression von *Ser* und *fng*. Mitte des dritten Larvenstadiums, werden dann *Ser*, *fng* und *DI* in einem symmetrischen, *apterous*-unabhängigen Muster entlang der D/V-Grenze exprimiert. Dadurch wird die Signalisierung an der D/V-Grenze unabhängig von *apterous* und nur *Ser*, *DI* und *Wg* sind an der Erhaltung des Signalzentrums (an der D/V-Grenze) beteiligt (Diaz-Benjumea und Cohen, 1995; Milan und Cohen, 2000).

Die verschiedenen Regulationsmechanismen an der D/V-Grenze führen im mittleren und späten dritten Larvenstadium dazu, dass in den beiden Zellreihen unmittelbar an der D/V-Grenze eine hohe Notch-Aktivität messbar ist, wohingegen in den angrenzenden Zellreihen keine Notch-Aktivität festgestellt wird.

## 1.7 Die Rolle des EGFR-Signalweges in der Flügelentwicklung

In *Drosophila* wurden bisher vier aktivierende EGFR-Liganden identifiziert: Spitz (*Spi*), Keren (*Krn*), Gurken (*Grk*) und Vein (*Vn*) (Shilo, 2003). Die drei erstgenannten gehören zur EGF/TGF- $\alpha$  Familie und werden als inaktive Transmembran-Proteine exprimiert, die zunächst durch Proteolyse (Prozessierung) aktiviert werden müssen (Shilo, 2005). *Grk* übt seine Funktion ausschließlich während der Oogenese aus (Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1993). *Krn* besitzt nur eine untergeordnete Rolle, so sind *krn* mutante Fliegen homozygot lebensfähig (McDonald et al., 2006). Spitz gilt als Haupt-Ligand des EGF-Rezeptors, der für die Aktivierung des EGFR-Signalweges in den meisten Geweben verantwortlich ist (Rutledge et al., 1992). Spitz wird als inaktiver membranständiger Vorläufer (*mSpi*) (in den meisten oder allen ektodermalen Zellen) exprimiert (Rutledge et al., 1992, Sturtevant et al., 1993). Die Prozessierung von *mSpi* wird durch die beiden Transmembranproteine Rhomboid (*Rho*, eine Protease) und Star (*S*, ein Chaperon) reguliert (Bier et al., 1990; Kolodkin et al., 1994; Schweitzer et al., 1995a). Im Gegensatz zu *spi*, *Star* und *Egfr*, die in den meisten entwicklungsaktiven Geweben ubiquitär exprimiert werden, wird *rho* in einem räumlich beschränkten und dynamischen Muster exprimiert (Bier et al., 1990, Rutledge et al. 1992; Sturtevant et al., 1993). Damit ist die *Rho*-Expression die limitierende Komponente bei der Aktivierung des *Spi*/EGFR-Signalweges (Golembo et al., 1996b). In der Flügelimaginalscheibe wird *rho* erst im späten dritten Larvenstadium exprimiert und weder *Spi* noch *Rho* sind für die normale DV-Unterteilung (oder Segregation der Flügel-Notum-Primordien) erforderlich (Sturtevant et al., 1993; Simcox, 1997). In der L3 Flügelimaginalscheibe wird *rho* in einem Teil des dorsalen Radius und der Trachee stark exprimiert, wie auch in den Zellen der *pouch* die sich zu den Longitudinalvenen entwickeln und den

zukünftigen Flügelrand bilden (Sturtevant et al., 1993). Innerhalb des Notums wurde eine schwache *rho*-Expression in den meisten proneuralen Clustern nachgewiesen (Culi et al., 2001).

Die Vn-Expression im dorso-proximalen Bereich der frühen Flügelimaginalscheibe ist für die normale Expression von *apterous* und der Gene des *iroquois* Komplexes (*iro-C*) notwendig (Wang et al., 2000; Zecca und Struhl, 2002a). Dahingegen induziert eine ektopische Vn-Expression im V-Kompartiment der ansonsten wildtypischen Flügelscheibe keine ektopische *ap*- oder *iro-C*-Expression (Zecca und Struhl, 2002a). Innerhalb des ventralen Kompartiments lokalisierte Rho exprimierende Klone – welche als ektopische Quellen von aktivem Spi fungieren – resultieren in einer ektopischen nicht-zellautonomen Expression von *apterous* und der *iro-C*-Genen (genauer: *mirr-lacZ*), in ansonsten wildtypischen Flügelscheiben (Zecca und Struhl, 2002a). In *vn*-mutanten Scheiben stimulieren Rho exprimierende Klone die *ap*- und *iro-C*-Genexpression unabhängig von ihrer Position (Zecca und Struhl, 2002a). Dagegen sind Vn exprimierende Klone nur dann in der Lage die Expression beider Gene zu retten, wenn sie im D-Kompartiment von *vn* mutanten Flügelscheiben lokalisiert sind (Zecca und Struhl, 2002a).

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Der T-box Transkriptionsfaktor Omb ist essentiell für die Flügelentwicklung. Die Flügel von *omb* Nullmutanten Fliegen sind rudimentär. Mit gentechnischen Methoden ist es möglich, die Bedeutung von Omb in verschiedenen Bereichen des Flügels gezielt zu untersuchen. So wurde gezeigt, dass die gradientenförmige Expression von Omb entlang der anterior-posterioren (A-P) Achse notwendig ist, um eine gleichförmige Zellproliferation in der larvalen Flügelimaginalscheibe zu gewährleisten. Omb ist auch notwendig um die A/P-Kompartimentsgrenze, eine zentrale musterbildende Struktur, zu stabilisieren.

In der vorliegenden Arbeit sollen vor allem zwei Aspekte der Omb Funktion untersucht werden.

1) Eine mögliche Rolle von Omb in Bildung oder Stabilisierung der dorso-ventralen (D/V) Kompartimentgrenze.

Die D/V-Grenze bildet sich nach einem anderen Mechanismus als die A/P-Grenze und wird möglicherweise auch anders stabilisiert. Eine Rolle von Omb ist bislang nur spekulativ. Allerdings ist bekannt, dass in *omb* mutanten Flügelimaginalscheiben Apterous, die Determinante des dorsalen Zellschicksals, ektopisch ventral exprimiert wird.

2) Die Bedeutung von Omb für die Entwicklung des Flügelgelenks.

Das hypomorphe *omb* Allel *omb<sup>bifid</sup>* hat einen spezifischen Defekt in der Entwicklung des Flügelgelenks. In der Flügelimaginalscheibe hat Omb seine stärkste Expression im Primordium des Flügelgelenks. Viele Gene mit einer Rolle in der Flügelgelenkentwicklung sind bekannt. Hier soll geklärt werden, in welchem regulatorischen Zusammenhang diese Gene mit *omb* stehen.

## 2 Ergebnisse und Diskussion (Thema 1)

### 2.1 *apterous* (*ap*)

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer veränderten Expression von *omb* auf die *apterous* (*ap*) - Expression mittels einer Enhancer-Trap-Linie (*ap-lacZ*) und eines Antikörpers gegen das Protein Apterous untersucht. Wie in der Literatur beschrieben, markierte die *ap*-Expression das gesamte dorsale Kompartiment der Flügelimaginalscheibe (Williams et al., 1993).

#### 2.1.1 Systemischer *omb*-Verlust und *ap-lacZ*-Expression

Die *ap-lacZ*-Expression wurde zunächst mittels X-Gal Färbung in wildtypischen und *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten L3 Flügelscheiben untersucht (Abb. 4). In wildtypischen L3 Flügelscheiben markierte die *ap-lacZ*-Expression das gesamte dorsale Kompartiment (Abb. 4 A, G; Abb. 10) – vergleichbar mit der anti-Ap Immunfärbung (Abb. 5). In *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten L3 Flügelscheiben wurde zusätzlich zur dorsalen Expression eine ektopische *ap-lacZ*-Expression im V-Kompartiment nachgewiesen (Abb. 4). Diese ektopische ventrale Expression war in Flügelscheiben des mittleren L3 Stadiums durch einen schmalen Zellstreifen aus *ap-lacZ*-negativen Zellen vom endogenen dorsalen *ap-lacZ* Muster getrennt (Abb. 5 D-F). Bei Flügelscheiben des späten L3 Stadiums war eine derartige Trennung nicht zweifelsfrei feststellbar. Hierbei war eine Unterscheidung der dorsalen und ventralen *ap-lacZ* Färbung durch morphologische Defekte, wie z.B. ektopische Falten innerhalb der pouch, sowie die beginnende Evagination der Imaginalscheibe im sehr späten L3 Stadium, erschwert (Abb. 5 I-L). In Ausnahmefällen bestand eine deutliche Kontinuität zwischen der endogenen und der ektopischen *ap-lacZ*-Expression (Abb. 5 B, H). In diesen Fällen lag die ektopische Expression vornehmlich im P-Kompartiment. Ein vergleichbarer Phänotyp konnte auch bei der Immunfluoreszenzfärbung für Wg, in Ausnahmefällen, beobachtet werden (nicht gezeigt).

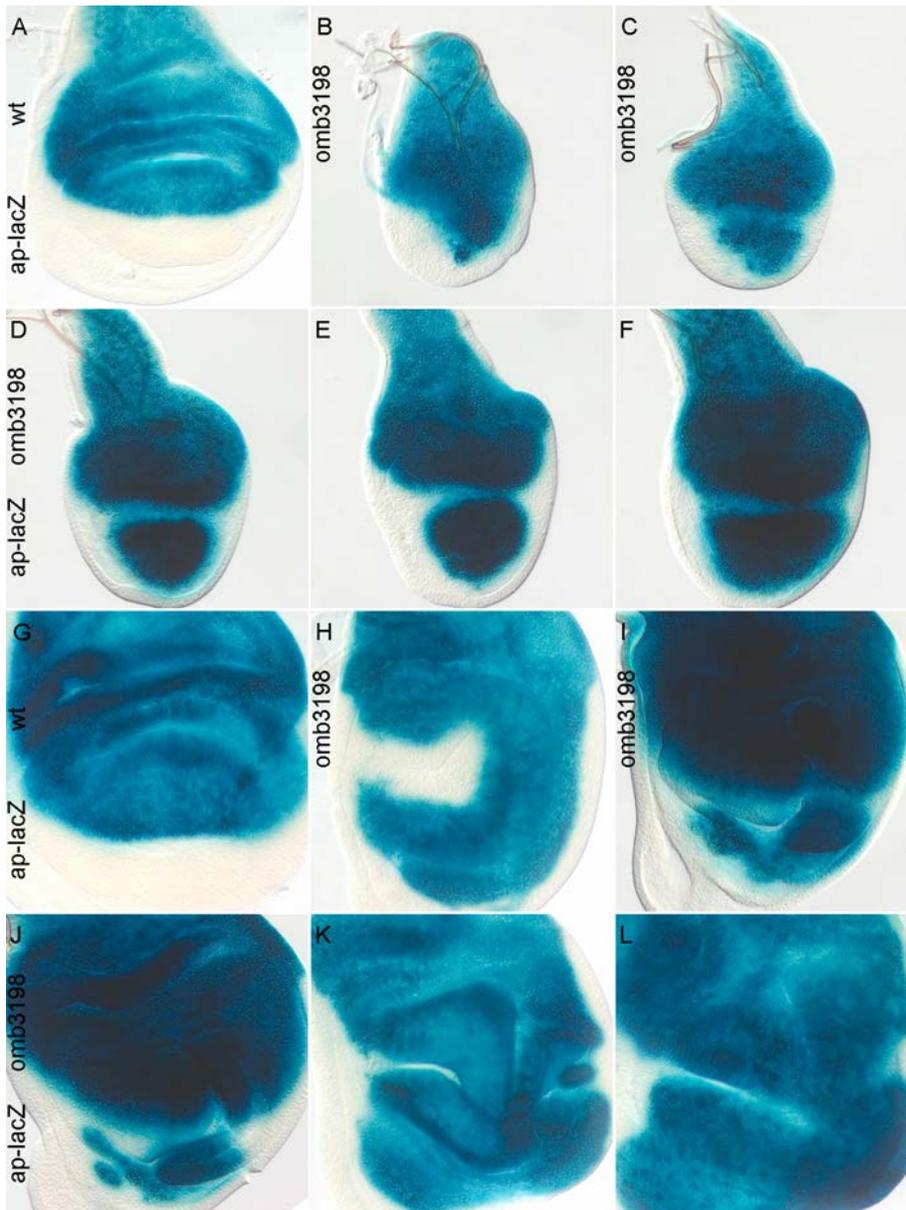


Abbildung 4 Expressionsmuster von *ap-lacZ* in *wt* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
 Die *ap-lacZ*-Expression in Flügelscheiben von *wt* (Kontrolle; A, G) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (B-F, H-L) Larven des dritten Larvenstadiums wurde mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. Dargestellt sind Flügelscheiben des frühen (B, C), mittleren (D-F) und späten (H-L) dritten Larvenstadiums. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. (A, G) In *wt* Flügelscheiben markiert die *ap-lacZ*-Expression das dorsale Kompartiment. (B-F, H-L) In *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten Flügelscheiben des frühen, mittleren und späten L3 Stadiums war eine ektopische *ap-lacZ*-Expression im V-Kompartiment zu erkennen.

### 2.1.2 Systemischer *omb*-Verlust und Ap-Expression

Um zu untersuchen, wie sich eine verringerte *omb*-Expression auf Ap auswirkt, wurden Imaginalscheiben der Serie *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* gegen Ap gefärbt (Abb. 5; Abb. 6; Abb. 8).

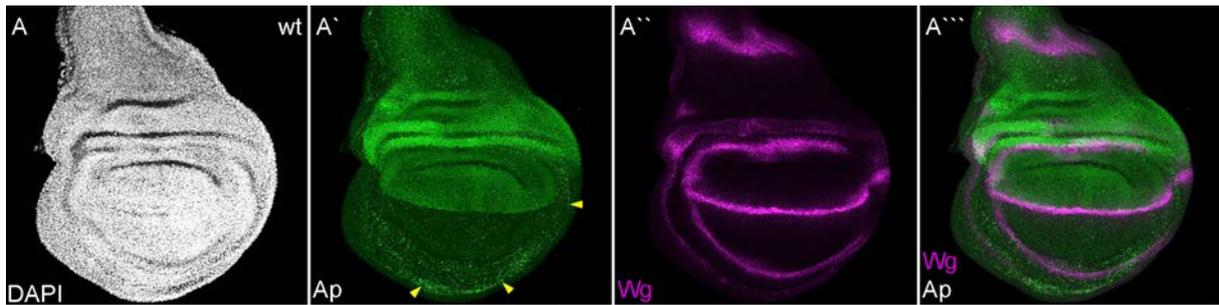


Abbildung 5 Ap- und Wg-Expression in *wt* Flügelscheibe

Dargestellt ist eine *wt* (A) L3 Flüglimaginalscheibe. DAPI (Weiß; A), anti-Ap (Grün; A'), anti-Wg (Magenta; A''), Überlagerung des anti-Ap (Grün) und anti-Wg (Magenta) Signals (A'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A') Die Immunfluoreszenzfärbung von Ap markiert ausschließlich das dorsale Kompartiment. (A') Unspezifische Färbungen sind markiert (gelbe Pfeilspitze). Die Fluoreszenzbilder in Abb. 5 bis Abb. 9 – der Serie *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* – wurden unter Verwendung der gleichen Einstellungen mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen (siehe 5.2.17).

Im überwiegenden Teil der *omb* hypomorphen (*bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>*) L3 Flügelscheiben wurde keine Fehlexpression von Ap festgestellt (nicht gezeigt). Entlang der D/V-Grenze wurde Wg in Ap+ (Ap positiven) und Ap- (Ap defizienten) Zellen exprimiert (Abb. 6; Abb. 7 B-D), ähnlich wie in *wt* (Abb. 7 A). In nur 3 von insgesamt 21 analysierten *omb* hypomorphen Flügelscheiben (*bi*: 1 von 9; *bi/omb<sup>3198</sup>*: 2 von 12) wurde eine ektopische Ap-Expression innerhalb des ventralen Kompartiments nachgewiesen (Abb. 6; Abb. 7 B-D). In zwei Fällen (*bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>*) war die ektopische Ap-Expression in der Nähe der D/V-Grenze lokalisiert (Abb. 6 A, C). An deren Ränder wurde Wg sowohl in Ap+ als auch in Ap- Zellen exprimiert. In einer jüngeren L3 *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheibe lag die ektopische Ap-Expression hingegen in der proximalen pouch, in der Nähe der ventralen Wg-IR-Domäne (Abb. 6 B). In diesem Fall wurde am Rand der Ap-Expression keine ektopische Wg-Expression festgestellt.

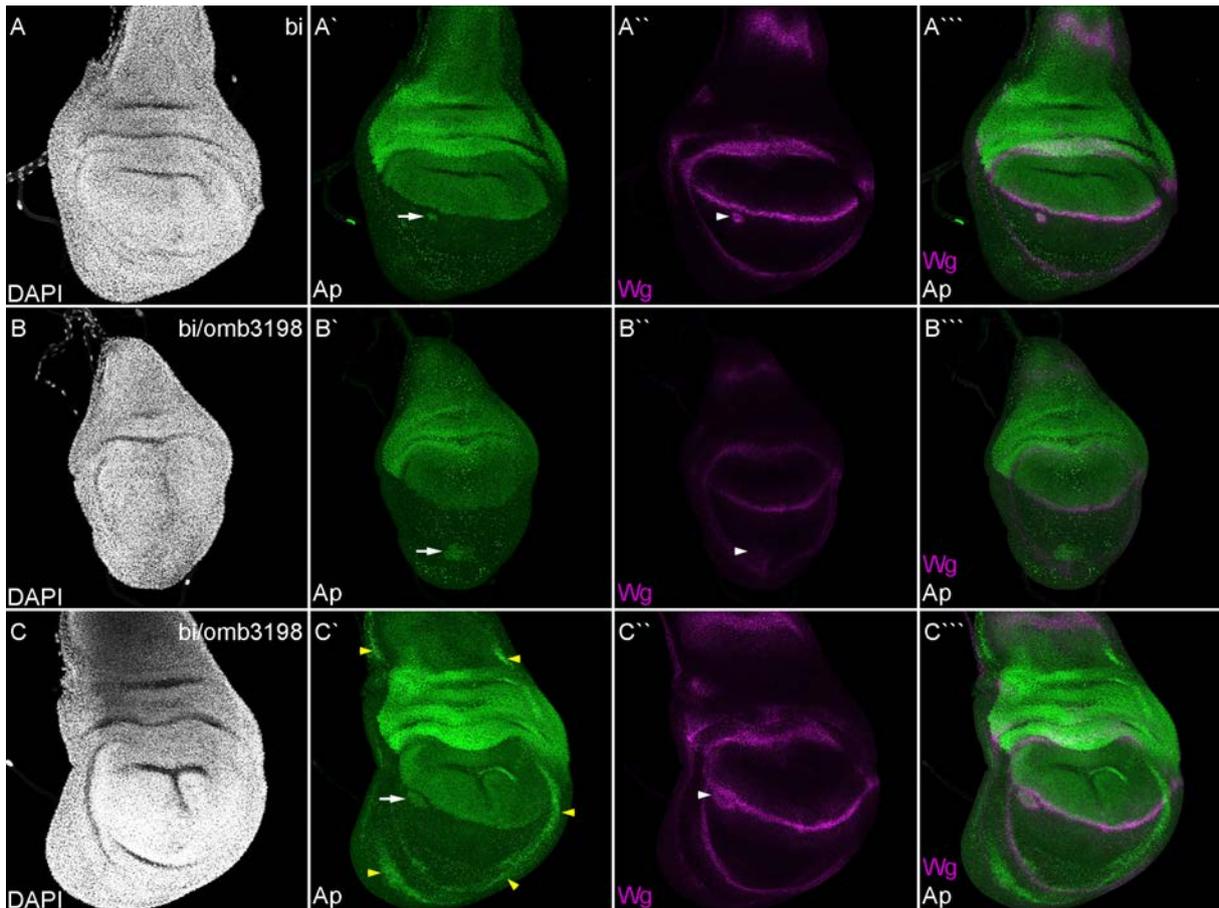


Abbildung 6 Ap- und Wg-Expression in *bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
 Dargestellt sind *bi* (A) und *bi/omb<sup>3198</sup>* (B, C) L3 Flüglimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-C), anti-Ap (Grün; A'-C'), anti-Wg (Magenta; A''-C''), Überlagerung des anti-Ap (Grün) und anti-Wg (Magenta) Signals (A'''-C'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A'-C'') Die Flügelscheiben zeigen im V-Kompartiment eine ektopische Ap-Expression (weiße Pfeile) sowie eine ektopische Wg-Expression (weiße Pfeilspitzen). (C') Unspezifische Färbungen sind markiert (gelbe Pfeilspitzen).

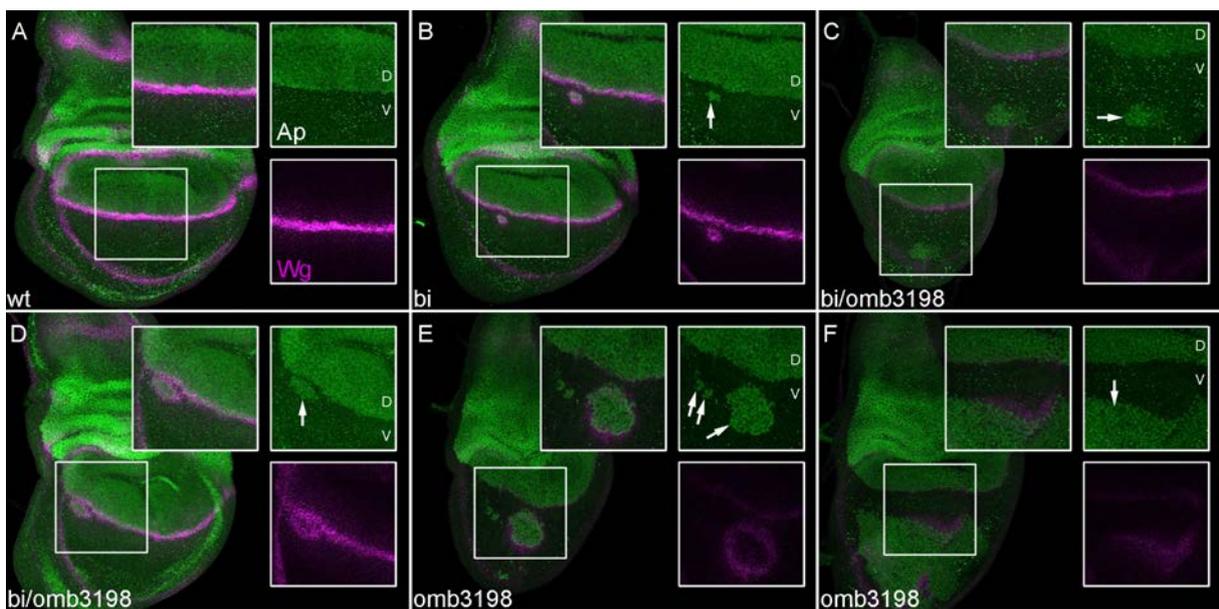


Abbildung 7 Ap- und Wg-Expression in *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *wt* (A), *bi* (B), *bi/omb<sup>3198</sup>* (C, D) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (E, F) L3 Flügelimaginalscheiben. (A-F) anti-Ap (Grün), anti-Wg (Magenta), Überlagerung des anti-Ap (Grün) und anti-Wg (Magenta) Signals. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Das linke Quadrat kennzeichnet jeweils den Bereich der Flügelscheibe der in den rechten oberen Quadranten vergrößert dargestellt ist. Weiße Pfeile markieren ektopische Ap-Expression im V-Kompartiment.

In beinahe allen untersuchten *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben wurde im V-Kompartiment eine ektopische Ap-Expression nachgewiesen (Abb. 8; Abb. 9). Die einzige Ausnahme bildet eine Flügelscheibe des sehr frühen L3-Stadiums (nicht gezeigt). Frühe und mittlere L3 *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben (Abb. 8 A-C) zeigten im Wesentlichen eine einzelne große Ap+ Domäne im V-Kompartiment. In späten L3 *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben (Abb. 8 D-F; Abb. 9) wurde Ap hauptsächlich in einer oder mehreren großen Domänen ektopisch exprimiert. Diese Ap+ Haupt-Domänen konnten eine regelmäßige Form mit glatten Rändern besitzen (Abb. 8 F) oder eine teilweise unregelmäßige Form aufweisen (Abb. 8 D). Zusätzlich wurde auch in kleineren Zellgruppen Ap nachgewiesen (Abb. 8 E). Während die größeren Ap+ Haupt-Domänen vorwiegend medial positioniert waren, wurden kleinere Ap+ Zellgruppen auch im lateralen Bereich der Flügelscheibe festgestellt.

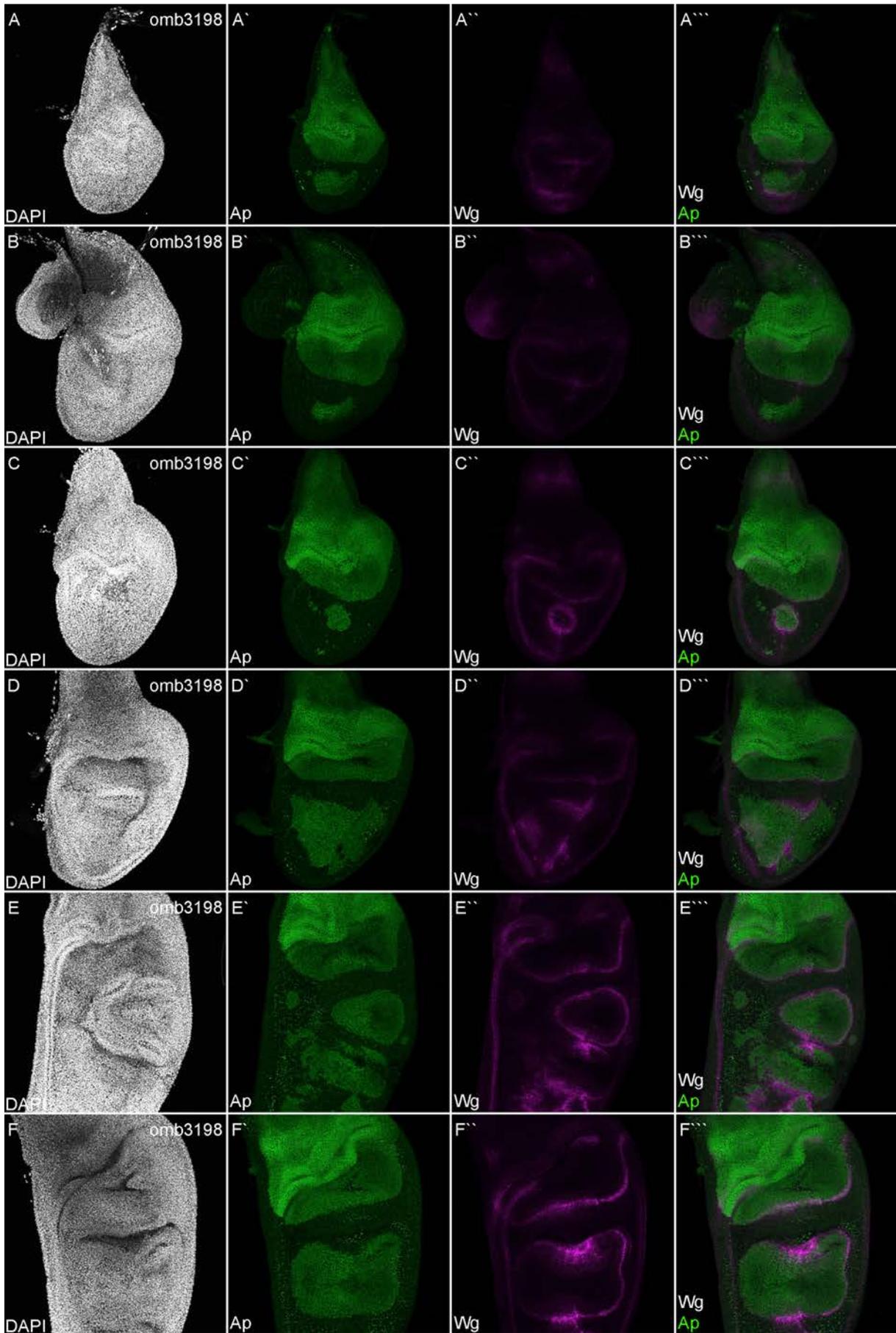


Abbildung 8 Ap- und Wg-Expression in *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *l(1)omb<sup>3198</sup>* (A-F) L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-F), anti-Ap (Grün; A'-F'), anti-Wg (Magenta; A''-F''), Überlagerung des anti-Ap (Grün) und anti-Wg (Magenta) Signals (A'''-F'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A'-D') Flügelscheiben zeigen im V-Kompartiment eine ektopische Ap-Expression. (A''-F'') Die Intensität des anti-Wg Signals wurde mittels Tonwertkorrektur erhöht.

In der *wt* L3 Flügelscheibe zeigten verschiedene Bereiche des dorsalen Kompartiments eine unterschiedlich starke Ap-Expression. Die Expression in der hinge war stärker als im Notum und in der pouch. Auch in *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben variierte die Intensität der Immunfluoreszenzfärbung (Fluoreszenz-Intensität) von Apterous (Abb. 8; Abb. 9). Dabei spiegelten die Ap+ Haupt-Domänen anscheinend die Situation in der dorsalen pouch wieder.

Im Folgenden wird die Wg-Expression in Bezug auf die Ap-Expression in *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben erläutert. An der D/V-Grenze von *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben – wie auch in *wt* – wurde Wg sowohl in Ap+ als auch in Ap- Zellen detektiert. Allerdings erschien die Immunfluoreszenzfärbung von Wg in den meisten Flügelscheiben medial etwas stärker und breiter als lateral (Abb. 8).

Im V-Kompartiment wurde am gesamten Rand der Ap+ Haupt-Domäne eine Wg-Expression festgestellt, wenn die Domäne eine regelmäßige Form mit glatten Ränder besaß und die Fluoreszenz-Intensität von Ap am Rand weitestgehend gleichmäßig stark war (Abb. 8 C, E, F). Diese Wg-Expression wies in späten L3 Flügelscheiben Gemeinsamkeiten mit der Wg-Expression an der D/V-Grenze auf; insofern als in der Nähe der Wg-IR-Domäne die Expression im anterior-lateralen Bereich schwächer war als im posterior-lateralen Bereich (Abb. 8 F) und im medialen Bereich die stärkste Wg-Expression nachweisbar war. Bei unregelmäßig geformten Ap+ Haupt-Domänen wurde entweder keine streifenartige Wg-Expression an den Rändern festgestellt oder nur an einem Teil der Ränder (Abb. 8 D). In der lateralen Flügelscheibe zeigten abgerundete Ap+ Zellgruppen eine sehr schwache Wg-Expression an deren Rand (Abb. 9 B, C; Anhang Abb. 73 B, C und zugehörige Beschreibung).

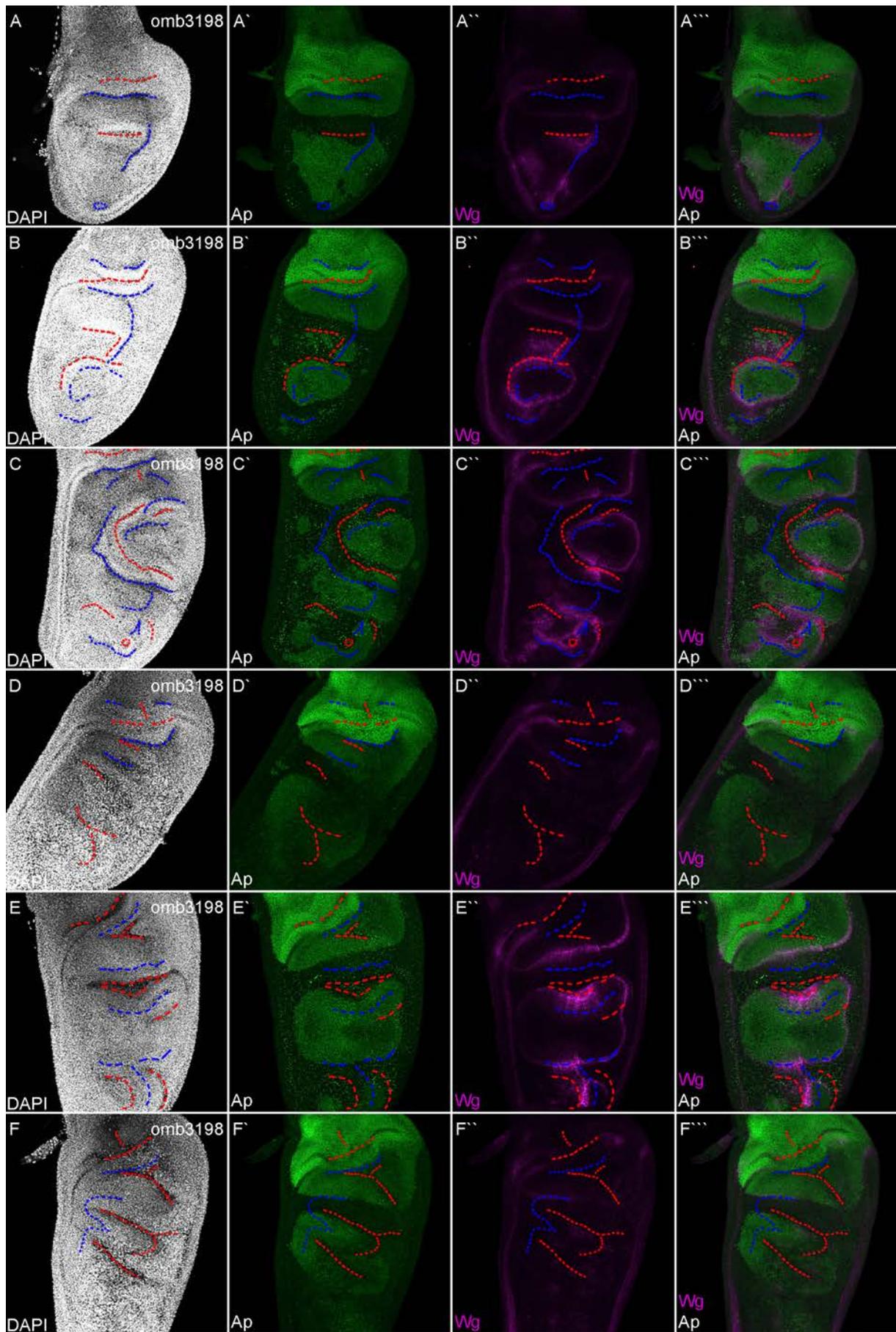


Abbildung 9 Ap- und Wg-Expression in  $l(1)omb^{3198}$  Flügelscheiben

Dargestellt sind  $I(1)omb^{3198}$  (A-F) L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-F), anti-Ap (Grün; A'-F'), anti-Wg (Magenta; A''-F''), Überlagerung des anti-Ap (Grün) und anti-Wg (Magenta) Signals (A'''-F'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. Apikale Falten (Rot) und basale Falten (Blau) wurden markiert (Auswahl). (A''-F'') Die Intensität des anti-Wg Signals wurde mittels Tonwertkorrektur erhöht.

Zwei  $I(1)omb^{3198}$  Flügelscheiben, des späten dritten Larvenstadiums, zeigten in der distalen Flügelscheibe ein ungewöhnliches und abweichendes Expressionsmuster für Ap und Wg (Abb. 9 D, F; Anhang Abb. 73 D, F). Dies zeigte sich im Fehlen der Immunfluoreszenz von Wg in der medialen pouch und im medialen Bereich der ventralen hinge sowie in einer schwächeren Immunfluoreszenz von Ap innerhalb der dorsalen pouch und innerhalb der ektopischen Ap+ Haupt-Domänen im V-Kompartiment. Die Intensität des Fluoreszenzsignals - und somit wahrscheinlich auch die Stärke der Expression - von Ap war im medialen Bereich der dorsalen pouch besonders niedrig, im Vergleich zu anderen Flügelscheiben (Abb. 9 D, F). Aufgrund der schwachen Immunfluoreszenz von Ap, war im medialen Bereich der Flügelscheibe keine deutliche Grenze zwischen Ap+ und Ap- Zellen feststellbar. Hierbei wurde in den betroffenen Bereichen auch keine streifenartige Wg-Expression - an der Position der normalen D/V-Grenze - detektiert (Abb. 9 D, F). In der lateralen Flügelscheibe - wo die Immunfluoreszenz von Ap normal erschien - wurde hingegen eine schwache Wg-Expression, an der bestehenden D/V-Grenze, festgestellt (Abb. 9 D, F). Dies deutet darauf hin, dass - in den betroffenen Flügelimaginalscheiben - die D/V-Kompartimentsgrenze in der lateralen Flügelscheibe noch bestand hatte, wohingegen sie im medialen Bereich der Flügelscheibe nicht mehr existent war. Bei den zwei  $I(1)omb^{3198}$  Flügelscheiben wurde ein ähnlicher Phänotyp - wie in der dorsalen pouch - auch in der ventralen pouch beobachtet (Abb. 9 D, F). Hierbei war ebenfalls der mediale Bereich der Ap+ Haupt-Domäne des ventralen Kompartiments besonders betroffen. Die äußerst schwache Immunfluoreszenzfärbung von Wg innerhalb der ventralen pouch (Abb. 9 D, F) erzeugte nach Intensitätserhöhung des Wg-Signals (siehe 5.2.18) ein fleckiges Muster (Anhang Abb. 73 D, F und zugehörige Beschreibung). Im Hinblick auf die Expression in der Wg-IR-Domäne, war in der lateralen Flügelscheibe (d.h. abgesehen vom medialen Bereich der ventralen hinge) kein Unterschied zwischen den zwei Flügelscheiben (dargestellt in Abb. 9 D, F) und den übrigen späten L3  $I(1)omb^{3198}$  Flügelscheiben feststellbar (Abb. 9).

Im Allgemeinen war bei  $I(1)omb^{3198}$  Flügelscheiben, hinsichtlich einer schwachen Immunfluoreszenz von Ap im V-Kompartiment, ein vergleichbarer Phänotyp zu beobachten. Dabei wurde bei Ap+ Domänen mit einer schwachen Fluoreszenz-Intensität von Ap - am Rand der Expressionsdomäne - keine streifenartige Wg-Expression festgestellt (Abb. 8). Wie auch in Abb. 6 und Abb. 7 gezeigt, war im V-Kompartiment von *omb* hypomorphen Flügelscheiben ein ähnlicher Effekt zu beobachten. Die Zellgruppen mit einer starken Ap-Expression exprimierten Wg an deren Ränder (Abb. 7 B, D) während eine Zellgruppe mit einer ungleichmäßig starken Ap-Expression keine streifenartige Wg-Expression erkennen ließ (Abb. 7 C).

Sowohl *omb* hypomorphe (*bi*, *bi/omb*<sup>3198</sup>) als auch *omb* Nullmutante ( $I(1)omb^{3198}$ ) Flügelimaginalscheiben weisen am Ende der Larvalentwicklung morphologische Defekte auf (siehe

beispielsweise Abb. 6 A, C; Abb. 8 E, F). Beispielsweise zeigen *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben entlang der A/P-Grenze eine ektopische Falte innerhalb der pouch (siehe Shen et al., 2008). Dahingegen lassen sich in *l(1)omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben drastischere morphologische Defekte beobachten, wie z.B. eine Vielzahl ektopischer apikaler und basaler Falten – sowohl entlang der A-P als auch der D-V Achse – wie auch eine massive Überproliferation und Apoptose (siehe 4.9.1 und 4.9.2). Zusätzlich wurde in der dorsalen hinge von *omb* hypomorphen (*bi*, *bi/omb*<sup>3198</sup>) L3 Flügelscheiben eine Erweiterung der Falten beobachtet (siehe 4.8.1).

Im Folgenden wird der räumliche Zusammenhang zwischen der ektopischen Expression von Ap bzw. Wg und den Falten in *l(1)omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben beschrieben. Besonders auffällig waren die Größenzunahme der Imaginalscheibe und die ektopischen Falten in *l(1)omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben des späten dritten Larvenstadiums. In Abb. 9 sind prominente Falten innerhalb der pouch, von späten L3 *l(1)omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben, durch gestrichelte Linien gekennzeichnet (Abb. 9 und zugehörige Beschreibung).

Bei regelmäßig geformten Ap+ Haupt-Domänen (im V-Kompartiment) wurde am weitesten dorsal und/oder am weitesten ventral gelegenen Rand eine breitere streifenartige Immunfluoreszenzfärbung von Wg beobachtet, im Vergleich zu den lateral gelegenen Ränder der Domäne (Abb. 9 B, C, E). Der Vergleich des Wg Musters mit der Position der ektopischen Falten ergab, dass diese breitere streifenartige Wg Färbung meist parallel zu einer oder mehreren ektopischen Falten verlief (Abb. 9 B, C, E). Dies lässt vermuten, dass eine Verbindung zwischen der Breite der Wg Färbung und den ektopischen Falten bestand. Eine mögliche Erklärung liefert der morphologische Aufbau der Flügelimaginalscheibe (als ein einschichtiges Epithel). Bei Betrachtung der Imaginalscheibe (an einem Mikroskop) blickt man in der Regel auf die schmalen Enden der Zellen des Hauptepithels, die säulenartig nebeneinander angeordnet sind. In der Faltenregion der dorsalen hinge – wie auch im Fall ektopischer Falten – sind hingegen ganze Zellen von apikal nach basal sichtbar. Damit ist es wahrscheinlich, dass in der Maximalprojektion von Z-Bildstapeln die Wg Färbung im Bereich von ektopischen Falten – aufgrund der veränderten Zell-Morphologie – verbreitert erscheint.

Eine streifenartige Wg-Expression verlief parallel zu einer ektopischen Falte, wenn die Falte ebenfalls parallel zu einer Ap+ Domäne positioniert war. Wg wurde jedoch nicht an allen ektopischen Falten, die parallel zu Ap+ Domänen verliefen, exprimiert. Wie oben bereits erläutert, musste eine klare Grenze zwischen den Ap+ und den Ap- Zellen bestehen – die vermutlich auf eine weitestgehend gleichmäßig starke Ap-Expression am Rand der Ap+ Domäne beruht – sodass *wg* (streifenartig) am Rand der Domäne exprimiert wurde.

Wie auch in Abb. 9 gezeigt, waren in *l(1)omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben die ektopischen Falten sowohl innerhalb von Ap+ Domänen – wie z.B. in der dorsalen pouch und in Ap+ Haupt-Domänen im V-Kompartiment – als auch außerhalb dieser Domänen positioniert. Damit scheint es unwahrscheinlich, dass die (veränderte) Expression von Ap oder Wg die (ektopische) Faltenbildung (in *l(1)omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben) bewirkt.

### 2.1.3 Klonaler *omb*-Verlust und *ap-lacZ*-Expression

Die *ap-lacZ* Enhancer-Trap-Linie (siehe 2.1.1) wurde auch verwendet, um die Effekte von *omb* Nullmutante Klone (*omb* I-o-f Klone) und *omb* Überexpressionsklone (*omb* g-o-f Klone) auf die Expression von *ap* zu untersuchen. Augenmerk lag bei dieser Untersuchung vor allem auf der D/V-Kompartimentsgrenze. Die Auswirkung eines klonalen *omb* Verlustes auf die Expression von *wg* – an der D/V-Grenze sowie innerhalb der dorsalen hinge (siehe 4.2.2) – wurde unter Verwendung einer *wg-lacZ* Enhancer-Trap-Linie oder eines Antikörpers gegen das Protein Wingless untersucht. In beiden Fällen wurden ähnliche Effekte beobachtet. Da sich die D/V-Kompartimentsgrenze erst im zweiten Larvenstadium bildet wurden die Klone bereits im ersten Larvenstadium generiert, um die Auswirkungen der Klone auf die Entstehung der D/V-Grenze zu untersuchen. Flügelimaginalscheiben die Klone enthielten wurden im dritten Larvenstadium analysiert.

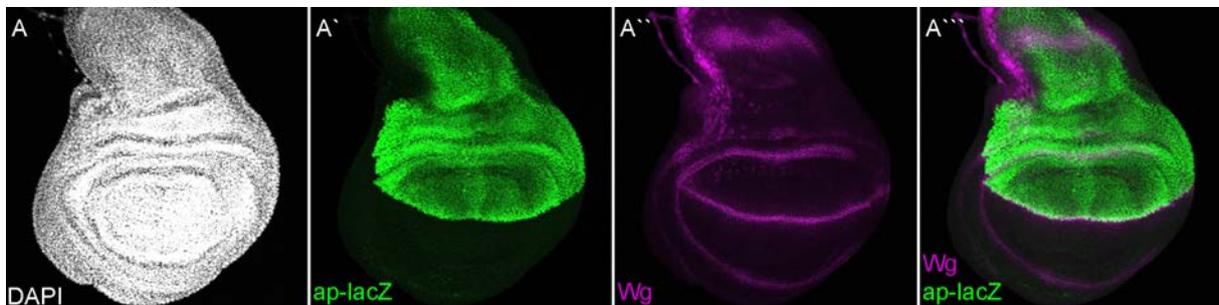


Abbildung 10 Expressionsmuster von *ap-lacZ* und *Wg* in *wt* Flügelnscheibe  
Dargestellt ist eine *wt* (Kontrolle: A) L3 Flügelimaginalscheibe. DAPI (Weiß; A), *ap-lacZ* (Grün; A'), anti-*Wg* (Magenta; A''), Überlagerung des *ap-lacZ* (Grün) und anti-*Wg* (Magenta) Signals (A'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A) In der *wt* Flügelnscheibe markiert die *ap-lacZ*-Expression das dorsale Kompartiment.

Zunächst werden die Effekte von *l(1)omb<sup>A4</sup>* mutante Klone (im Folgenden bezeichnet als *omb* I-o-f Klone) auf die D/V-Grenze beschrieben. Hierfür wurden die Klone in drei Kategorien eingeteilt:

- 1) kleine Klone, die zum Zeitpunkt der Analyse auf der D/V-Grenze positioniert waren
- 2) große Klone, die zum Zeitpunkt der Analyse die D/V-Grenze überspannten
- 3) Klone, die zum Zeitpunkt der Analyse komplett im D- oder V-Kompartiment positioniert waren

#### *omb* I-o-f Klone der Kategorie 1)

Bei Klonen der Kategorie 1) handelt es sich um *omb* I-o-f Klone, die etwa mittig auf der D/V-Grenze positioniert waren und deutlich kleiner waren als die Klone der Kategorie 2). Klone der Kategorien 2) und 1) zeigten zudem einen unterschiedlichen Phänotyp – hinsichtlich der Expression von *ap* und *wg*. In Abb. 11 (A, B) und Abb. 12 sind Flügelimaginalscheiben gezeigt, die *omb* I-o-f Klone der Kategorie 1) enthalten. Kleine *omb* I-o-f Klone, die auf der Höhe der D/V-Grenze positioniert waren – und aufgrund ihrer Größe zur Kategorie 1) gezählt wurden – zeigten in ihrer dorsalen Hälfte keine *ap-lacZ*-Expression (Abb. 11 A, B). Dies führte zu einer Ausbuchtung in der *ap-lacZ* Expressionsgrenze.

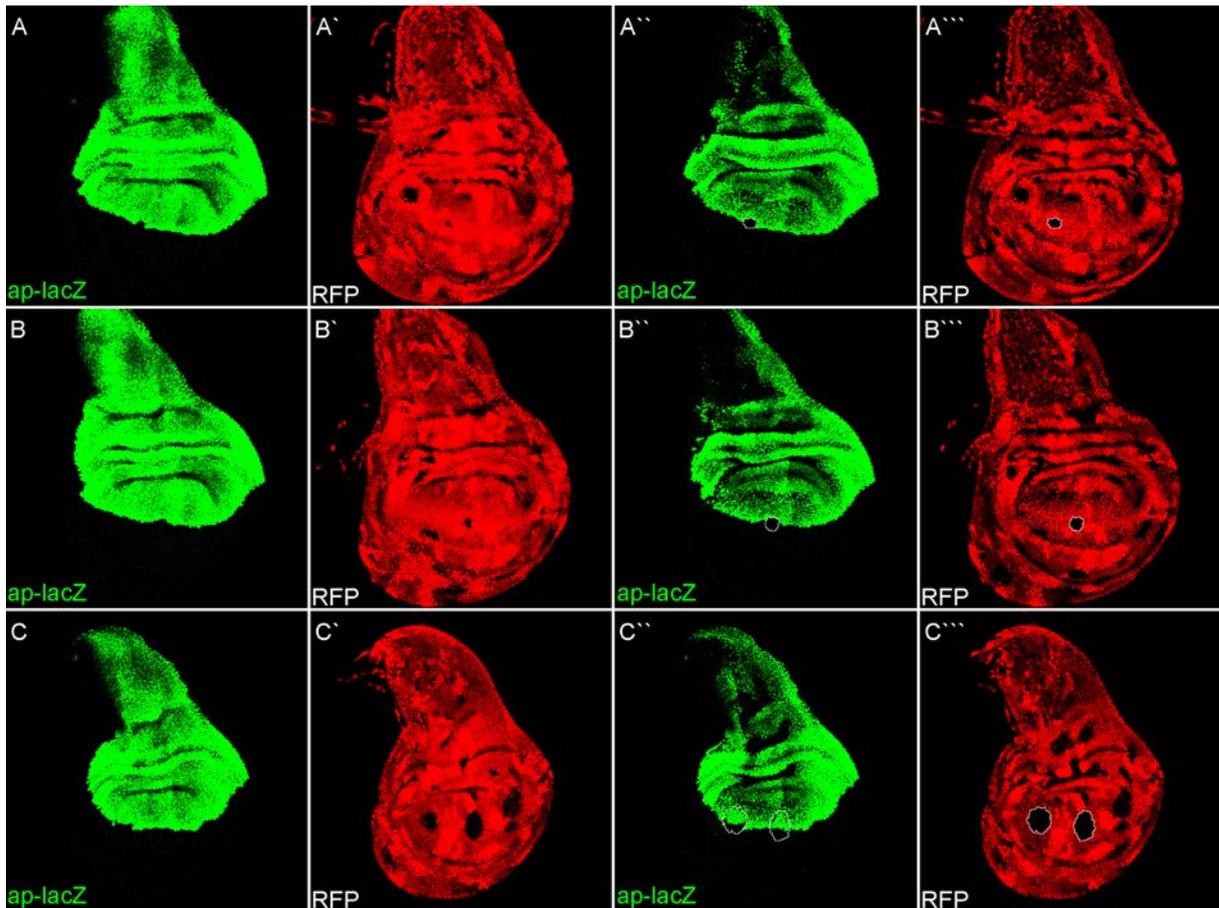


Abbildung 11 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *ap-lacZ*-Expression

Gezeigt sind *I(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben. *ap-lacZ* (Grün; A-D, A''-D''), mRFP (Rot; A'-D', A'''-D'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A''-D'') Z-Bildstapeln der basalen Hälfte. *I(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone (Auswahl) sind durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Bei *omb* l-o-f Klonen der Kategorie 1), verlief ungefähr entlang der Mittellinie des Klon, also an der Position der normalen D/V-Grenze, eine annähernd streifenartige *wg*-Expression (*wg-lacZ* und Wg, Abb. 12). Innerhalb des Klon war diese *wg*-Expression häufig an der Klonegrenze unterbrochen oder zumindest schmaler und schwächer als im Zentrum des Klon (Abb. 12). Außerhalb des Klon war die Expression in einigen Fällen verbreitert. Bei lateral positionierten Klonen betraf dies (meist) nur die distal gelegene Klonegrenze und bei medialen Klonen beide Seiten des Klon.

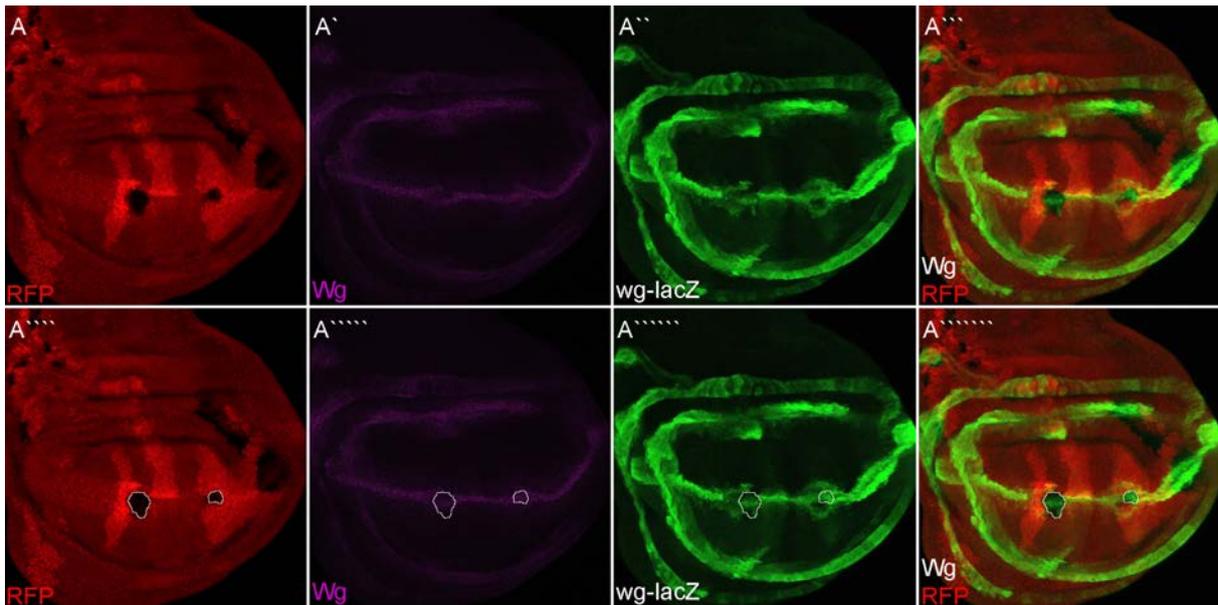


Abbildung 12 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *wg-lacZ*- und *Wg*-Expression  
 Gezeigt sind *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben. mRFP (Rot; A, A'''''), anti-*Wg* (Magenta; A', A'''''), *wg-lacZ* (Grün; A'', A'''''), Überlagerung des *wg-lacZ* (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A''', A'''''''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone (Auswahl) sind durch eine weiße Linie gekennzeichnet.

In Abhängigkeit von der Klongröße konnte entlang der Klongrenze eine zusätzliche Expression von *wg-lacZ* und im geringeren Maß von *Wg* nachgewiesen werden (Abb. 12). Bei kleinen *omb* I-o-f Klonen konnte diese Expression um den gesamten Klon verlaufen (posteriorer Klon in Abb. 12) und bei mittelgroßen Klonen umgab die Expression den Klon nur teilweise (anteriorer Klon in Abb. 12). Größere Klone zeigten hingegen keine derartige *wg*-Expression.

### *omb* I-o-f Klone der Kategorie 2)

Im Gegensatz zu Klone der Kategorie 1) zeigten große *omb* I-o-f Klone, die ebenfalls auf Höhe der D/V-Grenze positioniert waren – und aufgrund ihrer Größe der Kategorie 2) entsprachen – in der dorsalen Hälfte des Zellklons eine *ap-lacZ*-Expression (Abb. 11 C).

Klone der Kategorie 2) sind in Abb. 13 gezeigt. Bei diesen Klonen war der Effekt auf die D/V-Grenze anscheinend von der Position des Klons abhängig. *omb* I-o-f Klone welche die D/V-Grenze innerhalb des posterioren Kompartiments überspannten, zeigten entweder keinen oder nur einen schwachen Effekt auf die *ap-lacZ*- und *Wg*-Expression. Dies war auch der Fall, wenn der Klon sehr groß war und sich bis an die A/P-Kompartimentsgrenze erstreckte (Abb. 13 A). In diesem Fall kam es auch zur Bildung einer ektopischen Falte entlang der A/P-Grenze. Es ist bekannt, dass die Reduktion oder der Verlust der posterioren *omb*-Expression zur Ausbildung einer apikalen Falte entlang der A/P-Grenze führt (Shen et al., 2008). Im A-Kompartiment lokalisierte Klone hatten eine Verschiebung oder Ablenkung der D/V-Grenze zur Folge. Bei einem anterior-medial positionierten Klon wurde eine Verschiebung der *ap-lacZ*-Expression und infolgedessen auch eine Ablenkung der *Wg*-D/V-Expression in Richtung des dorsalen Kompartiments festgestellt (Abb. 13 B). Im Fall eines anterior-lateral positionierten Klons kam es hingegen zur Verlagerung der *ap-lacZ*-Expression um wenige

Zellreihen nach ventral, im Vergleich zur Position der D/V-Grenze unmittelbar posterior des Klons (Abb. 13 C). Klone im A-Kompartiment führten zu einer verstärkten *ap-lacZ*-Expression in einem Teil des Klons, nämlich in Zellen, die nahe an der D/V-Grenze lagen (Abb. 13 B, siehe auch Abb. 15 A). Entlang der D/V-Grenze wurde sowohl außerhalb als auch innerhalb der *omb* I-o-f Klone eine Immunfluoreszenz gegen Wg in *ap-lacZ* exprimierenden und in *ap-lacZ* defizienten Zellen detektiert (Abb. 13 A''', B''', C''').

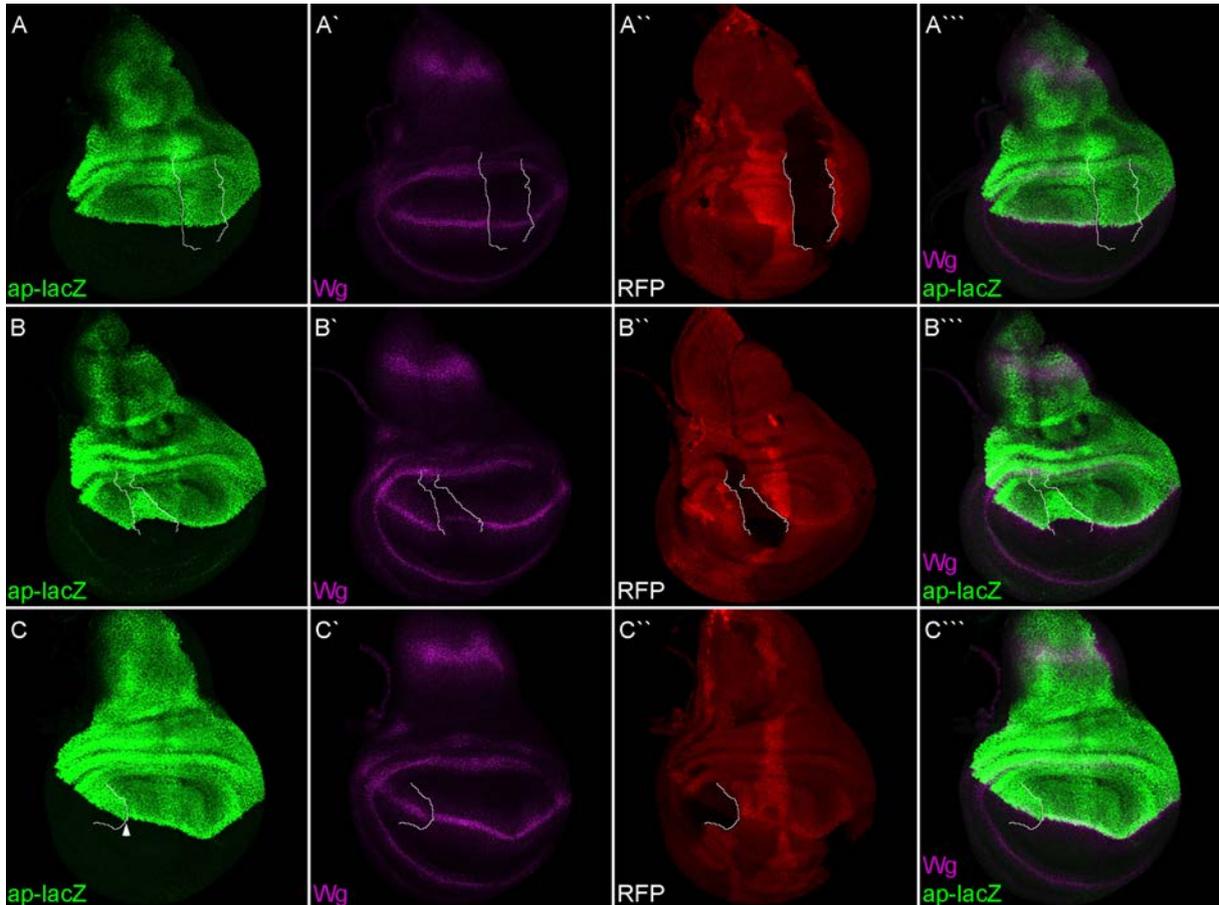


Abbildung 13 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *ap-lacZ*- und Wg-Expression  
Gezeigt sind *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimagnalscheiben. *ap-lacZ* (Grün; A-C), anti-Wg (Magenta; A'-C'), mRFP (Rot; A''-C''), Überlagerung des *ap-lacZ* (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A'''-C'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. (A-C) Dargestellt sind *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone, welche die D/V-Grenze überspannen (A''-C''). Klone (Auswahl) sind durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. (A) Der posterior lokalisierte Klon hat keinen deutlichen Effekt auf die *ap-lacZ*-Expression. (B) Der anterior-medial lokalisierte Klon bewirkt eine Verlagerung der *ap-lacZ*- und Wg-D/V-Expression nach dorsal. (C) Der anterior-lateral lokalisierte Klon zeigt einen geringfügigen Effekt auf die *ap-lacZ*- und Wg-Expression (an dessen distaler Grenze; weiße Pfeilspitze).

In anterior-lateralen *omb* I-o-f Klone wurde innerhalb der Klone häufig eine schleifenförmige Wg-Expression detektiert (Abb. 14). Innerhalb dieser Klone kam es im weiter lateral gelegenen Teil des Klons zu einer Ablenkung der Wg-D/V-Expression – bzw. der D/V-Grenze – in Richtung des ventralen Kompartiments (blaue Pfeilspitze in Abb. 14). Wohingegen im weiter medial gelegenen Teil des Klons der Verlauf der Wg-D/V-Expression – bzw. der D/V-Grenze – weitgehend normal erschien. Bemerkenswert ist, dass diese Klone einerseits (medial) die D/V-Grenze überspannten (weißer Pfeil in

Abb. 14) – wie auch andere Klone die zur Kategorie 2) gezählt wurden – und andererseits (lateral) unmittelbar ventral der D/V-Grenze positioniert waren (weiße Pfeilspitze in Abb. 14) – im Hinblick auf die Wg-DV-Expression (bzw. D/V-Grenze) im anterior-lateral gelegenen Bereich der pouch.

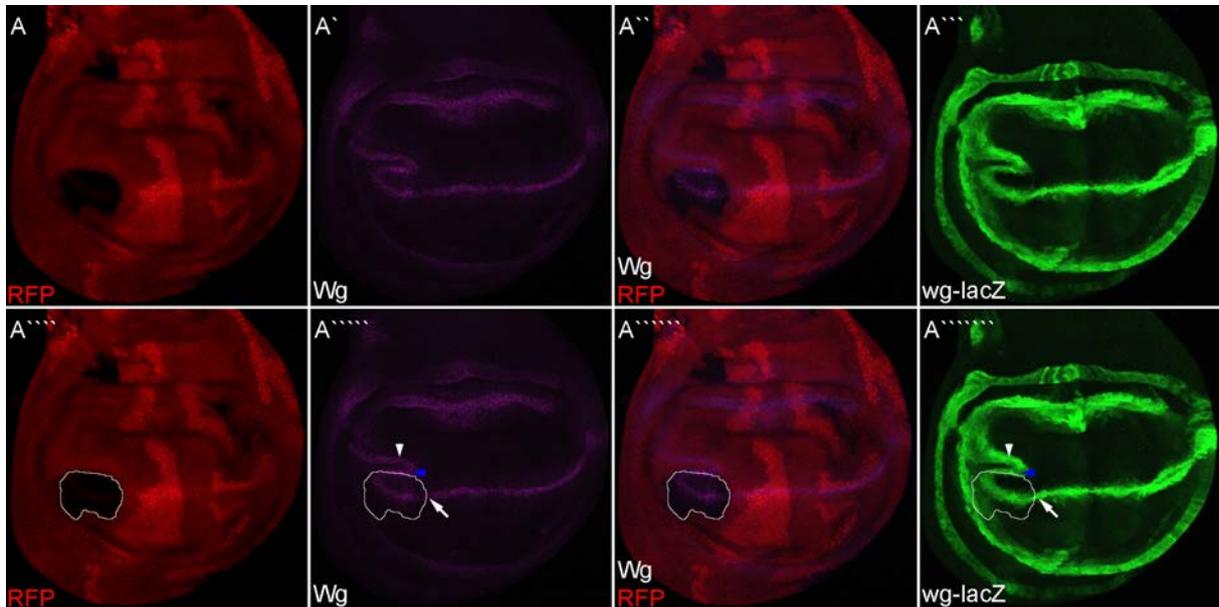


Abbildung 14 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *wg-lacZ*- und Wg-Expression

Gezeigt sind *l(1)omb<sup>A4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben. mRFP (Rot; A), anti-Wg (Magenta; A'), *wg-lacZ* (Grün; A'''), Überlagerung des anti-Wg (Magenta) und mRFP (Rot) Signals (A''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. Klon (Auswahl) ist durch eine weiße Linie gekennzeichnet. Medial überspannt der Klon die Wg- und *wg-lacZ*-Expression an der D/V-Grenze (weißer Pfeil), lateral ist der Klon hingegen ventral der Wg- und *wg-lacZ*-Expression an der D/V-Grenze positioniert (weiße Pfeilspitze). Dorsal des Klons erscheint die Wg- und *wg-lacZ*-Expression an der D/V-Grenze in Richtung des ventralen Kompartiments abgelenkt (blaue Pfeilspitze).

Die meisten Klone der Kategorie 2) zeigten an ihrer medial gelegenen Klongrenze entweder eine Unterbrechung oder eine schmalere und schwächere Wg-D/V-Expression, im Vergleich zur Wg-Expression an der D/V-Grenze außerhalb des Klons.

Zusätzlich – zu den bereits beschriebenen *omb* l-o-f Klonen – wurden auch außergewöhnlich große Klone detektiert, die gleichzeitig die D/V- und A/P-Kompartimentgrenze überspannten (Abb. 15, Abb. 16). In einer mittleren L3 Flügelscheibe zeigte ein solcher Klon einen relativ schwachen Effekt an der D/V-Grenze – auf die *ap-lacZ*- und Wg-Expression – mit einer kleinen Kerbe im *ap-lacZ* Muster auf Höhe der A/P-Grenze (Abb. 15 A). Dieser Effekt wurde auf die ektopische Falte entlang der A/P-Grenze zurückgeführt (Abb. 15 A'''). In einer späten L3 Flügelscheibe zeigte ein ähnlicher Klon im P-Kompartiment eine Ablenkung der Wg-DV-Expression nach ventral (Abb. 15 B). In diesem Fall war die ektopische Falte in der pouch stark ausgeprägt und nicht nur auf die A/P-Grenze beschränkt (Abb. 15 B''').

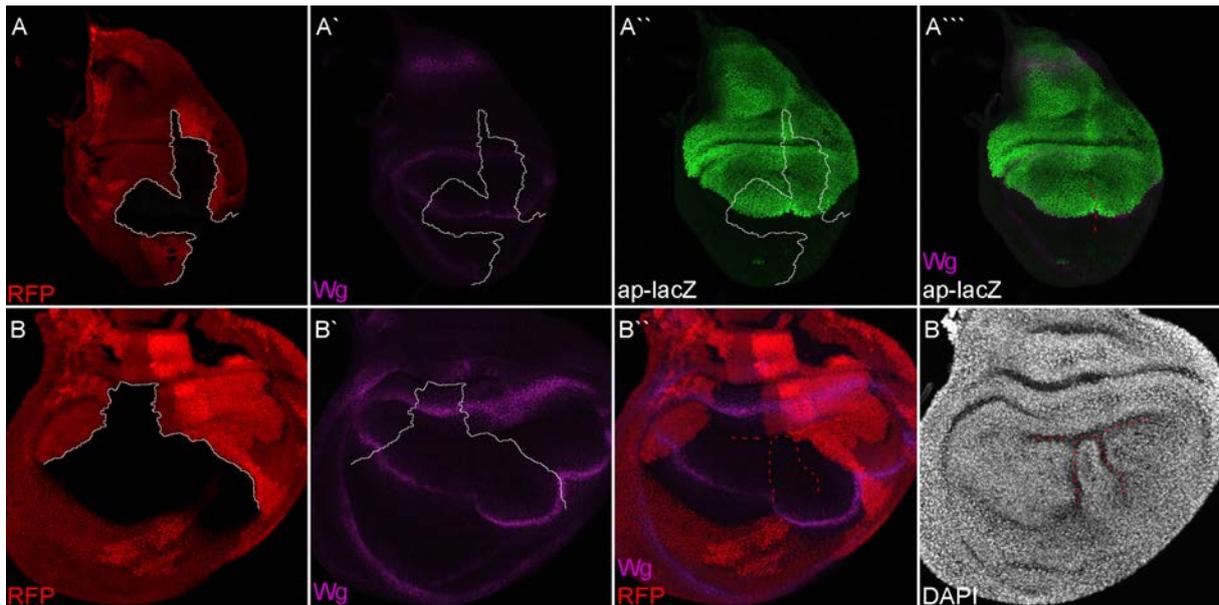


Abbildung 15 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *ap-lacZ*- und *Wg*-Expression.

Gezeigt sind *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in L3 Flüglimaginalscheiben. mRFP (Rot; A-B), anti-*Wg* (Magenta; A'-B'), *ap-lacZ* (Grün; A''), DAPI (B'''), Überlagerung des *ap-lacZ* (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A'''), Überlagerung des anti-*Wg* (Magenta) und mRFP (Rot) Signals (B''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. (A-B) Dargestellt sind *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone, welche die D/V-Grenze überspannen. Klone (Auswahl) sind durch eine weiße Linie gekennzeichnet. Apikale Falten im Zentrum (Auswahl) sind durch eine rote gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Ein außergewöhnlich großer *omb* I-o-f Klon, der fast das gesamte ventrale Kompartiment der späten L3 Flügelscheibe bildete (Abb. 16), zeigte im P-Kompartiment eine schleifenförmige Ablenkung der *Wg*-D/V-Expression (Abb. 16 A'). Dieser Klon erschien zum Zeitpunkt der Analyse, im Hinblick auf die Position der *Wg*-DV-Expression außerhalb des Klons, ventral lokalisiert und damit der Kategorie 3) zugehörig.

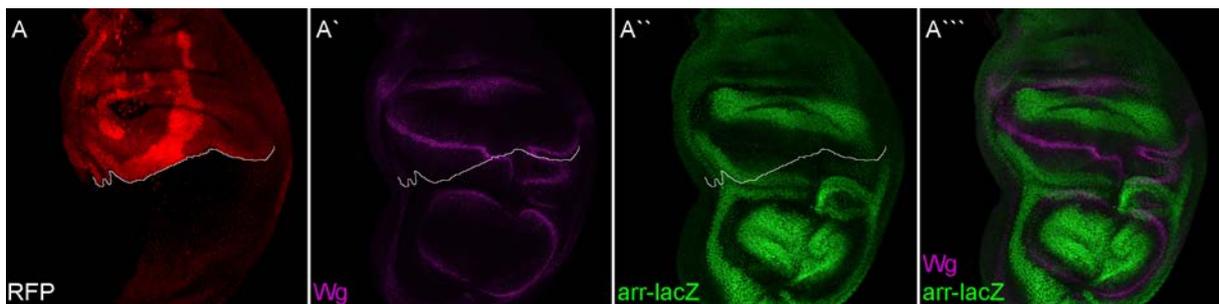


Abbildung 16 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *arr-lacZ*- und *Wg*-Expression

Gezeigt ist ein einzelner *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutanter Klon in einer L3 Flüglimaginalscheibe. mRFP (Rot; A-B), anti-*Wg* (Magenta; A'-B'), *arr-lacZ* (Grün; A''), Überlagerung des *arr-lacZ* (Grün) und anti-*Wg* (Magenta) Signals (A'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. Klon ist durch eine weiße Linie gekennzeichnet.

### *omb* I-o-f Klone der Kategorie 3)

*omb* I-o-f Klone, die vollständig im D- oder V-Kompartiment lokalisiert waren, sind in Abb. 17 bis Abb. 20 sowie im Anhang in Abb. 74 und Abb. 75 gezeigt. Diese Klone wurden zur Kategorie 3) gezählt.

Wie in Abb. 17 gezeigt, wies ein *omb* I-o-f Klon, der vollständig im D-Kompartiment der Flügelscheibe lokalisiert war, keine *ap-lacZ*-Expression im weitesten ventral gelegenen Teil des Klons auf (weißer Pfeil in Abb. 17). Wenn der Klon hingegen vollständig im V-Kompartiment lokalisiert war (Abb. 18), enthielt der Klon *ap-lacZ* exprimierende Zellen im weitesten dorsal gelegenen Teil des Klons (weißer Pfeil in Abb. 18 A, B). In letztgenanntem Fall scheinen die *ap-lacZ* exprimierenden Klonzellen sich in das ventrale Kompartiment bewegt zu haben. Innerhalb des Klons, an der Grenze zwischen *ap-lacZ* exprimierenden (*ap+*) Zellen und *ap-lacZ*-negativen (*ap-*) Zellen, wurde *wg* aktiviert – nachgewiesen mit einer Immunfluoreszenz gegen Wg (Abb. 18). Infolge der Verlagerung der *apterous*-Grenze kam es zu einer schleifenförmigen Verzerrung des normalen Wg Musters. Im Klon folgte die Wg-Expression der *apterous*-Grenze (Abb. 18 A', B').

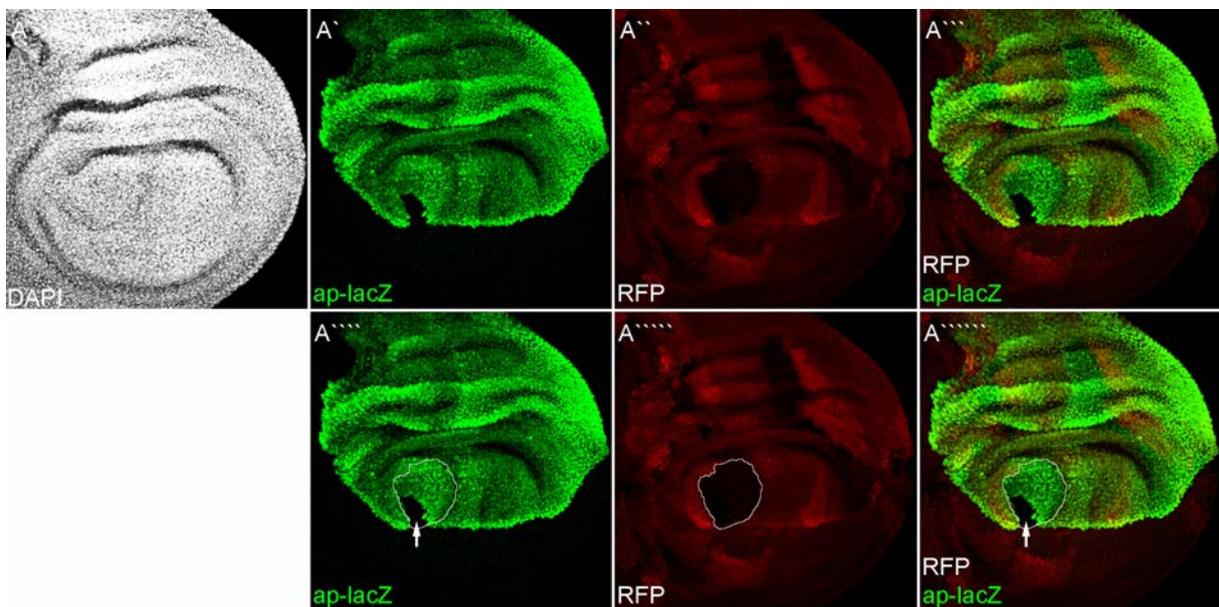


Abbildung 17 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *ap-lacZ*-Expression

Gezeigt sind *I(1)omb<sup>A4</sup>* mutante Klone in L3 Flüglimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A), *ap-lacZ* (Grün; A'), mRFP (Rot; A''), Überlagerung des *ap-lacZ* (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. (A) In dem dorsal lokalisierten *I(1)omb<sup>A4</sup>* mutanten Klon (mit Kontakt zur normalen D/V-Grenze) wurde ein teilweiser Verlust der *ap-lacZ*-Expression festgestellt (weißer Pfeil). Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert. Klon ist durch eine weiße Linie gekennzeichnet.

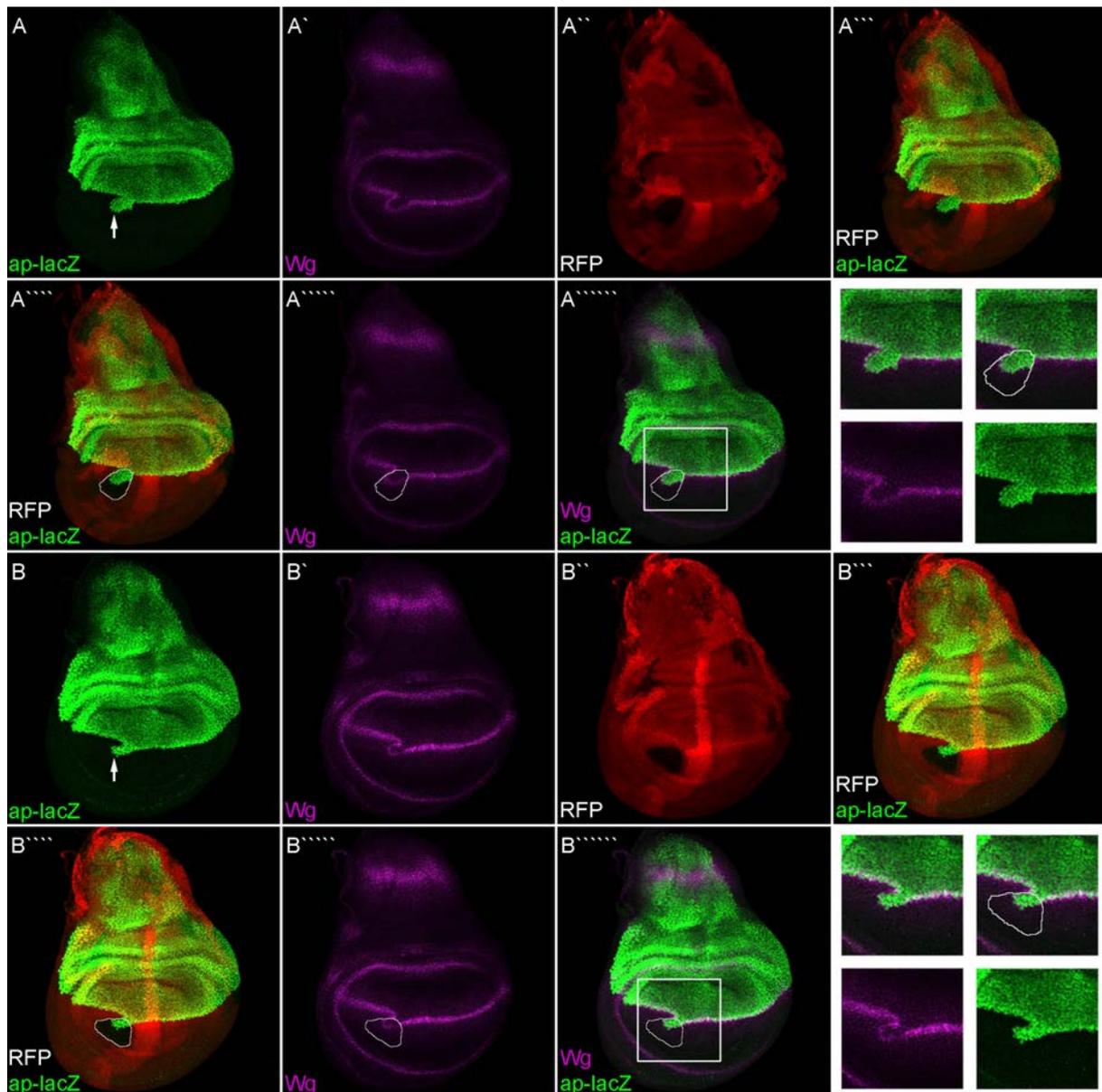


Abbildung 18 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *ap-lacZ*- und Wg-Expression

Gezeigt sind *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelscheiben. *ap-lacZ* (Grün; A-B), anti-Wg (Magenta; A'-B'), mRFP (Rot; A''-B''), Überlagerung des *ap-lacZ* (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A'''-B'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. (A, B) In ventral lokalisierten *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutanten Klonen (mit Kontakt zur normalen D/V-Grenze) wurde eine ektopische *ap-lacZ*-Expression festgestellt (weißer Pfeil). Innerhalb dieser Klone, wie auch in der übrigen pouch, wurde an der Grenze der *ap-lacZ*-Expression Wg exprimiert. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert. Klon ist durch eine weiße Linie gekennzeichnet.

Abbildung 19 zeigt eine späte L3 Flügelscheibe mit Anzeichen einer beginnenden Evagination und mit einem *omb* I-o-f Klon im D-Kompartiment. Aufgrund seiner Position entspricht der Klon der Kategorie 3). Im distalen Teil des Klons bildeten *ap*-Zellen eine runde Zellgruppe (weißer Pfeil in Abb. 19 A'''''), die von *ap+* Zellen – d.h. *ap+* Klonzellen sowie den Klon ventral angrenzende *ap+* Zellen – umschlossen wurde, sodass die *ap*-Zellgruppe separiert im D-Kompartiment vorlag.

Bei der Immunfluoreszenz gegen Wg wurde ein zirkuläres Wg Muster innerhalb des Klons, an der Grenze zwischen *ap+* und *ap*-Zellen, nachgewiesen (weiße Pfeilspitze in Abb. 19 A''''') – was darauf

hinweist, dass an der Grenze zwischen *ap*<sup>+</sup> und *ap*<sup>-</sup> Zellen *wg* exprimiert wurde. Der *omb* Klon war durch mehrere dorsale Zellen (d.h. *ap*<sup>+</sup> Zellen) von der D/V-Grenze getrennt – dies galt auch für den Klonbereich der *ap-lacZ* negativ war. Dennoch war der Klon durch einen Streifen von *Wg*-positiven Zellen mit der *Wg*-D/V-Expression verbunden. Dies legt nahe, dass der Klon an der D/V-Grenze entstanden ist.

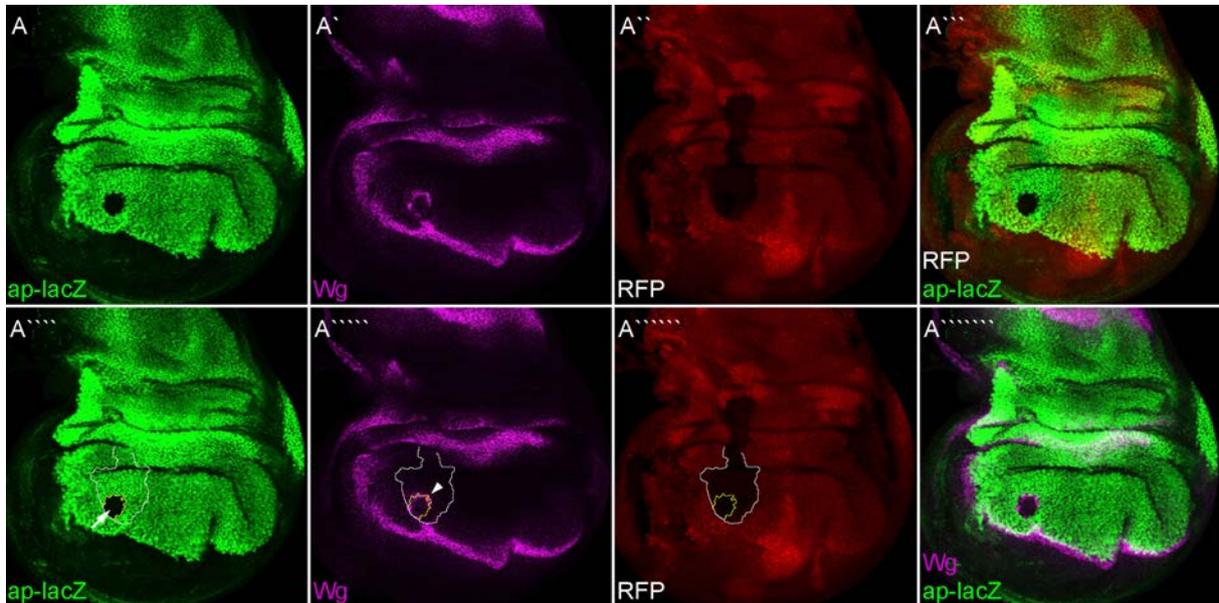


Abbildung 19 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *ap-lacZ*- und *Wg*-Expression

Gezeigt sind *I(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben. *ap-lacZ* (Grün; A,A'''''), anti-*Wg* (Magenta; A',A'''''), mRFP (Rot; A'',A'''''), Überlagerung des *ap-lacZ* (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A'''), Überlagerung des *ap-lacZ* (Grün) und *Wg* (Magenta) Signals (A'''''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale und basale Einzelbilder wurden entfernt. (A) In dem dorsal lokalisierten *I(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutanten Klon wurde ein teilweiser Verlust der *ap-lacZ*-Expression festgestellt (weißer Pfeil). Innerhalb dieses Klons wurde an der Grenze zwischen *ap*<sup>+</sup> und *ap*<sup>-</sup> Zellen *Wg* exprimiert (weiße Pfeilspitze). Der Klon ist durch eine weiße Linie (in der pouch) gekennzeichnet; die *ap-lacZ* negative Zellgruppe, innerhalb des Klons, ist durch eine gelbe Linie markiert. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

Bei der Immunfluoreszenzfärbung gegen *Wg* wurden ähnliche zirkuläre Muster für *Wg* auch in weiteren *omb* I-o-f Klonen und in jedem Quadranten (AD, AV, PD, PV) der pouch nachgewiesen (Abb. 20 A'', B'' und im Anhang in Abb. 74 und Abb. 75). Hierbei wurden *omb* Klone beobachtet, die eine verbindende *Wg*-Expression zwischen dem zirkulären Muster (innerhalb des *omb* Klons) und der *Wg*-D/V-Expression aufwiesen (Abb. 20 A'' und im Anhang in Abb. 74 A und Abb. 75 A, B) aber auch *omb* Klone bei denen dies nicht der Fall war (Abb. 20 B'' und im Anhang in Abb. 74 B). Eine Immundoppelfärbung gegen *Wg* und  $\beta$ -Gal zeigte ein leicht abweichendes Bild, hinsichtlich der Aktivität von *wg-lacZ* (welches  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) als Indikator für *wg* exprimierende Zellen ausprägt) und der Immunfluoreszenzfärbung gegen *Wg*. Im Vergleich zum zirkulären *Wg* Muster (anti-*Wg* Immunfärbung, Abb. 20 B'') zeigte die Immunfärbung gegen  $\beta$ -Gal (Abb. 20 B') zusätzlich eine verbindende *wg-lacZ*-Expression von der D/V-Grenze in den Klon hinein. Das *wg-lacZ* Transgen zeigte hierbei eine höhere Sensitivität als die Immunfluoreszenz gegen *Wg*.

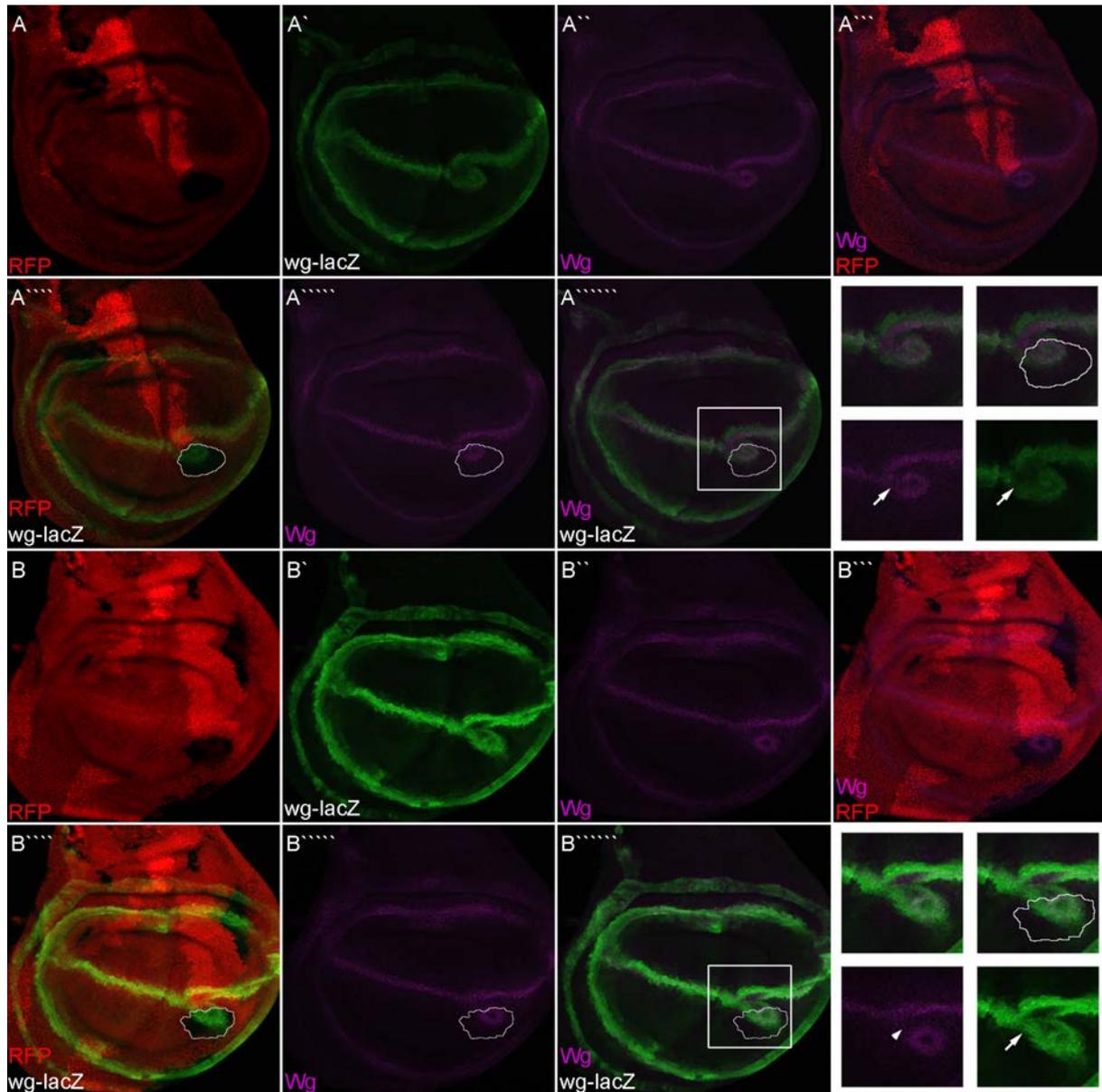


Abbildung 20 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *wg-lacZ*- und *Wg*-Expression

Gezeigt sind *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben. mRFP (Rot; A, B), *wg-lacZ* (Grün; A', B'), anti-*Wg* (Magenta; A'', B''), Überlagerung des anti-*Wg* (Magenta) und mRFP (Rot) Signals (A''', B'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. (A, B) Zwischen der *wg-lacZ*-Expression an der D/V-Grenze und der zirkulären *wg-lacZ*-Expression innerhalb des Klons wurde eine verbindende Expression festgestellt (weißer Pfeil). Dies galt auch für die Immunfluoreszenzfärbung gegen *Wg* in (A). Hingegen wurde bei der Immunfluoreszenz gegen *Wg* in (B) keine verbindende Expression detektiert (weiße Pfeilspitze). Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 2.1.4 Klonale *omb*-Überexpression und *ap-lacZ*-Expression

Zur weiteren Analyse wurde mit Hilfe der Gal4 flip-out Technik zufällig positionierte Überexpressionsklone von *omb* (*omb g-o-f* Klone) erzeugt (Abb. 21; Anhang Abb. 77). Die Klone wurden im ersten Larvenstadium induziert und in L3 Flügelimaginalscheiben analysiert. Zur Markierung der Klone wurde ein UAS-RFP Transgen verwendet. Bei den Flügelscheiben in Anhang Abb. 77 wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenzfärbung gegen *Omb* durchgeführt, um das endogene Expressionsmuster von *omb* zu visualisieren.

In einigen *omb* g-o-f Klonen wurde eine Reduktion oder ein Verlust der *ap-lacZ* Aktivität, innerhalb des dorsalen Kompartiments, festgestellt (weiße Pfeilspitzen in Abb. 21 A, B; Anhang Abb. 77). Der Verlust der Ap-Aktivität führte häufig zur Fehlexpression von *wg*. Ein entsprechender Phänotyp konnte in allen Regionen des dorsalen Kompartiments beobachtet werden.

In der dorsalen *Wg*-IR-Domäne zeigten Klone mit einer deutlich reduzierten *ap-lacZ* Aktivität ebenfalls eine verminderte Immunfluoreszenz gegen *Wg* (weiße Pfeilspitzen in Abb. 21 A, B). Innerhalb der proximalen hinge und im Notum-Bereich resultierte die Überexpression von *Omb* in eine Reduktion oder einen Verlust der *ap-lacZ*-Expression sowie in eine verstärkte Expression von *Wg* (Abb. 21). Wie auch in Abb. 21 (A) gezeigt, führte ein *omb* Überexpressionsklon zum teilweisen Verlust der *ap-lacZ*-Expression innerhalb der dorsalen pouch. Innerhalb des Klons – an der Grenze zwischen *ap+* und *ap-* Zellen – wurde eine ektopische streifenartige *Wg*-Expression detektiert (gelbe Pfeilspitze in Abb. 21 A<sup>''</sup>). Aufgrund des teilweisen Verlustes der *ap-lacZ*-Expression und der unregelmäßig verlaufenden Grenze zwischen *ap+* und *ap-* Zellen, sowohl innerhalb als auch lateral des *omb* g-o-f Klons, war die genaue Position des Klons, hinsichtlich der normalen D/V-Grenze, nicht exakt zu bestimmen (Abb. 21 A). Interessanterweise, weist dieser *omb* g-o-f Klon (Abb. 21 A) eine gewisse Ähnlichkeit mit einem *omb* l-o-f Klon (Abb. 19) auf. Hierbei beziehen sich die Gemeinsamkeiten hauptsächlich auf den Effekt des Klons auf die *ap-lacZ*-Expression. Wie auch der *omb* l-o-f Klon (Abb. 19) zeigte der *omb* g-o-f Klon (Abb. 21 A) nur einen teilweisen Verlust der *ap-lacZ*-Expression. Die *ap+* Zellen unmittelbar ventral der *ap-* Zellgruppe (innerhalb des Klons) lassen – in beiden Fällen, im D-Kompartiment – Zellbewegungen von lateral nach medial erahnen.

*Omb* g-o-f Klone, die außerhalb des Bereichs starker endogener *omb*-Expression lagen, zeigten eine *ap-lacZ* Repression, konnten aber eine erhöhte *ap-lacZ*-Expression am Rande des Klons aufweisen (z.B. im Notum-Bereich, Abb. 21 A).

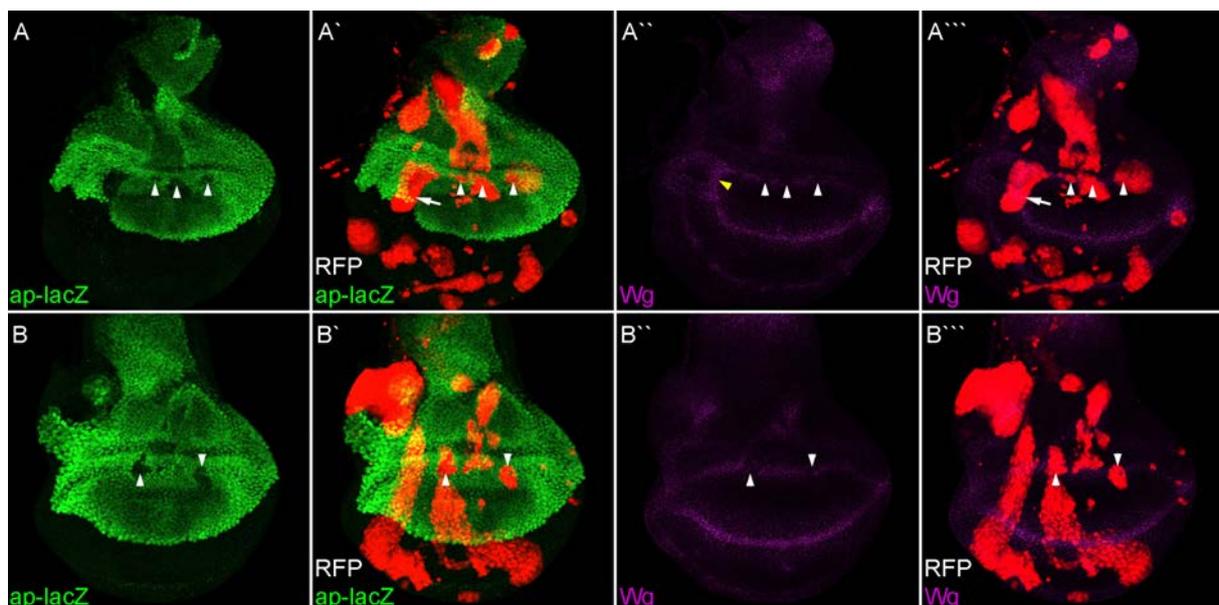


Abbildung 21 Effekte der klonalen *omb* Überexpression auf die *ap-lacZ*- und *Wg*-Expression  
*ap-lacZ* (Grün; A-B), anti-*Wg* (Magenta; A<sup>''</sup>-C<sup>''</sup>), Überlagerung des *ap-lacZ* (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A<sup>''</sup>-C<sup>''</sup>), Überlagerung des anti-*Wg* (Magenta) und mRFP (Rot) Signals (A<sup>'''</sup>-C<sup>'''</sup>). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Dargestellt sind L3 Flügelimagnalscheiben, in denen UAS-*omb* überexprimierende Klone im ersten Larvenstadium

induziert wurden. Der Nachweis der Expression von UAS-omb in Zellklonen erfolgte durch Coexpression von UAS-mRFP. (A) Klone in der Wg-IR-Domäne zeigen eine (teilweise oder vollständige) Reduktion der *ap-lacZ*- und Wg-Expression (weiße Pfeilspitzen). Ein Klon (weißer Pfeil) erstreckt sich von der D/V-Grenze bis in die dorsale hinge (anterior) und verursacht einen teilweisen Verlust der *ap-lacZ*-Expression und eine Umlenkung der Wg-Expression (gelbe Pfeilspitze). (B) Zwei in der Wg-IR-Domäne lokalisierte Klone weisen eine Reduktion der *ap-lacZ*- und Wg-Expression auf (weiße Pfeilspitzen). (A, B) Im Notum lokalisierte Klone zeigen einen teilweisen oder vollständigen Verlust der *ap-lacZ*-Expression. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die klonale Überexpression von Omb zu einer reduzierten Aktivität von *ap* (*ap-lacZ*) und zu einer Fehlexpression von Wg führt. In der dorsalen hinge zeigte sich dies durch eine gleichzeitige Reduktion von *ap-lacZ* und Wg (Wg-IR) in *omb* g-o-f Klonen.

## 2.2 NRE-GFP Reporter

Der Notch-Signalweg kontrolliert während der Flügelentwicklung die Induktion der distalen Gelenkregion, der Flügelfläche und des Flügelrandes sowie die Musterbildung und das Wachstum der Flügelimaginalscheibe. Während der Pupalentwicklung ist N notwendig, um die Breite der Flügelvenen festzulegen (Sturtevant und Bier, 1995; de Celis et al., 1997; Huppert et al., 1997). Die Notch-Aktivität an der D/V-Kompartimentsgrenze der Flügelscheibe, die sich auf einen schmalen Zellstreifen beschränkt, reguliert sowohl direkt als auch indirekt die Transkription verschiedener Gene, die für die Etablierung und Aufrechterhaltung der distalen Gelenk- und Flügelstrukturen notwendig sind (Klein und Arias, 1998b).

Im kanonischen Notch-Signalweg wird der Rezeptor nach Bindung des Liganden gespalten und die intrazelluläre Domäne von Notch (Nicd) in den Nukleus transloziert, wo es mit dem TF Suppressor of Hairless (Su(H)) assoziiert, um die Expression von Zielgenen zu aktivieren – z.B. Gene *des Enhancer of Split* (*E(spl)*)-Komplexes. Die Aktivierung des Notch-Signalwegs kann unter Verwendung eines NRE-GFP Reporter visualisiert werden. In der Flügelscheibe ist *wingless*, an der D/V-Grenze, ein Zielgen von Notch und dient gleichfalls als Marker für die Aktivität des Notch-Signalwegs. Um die Effekte von *omb* l-o-f Klone auf die Wg-D/V-Expression zu bestätigen, wurde ein NRE-GFP-Reporter-Transgen (Notch-Response-Element-GFP Reporter; Saj et al.; 2010) verwendet. Der N Reporter NRE-GFP enthält Bindungsstellen für Su(H) aus dem Notch Response Element von *E(spl)* kombiniert mit einem Promotor und der kodierenden Sequenz von GFP.

### 2.2.1 Klonaler *omb*-Verlust und NRE-GFP-Expression

*omb* l-o-f Klone, die vollständig im D- oder V- Kompartiment lokalisiert waren, hatten auf den N Reporter NRE-GFP einen ähnlichen Effekt wie auf die Wg-Expression (siehe 2.1.3), an der D/V-Grenze. In der dorsalen pouch lokalisierte *omb* l-o-f Klone bewirkten eine Ablenkung der NRE-GFP Reporterexpression nach dorsal (weiße Pfeile in Abb. 22 D, E) während ventrale Klone eine Ablenkung der Expression nach ventral verursachten (weißer Pfeil in Anhang Abb. 78). *omb* l-o-f Klone welche die D/V-Grenze überspannten, wiesen an der Klonegrenze (innerhalb des Klons) eine schmalere NRE-GFP Reporterexpression auf (gelbe Pfeilspitzen in Abb. 22). In einigen Fällen wurde auch eine Ausbreitung der NRE-GFP Reporteraktivität im Zentrum des Klons, auf Höhe der D/V-

Grenze, beobachtet (weiße Pfeilspitzen in Abb. 22 C; Anhang Abb. 78 C).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immer wieder abgerundete *omb* l-o-f-Klone identifiziert die mittig auf der D/V-Grenze positioniert waren. In Abb. 22 (C) und in Anhang Abb. 78 (A) sind zwei dieser Klone dargestellt. Diese Klone zeigten eine ektopische Aktivierung des NRE-GFP Reporters in den angrenzenden wildtypischen Zellen – an der proximalen Seite des Klons (blaue Pfeilspitze in Abb. 22 C). Gleichartige Klone hatten einen ähnlichen Effekt auf die *wg-lacZ* Aktivität. Allerdings wurde bei kleineren Klonen, eine den Klon teilweise oder vollständig umspannende *wg-lacZ*-Expression festgestellt (Abb. 12). Dies deutet daraufhin, dass die einseitige Notch-Aktivität (NRE-GFP), wie sie an der proximalen Seite der Klone in Abb. 22 (C) und in Anhang Abb. 78 (A) beobachtet wurde, vermutlich der Größe der Klone geschuldet war und nicht deren lateralen Position.

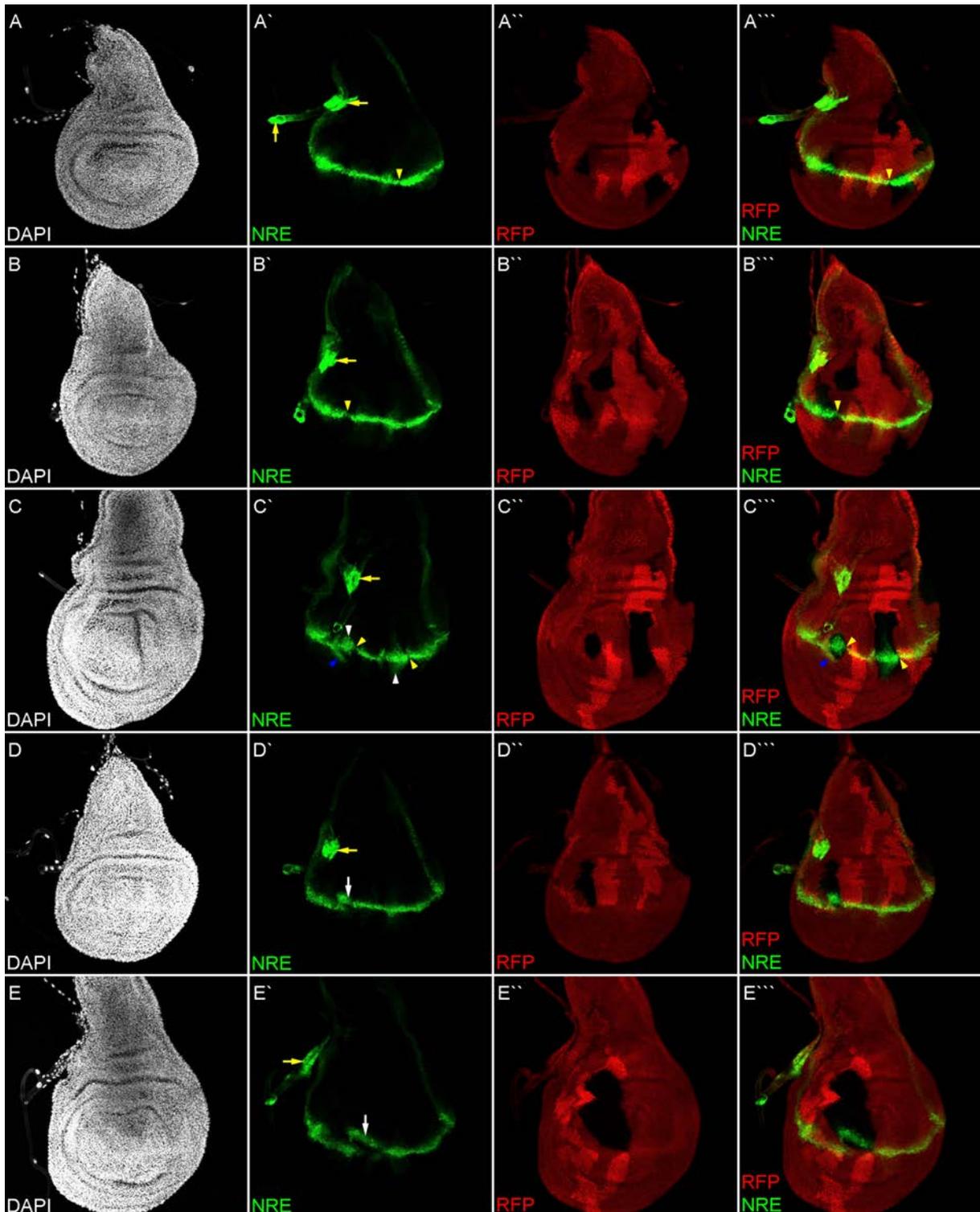


Abbildung 22 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die Notch-Aktivität

Gezeigt sind *I(1)omb<sup>A4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß, A-E), NRE-GFP (Grün; A'-E'), mRFP (Rot; A''-E''), Überlagerung des NRE-GFP (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A'''-E'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. In der Trachee wurde eine starke NRE-GFP Reporteraktivität detektiert (gelbe Pfeile). Der weiße Pfeil markiert die Verlagerung der NRE-GFP-Expression, in den dorsalen Klon (D, E); weiße Pfeilspitzen markieren die Ausbreitung der NRE-GFP-Expression; gelbe Pfeilspitzen markieren die reduzierte NRE-GFP-Expression an der Klongrenze; blaue Pfeilspitzen markieren die ektopische NRE-GFP-Expression am Rand des Klons. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Erwartung entsprechend *omb* I-o-f Klone einen sehr ähnlichen Effekt auf die NRE-GFP Reporterexpression hatten wie auch auf die Expression von *wg*, an der D/V-Grenze der Flügelimaginalscheibe. Beispielsweise zeigten mittelgroße *omb* I-o-f Klone, die mittig auf der D/V-Grenze positioniert waren, eine der *wg-lacZ* Aktivität (bzw. anti-Wg Immunfärbung) (Abb. 12) ähnliche Aktivität des NRE-GFP Reporters (Abb. 22 C; Anhang Abb. 78 A).

### 2.3 Diskussion: *apterous* und Notch

In *omb* mutanten (*bi*, *bi/omb*<sup>3198</sup>, *I(1)omb*<sup>3198</sup>) L3 Flügelimaginalscheiben als auch in *omb* I-o-f Klonen wurde an der Grenze zwischen ap-positiven (ap+) und ap-negativen (ap-) Zellen in der pouch eine Wg-Expression in Zellen beiderseits der Grenze festgestellt. Dies ähnelt der Situation an der Wildtyp-D/V-Grenze, insofern als auf beiden Seiten der Grenze eine Aktivierung des Notch-Signalweges stattfindet (de Celis und Bray, 1997; Micchelli et al., 1997). Dies weist darauf hin, dass auch im *omb* mutanten Hintergrund die komplexen Regulationsmechanismen ablaufen, die für eine Notch-Aktivierung an der normalen D/V-Grenze erforderlich sind – gezeigt Anhand der Notch abhängigen Genexpression von Wg.

#### Auswirkungen *omb* I-o-f Klone auf die D/V-Grenze

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von *omb* I-o-f Klone auf die *ap-lacZ*- und Wg-Expression an der D/V-Grenze von L3 Flügelimaginalscheiben untersucht (siehe 2.1.3). Hierbei wurden Klone beobachtet, die vollständig im D- oder V-Kompartiment lokalisiert waren und im distalen Teil des Klons ap-negative Zellen bzw. ap-positive Zellen enthielten. Einige dieser Klone – die in 2.1.3 als Klone der Kategorie 3) beschrieben werden – zeigten entweder eine schleifenförmige oder eine zirkuläre Wg-Expression im distalen Teil des Klons. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die zirkuläre Wg-Expression durch eine runde Zellgruppe aus ap- Zellen im D-Kompartiment verursacht wird und umgekehrt im V-Kompartiment durch eine abgerundete ap+ Zellgruppe. Ein schleifenförmiges Wg Expressionsmuster fand sich in *omb* I-o-f Klonen, die Kontakt zur normalen D/V-Grenze hatten, wobei die Wg-Expression im Klon mit der Wg-D/V-Expression in Verbindung stand (siehe beispielsweise Abb. 17). Das zirkuläre Wg Muster – ohne Verbindung zur Wg-D/V-Expression – wurde hingegen auch in Klonen festgestellt, die in keinem direkten Kontakt zur normalen D/V-Grenze standen – d.h. in Klonen die nicht in unmittelbarer Nähe zur D/V-Grenze positioniert waren (siehe beispielsweise Abb. 20 B oder Anhang Abb. 74 B). Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp ist, dass *omb* I-o-f Klone die zunächst in Kontakt zur normalen D/V-Grenze standen sich von der D/V-Grenze wegbewegten. Infolge der Migration eines *omb* I-o-f Klons von der D/V-Grenze in das dorsale (bzw. ventrale) Kompartiment, würde die ap- Zellgruppe (oder ap+ Zellgruppe) im distalen Teil des Klons von den ap-Zellen des ventralen Kompartiments (bzw. ap+ Zellen des dorsalen Kompartiments) getrennt. Dieser Hypothese entsprechend, wurde das schleifenförmige wie auch das zirkuläre Expressionsmuster von Wg stets im weitesten distal gelegenen Teil des Klons detektiert.

Aufgrund der Ergebnisse wird folgendes Model vorgeschlagen: *omb* I-o-f Klone, die zunächst die normale D/V-Grenze überspannen, bewegen sich in Folge eines Migrationsereignisses in das dorsale oder ventrale Kompartiment. Klone, welche die D/V-Grenze überspannen, exprimieren nur im

dorsalen Teil des Klons *ap* und an der Grenze zwischen *ap*<sup>+</sup> und *ap*<sup>-</sup> Zellen *Wg* (Abb. 23 A, D). Bei einer Migration des Klons in das ventrale Kompartiment trennt sich die *ap*<sup>+</sup> Zellgruppe – welche im weitesten dorsal gelegenen Teil des Klons positioniert ist – von den *ap*<sup>+</sup> Zellen (*wg* Zellen) des dorsalen Kompartiments um schließlich eine isolierte *ap*<sup>+</sup> Zellgruppe innerhalb des ventralen Klons zu bilden (Abb. 23 D, E, F). Bei einer Migration des Klons in das dorsale Kompartiment, kommt es zur Trennung der *ap*<sup>-</sup> Zellgruppe, die im weitesten ventral gelegenen Teil des Klons positioniert ist, von den gleichfalls *ap*<sup>-</sup> Zellen (*wg* Zellen) des ventralen Kompartiments, um eine isolierte *ap*<sup>-</sup> Zellgruppe innerhalb des letztendlich dorsal lokalisierten Klons zu bilden (Abb. 23 A, B, C).

Formal ist auch der umgekehrte Vorgang denkbar: Klone entstehen im Innern eines Kompartiments. Bei Kontakt mit der D/V-Kompartimentgrenze fusionieren Zellen gleicher Affinität (d.h. *Ap*<sup>+</sup> Zellen mit dem dorsalen Kompartiment und *Ap*<sup>-</sup> Zellen mit dem ventralen). Klone, die über der Kompartimentgrenze liegen wären auch dort entstanden. Gegen diese Hypothese spricht, dass dorsale *omb* Klone nicht zum Verlust der *ap*-Expression führen und ventrale *omb* Klone keine ektopische *ap*-Expression bewirken. Für die klonale Analyse wurden *omb* l-o-f Klone im ersten Larvenstadium generiert und in L3 Flügelscheiben analysiert. Damit erfolgte die Klonerzeugung vor Bildung der D/V-Kompartimentgrenze, die im zweiten Larvenstadium durch die Expression von *ap* im D-Kompartiment der Flügelscheibe etabliert wird. *ap* wird ab dem frühen zweiten Larvenstadium in der Flügelscheibe exprimiert und ist notwendig um eine dorsale Zellidentität zu vermitteln und aufrechtzuerhalten (Cohen et al., 1992; Diaz-Benjumea und Cohen, 1993; Williams et al., 1993; Blair et al., 1994).

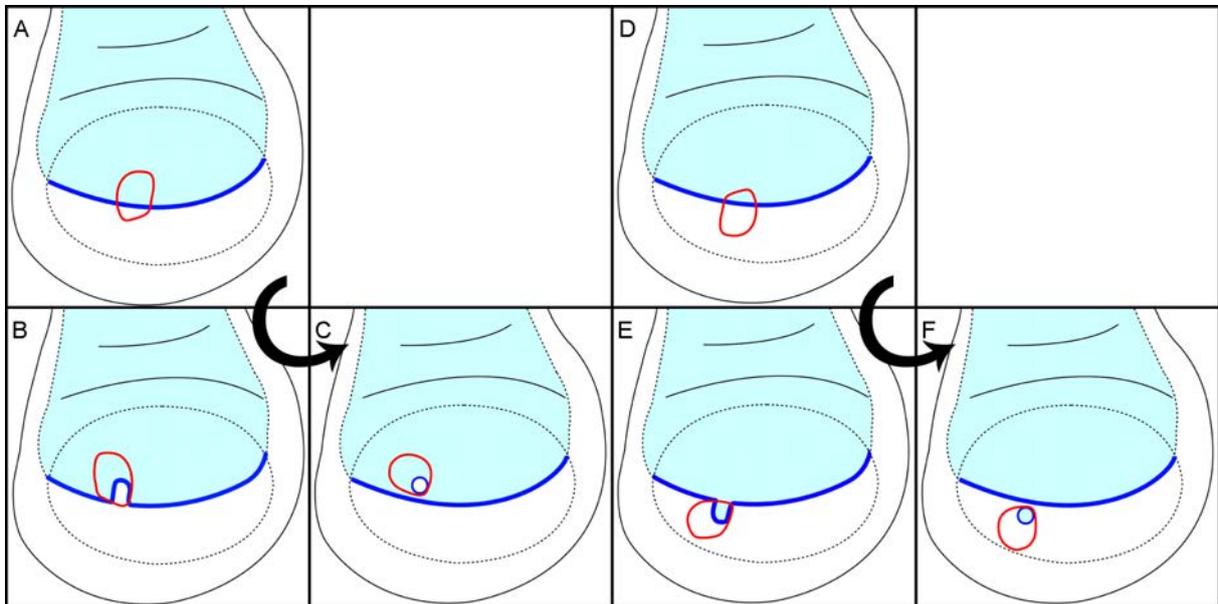


Abbildung 23 Model zum Migrationsverhalten *omb* l-o-f Klone an der D/V-Grenze

In (A, D) schematische Darstellung eines Klons der Kategorie 2), der die D/V-Grenze überlappt. In (B, C, E, F) schematische Darstellung von Klone der Kategorie 3). Dargestellt sind Klone im dorsalen (B, C) und im V-Kompartiment (E, F) der pouch. Der Klon ist mit einer roten Linie gekennzeichnet. Die *wg*-Expression, an der D/V-Grenze sowie innerhalb des Klons, ist mit einer blauen Linie markiert. Die *ap*-Expression ist in türkis dargestellt. (A, D) Der Klon überlappt die D/V-Grenze und zeigt noch keine Änderung der *ap*- und *wg*-Expression. (B) Der dorsale Klon (mit Kontakt zur D/V-Grenze) verursacht eine Verzerrung der *ap*- und *wg*-Expression nach dorsal. (C) Der dorsale Klon (ohne Kontakt zur D/V-Grenze) enthält eine *ap*-negative Zellgruppe im weitesten ventral gelegene Teil des Klons. (E) Der

ventrale Klon (mit Kontakt zur D/V-Grenze) verursacht eine Verzerrung der *ap*- und *wg*-Expression nach ventral. (F) Der ventrale Klon (ohne Kontakt zur D/V-Grenze) enthält eine *ap*-positive Zellgruppe im weitesten dorsal gelegene Teil des Klons. Nach dem vorgeschlagenen Model migriert der in (A und B) gezeigte Klon in das dorsale Kompartiment und bildet den in (C) gezeigten Klon. Entsprechend bewegt sich der in (D und E) gezeigte Klon in das ventrale Kompartiment und bildet den in (F) gezeigten Klon. Die schwarzen Pfeile geben den Migrationsverlauf an.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *omb* I-o-f Klone häufig die D/V-Grenze überspannen und dass an der D/V-Grenze positionierte Klone eine Verzerrung der D/V-Grenze, sowohl nach dorsal als auch nach ventral, bewirken können. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *omb* Klone generell keine Präferenz für das dorsale oder ventrale Kompartiment zeigen. Damit ist es unwahrscheinlich, dass der klonale *omb* Verlust die dorsale Zellaffinität in eine ventrale transformiert oder umgekehrt. Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse wird vorgeschlagen, dass *omb* Klone die D/V-Kompartimentsgrenze in beide Richtungen, sowohl in dorsale als auch in ventrale Richtung, überqueren können. Damit hätte Omb an der D/V-Grenze eine ähnlich stabilisierende Rolle, wie sie bereits an der A/P-Grenze nachgewiesen wurde (Shen und Dahmann, 2005).

Apterous fördert die dorsale Zellaffinität durch Kontrolle der Expression von *caps* und *trn*, deren Expression im zweiten Larvenstadium auf das dorsale Kompartiment der Flügelscheibe begrenzt ist (Milán et al., 2001). Die Auswirkungen von *omb* auf die Expression von *caps-lacZ* und *trn-lacZ* werden in 2.6 behandelt.

#### Fehlexpression von *ap* in *omb* I-o-f Klone

Das Verhalten der Ap fehlexprimierenden Zellen innerhalb der *omb* Klone weicht von dem Verhalten reiner Ap Fehlexpressionsklone, wie sie von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden, ab. Es ist mehrfach gezeigt, dass die überwiegende Mehrheit der Klone, die hinsichtlich der Ap-Aktivität fehlspezifiziert sind, in das entsprechende Kompartiment migrieren in dem die Zellen die passende Ap-Aktivität aufweisen – wenn diese Klone ursprünglich in Kontakt zur normalen D/V-Grenze standen. Dementsprechend migrieren Ap exprimierende Klone, welche im V-Kompartiment generiert wurden, in das D-Kompartiment und umgekehrt Klone dorsalen Ursprungs, denen die Ap-Aktivität fehlt (z.B. aufgrund der Expression von dLMO) migrieren in das V-Kompartiment (Milán und Cohen, 2003). Ein gegensätzliches Verhalten zeigen *omb* mutante Zellen, welche die *ap-lacZ* positive Zellgruppe in ventralen *omb* I-o-f Klone bilden (Abb. 23 E, F) wie auch die *ap-lacZ* negative Zellgruppe in dorsalen *omb* I-o-f Klone (Abb. 23 B,C) – nach dem vorgeschlagenen Model. Es scheint, als werde Omb gebraucht, um die Ap-abhängige Zellaffinität zu etablieren. Dabei könnte Omb die Expression von Kofaktoren wie Chip oder dLMO kontrollieren, oder könnte wie Osa die transkriptionelle Aktivität von Ap modulieren (Milán et al., 2004).

Basierend auf den Literaturergebnissen, sollten *ap*<sup>+</sup> Klonzellen in ventralen *omb* Klonen mit *ap*<sup>+</sup> Zellen des dorsalen Kompartiments fusionieren. Ferner sollten dorsale *omb* Klone aufgrund von *ap*-Klonzellen keine Verzerrung der D/V-Grenze bewirken. *omb* Klone unterscheiden sich damit von *omb* mutanten Imaginalscheiben, in denen die gesamte Entwicklung ohne Omb Funktion erfolgt. Der Unterschied zwischen spätem klonalen *omb* Verlust und vollständiger Abwesenheit der *omb* Funktion legt nahe, dass Omb nicht direkt reprimierend auf *ap* wirkt, sondern eher an der Aufrechterhaltung

eines epigenetisch reprimierten Zustandes beteiligt ist. Die Relevanz epigenetischer Regulation wurde bereits gezeigt (Oktaba et al., 2008; Bieli et al., 2015).

Im vorgestellten Model (Abb. 23) wird davon ausgegangen, dass eine Notch-Aktivierung am Rand einer ap- bzw. ap+ Zellgruppe – in *omb* I-o-f Klone – ein rundes Expressionsmuster von Wg induziert, wie es in einer Reihe von *omb* I-o-f Klone nachgewiesen wurde. Im Folgenden werden unter anderem Hinweise für diese Annahme diskutiert.

Generell gilt, dass Klone ohne Kontakt zur D/V-Grenze im jeweiligen Kompartiment verbleiben. Es konnte gezeigt werden, dass Ap exprimierende Klone, die im V-Kompartiment lokalisiert sind, wie auch dorsale Klone, denen die Ap-Aktivität aufgrund der Expression des Inhibitors dLMO fehlt, eine runde Gestalt besitzen und glatte Ränder aufweisen (Milán et al., 1998; Milán und Cohen, 2003). Klone die für das Gen *apterous* mutant sind zeigen ein ähnliches Verhalten im D-Kompartiment (Blair et al., 1994). Ein Abrunden der Klone dient allgemein der Minimierung der Kontaktfläche mit umgebenden Zellen. In *omb* I-o-f Klonen, die komplett im D- oder V-Kompartiment lokalisiert waren, zeigte die ap- bzw. ap+ Zellgruppe im distalen Teil des Klons einen ähnlichen Phänotyp, d.h. eine runde Form. *omb* I-o-f Klone runden sich gleichfalls ab, jedoch erscheint ihre runde Form weniger stark ausgeprägt als bei der ap- bzw. ap+ Zellgruppe innerhalb des Klons. Dies deutet darauf hin, dass der Affinitätsunterschied zwischen Ap+ und Ap- Zellen auch innerhalb von *omb* Klonen existiert.

Eine bemerkenswerte Beobachtung von Milán und Cohen ist, dass Klone, die Hinsichtlich ihrer Ap-Aktivität fehlspezifiziert sind, eine runde Gestalt annehmen, wenn in angrenzenden Zellen – d.h. außerhalb des Klons – Notch aktiviert wird, jedoch nicht, wenn die Aktivierung von Notch an den Klonrändern unterdrückt wird (Milán und Cohen, 2003). Die Autoren konnten also zeigen, dass die Form von dorsalen Klonen die Ap fehlexprimieren von der Notch-Aktivität (in den Klon umgebenden *wt* Zellen) abhängig ist. Dementsprechend induzieren dorsale dLMO exprimierende Klone am Rand des Klons, in Klonzellen wie auch in benachbarten *wt* Zellen, Notch Zielgene (gezeigt an Wg und Cut) und besitzen eine runde Form (Milán und Cohen, 2003). Wird Necd – eine dominant-negative Form des Notch-Rezeptors, der die Notch-Aktivierung in einer zellautonomen Weise blockiert (Micchelli und Blair, 1999) – in dorsalen Klonen mit dLMO coexprimiert, kommt es zu keiner Expression von Notch Zielgenen (Wg und Cut) in den Klonzellen (Milán und Cohen, 2003). Außerhalb der Klone wurden bezüglich der Notch-Aktivierung zwei unterschiedliche Resultate beobachtet. Wird Notch in den benachbarten *wt* Zellen ebenfalls nicht aktiviert – Wg und Cut werden nicht induziert – weisen die dorsalen Klone eine unregelmäßige Form auf. Wird Notch hingegen in benachbarten *wt* Zellen aktiviert haben die Klone eine runde Form. Einen unregelmäßigen Klon-Phänotyp zeigen auch dorsale Klone die dLMO und Fng coexprimieren (Milán und Cohen, 2003). Damit kann auch die zirkuläre Wg-Expression in *omb* I-o-f Klonen, welche auf eine ap- bzw. ap+ Zellgruppe zurückgeführt wird, als Hinweis für eine unveränderte Expression und Aktivität von Fng in diesen Klonen gewertet werden. Milán und Cohen (Milán und Cohen, 2003) zeigten außerdem, dass die klonale Expression einer konstitutiv aktiven Form des Notch-Rezeptors (Notch<sup>intra</sup>) nicht ausreichend ist, um einen Affinitätsunterschied in der pouch zu induzieren, folglich diese Klone keine runde Gestalt aufweisen.

Dies spricht wiederum für eine abgerundete *ap-* bzw. *ap+* Zellgruppe, als Ursache für die runde *Wg*-Expression – also Notch-Aktivierung – im distalen Teil entsprechender *omb* I-o-f Klone (siehe Abb. 23).

#### *omb* I-o-f Klone an der D/V-Grenze

Die Ergebnisse zeigen, dass *omb* I-o-f Klone in allen vier Quadranten der pouch ähnliche Effekte auf die *ap-lacZ*- und *Wg*-Expression haben. Auch weisen die Ergebnisse darauf hin, dass *omb* I-o-f Klone sowohl in das dorsale als auch in das ventrale Kompartiment migrieren können. Es wurde geschlußfolgert, dass diese Klone generell keine Präferenz für das dorsale oder ventrale Kompartiment besitzen. Allerdings war es möglich, für einzelne Klone eine Präferenz für das dorsale oder ventrale Kompartiment zu bestimmen. Bei einzelnen Klonen wurde eine Präferenz für eines der beiden Kompartimente gewertet, wenn – innerhalb der pouch – der Flächen-Anteil des Klons im dorsalen und ventralen Kompartiment unterschiedlich groß war. Besonders offensichtlich war dies bei Klonen die vollständig im D- oder V-Kompartiment lokalisiert waren und mit der endogenen D/V-Grenze in Kontakt standen (Abb. 17; Abb. 18). Wenn eine Präferenz für eines der beiden Kompartimente zu erkennen war – also ein größerer Anteil des Klons im D- oder V-Kompartiment lag – kam es zur Verzerrung der *Wg*-D/V- (oder NRE-GFP) bzw. *ap-lacZ*-Expression in Richtung des präferierten Kompartiments. Entsprechend wurde bei größeren *omb* Klonen, welche die D/V-Grenze überspannten und deren Flächen-Anteil im D- und V-Kompartiment der pouch etwa gleich groß war – also keine Präferenz für eines der beiden Kompartimente bestand – nur ein schwacher oder kein Effekt auf die *Wg*-D/V-, NRE-GFP- und *ap-lacZ*-Expression an der D/V-Grenze festgestellt (Abb. 13; Abb. 22).

Eine mögliche Erklärung für den Phänotyp von *omb* Klonen an der D/V-Grenze ist, dass *omb* mutante Zellen eine verminderte Affinität sowohl für dorsale als auch für ventrale Zellen besitzen (siehe Janody et al., 2003). Infolgedessen würde der mutante Klon aus jenem Kompartiment herausgedrückt werden, in dem weniger mutante Zellen liegen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese, bildete nur ein kleiner Anteil der Klonzellen die fehlspezifizierte (*ap-* bzw. *ap+*) Zellgruppe im distalen Teil von *omb* mutanten Klonen (Abb. 17; Abb. 18). Auch wurde zwischen dorsalen und ventralen *omb* Klonen kein Unterschied, bezüglich der Klونغestalt, festgestellt. In der pouch waren die Klone meist abgerundet und wiesen eine gleichmäßige Klونغrenze auf. Dies minimiert den Kontakt zwischen dem Klon und den umliegenden Zellen. Shen und Kollegen (Shen et al., 2010) zeigten, dass die *Omb*-Expression von der A/P-Grenze nach außen hin abfällt, dass aber die *Omb* Konzentration parallel zur A/P-Grenze in der pouch konstant ist. Parallel zum *Omb*-Gradienten verändert sich die Gestalt von *omb* Klonen (nahe an der A/P-Grenze rund, entfernt von der A/P-Grenze mit unregelmäßiger Kontour). Diese wurde als Hinweis auf die *Omb*-abhängige Expression eines Zellaffinitätsfaktors interpretiert.

#### Migration von *omb* I-o-f Klone an der D/V-Grenze

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wird im vorgeschlagenen Model (Abb. 23) von einem Migrationsereignis der *omb* I-o-f Klone, an der D/V-Grenze, ausgegangen. Allerdings stellt sich die Frage was die treibende Kraft hinter diesen Zellbewegungen ist.

Wie oben bereits erläutert, bilden Zellen an der Grenze zwischen D- und V-Kompartiment ein Signalzentrum, welches die Musterbildung entlang der D-V Achse kontrolliert. Die Notch-Aktivierung an der D/V-Grenze ist für das Wachstum der Flügelscheibe notwendig, dabei führt die symmetrische Aktivierung von Notch und seinen Zielgenen zu einem symmetrischen Wachstum im D- und V-Kompartiment. Indem Ap die Expression von *fng* im D-Kompartiment der Flügelscheibe aktiviert (Irvine und Wieschaus, 1994) wird in den dorsalen Zellen sowohl *ap* als auch *fng* exprimiert, während ventralen Zellen eine entsprechende Expression fehlt. Zudem besitzen Zellen mit einer veränderten Ap-Aktivität auch eine veränderte Fringe-Aktivität. Nach Rauskolb und Kollegen (Rauskolb et al., 1999), nehmen Klone mit einer veränderten Fringe-Aktivität die Signaleigenschaften des gegenüberliegenden Kompartiments an und verschieben an der D/V-Grenze das Signalzentrum gegenüber der endogenen Kompartimentsgrenze. Ein unmittelbar dorsal der D/V-Grenze positionierter *fng* mutanter Klon verschiebt die Notch-Aktivität um den Klon aber zeigt keine Notch-Aktivität an der Grenze zwischen Klon und V-Kompartiment. Wenn das Wachstum in Bezug auf das versetzte Signalzentrum symmetrisch ist, könnte der Klon durch das Wachstum des umgebenden Gewebes in das entgegengesetzte Kompartiment gedrückt werden (Blair und Ralston, 1997). Dieser Mechanismus wurde von Blair und Ralston für die A/P-Kompartimentsgrenze formuliert und als „pushing“-Mechanismus von Milán und Kollegen (Milán und Cohen, 2003) für die D/V-Kompartimentsgrenze diskutiert. Im Fall des dorsalen *fng* Klons sollte das unterschiedliche Wachstum, am versetzten Signalzentrum, die *fng* mutanten Zellen aus dem D-Kompartiment herausdrücken (Milán und Cohen, 2003).

Im D- oder V-Kompartiment lokalisierte *omb* I-o-f Klone, mit Kontakt zur normalen D/V-Grenze, zeigten in ihrem distalen Teil eine Verlagerung der *ap-lacZ*- und *Wg*-D/V-Expression und somit eine Verschiebung des Signalzentrums gegenüber der endogenen Kompartimentgrenze (Abb. 23). Wie bereits oben erläutert, kann davon ausgegangen werden, dass *omb* mutante Zellen mit einer *ap-lacZ*-Expression auch *fng* exprimieren und umgekehrt Zellen ohne eine *ap-lacZ*-Expression eine entsprechende *fng*-Expression fehlt. Im Fall eines vollständig im D-Kompartiment lokalisierten *omb* Klons, gilt demzufolge, dass die im weitesten ventral gelegenen Teil des Klons positionierte *ap-lacZ*-negative Zellgruppe keine *fng*-Expression besitzt. In dieser Hinsicht ähnelt diese *omb* mutante Zellgruppe einem *fng* Klon im D-Kompartiment. Voraussetzung hierbei ist, dass der Klon (*omb* und *fng*) in unmittelbarer Nähe zur D/V-Grenze positioniert ist. Nach dem „pushing“-Mechanismus, sollte ein symmetrisches Wachstum, am versetzten Signalzentrum, die *ap-lacZ*-negative Zellgruppe (im dorsalen *omb* I-o-f Klon) aus dem D-Kompartiment herausdrücken. Das Resultat wäre ein *omb* Klon der die D/V-Grenze überlagert, mit einer geraden *Wg*-Expression an der D/V-Grenze und einem großen dorsalen und einem kleinen ventralen Anteil. Solche Klone wurden jedoch in späten L3 Flügelimagnalscheiben nicht festgestellt.

Nach dem vorgeschlagenen Model (Abb. 23) wird die *ap-lacZ*-negative Zellgruppe (im weitesten ventral gelegenen Teil des dorsalen *omb* I-o-f Klons) nicht aus dem D-Kompartiment herausgedrückt, vielmehr bewegen sich deren Zellen als Teil des Klons in das D-Kompartiment. Es ist vorstellbar, dass in *omb* Klonen kein symmetrisches Wachstum am versetzten Signalzentrum stattfindet. Zhang und Kollegen (Zhang et al., 2013) zeigten, dass *Omb* die Proliferation in Abhängigkeit von der Entfernung

zu A/P-Grenze moduliert. Effekte orthogonal zur D/V-Grenze wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, sind aber in den gezeigten Daten nicht augenfällig.

Ein vergleichbarer Phänotyp wie bei *omb* l-o-f Klone, mit einer Verschiebung der *ap*- und *wg*-Expression an der D/V-Grenze, wird in der Literatur für *skuld* und *kohtalo* mutante Klone beschrieben (Janody et al., 2003). Für eine weiterführende Untersuchung und einen Vergleich der Auswirkungen von *omb* und *kto* mutanten Klonen auf die D/V-Kompartimentsgrenze, wurden ebenfalls *kto* mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse werden in 2.4.1 erläutert.

## 2.4 *kohtalo* (*kto*)

*Drosophila kohtalo* (*kto*) und *skuld* (*skd*; ehemals *blind spot* (Gutiérrez et al., 2003)) kodieren für die Orthologen der Mediator-Komponenten Med12 und Med13 (Treisman, 2001). Sie bilden gemeinsam mit Cyclin C und CDK8 ein fakultatives Modul (CDK8-Modul genannt), welches reversibel an den *Drosophila*-Mediator-Komplex binden kann (Conaway und Conaway, 2011). Der hochkonservierte Mediator-Komplex spielt bei der RNA-Polymerase II (RNAPII) abhängigen Gentranskription eine zentrale Rolle, indem er als Vermittler die Verbindung zwischen verschiedenen Transkriptionsfaktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie herstellt (Borggrefe und Yue, 2011; Conaway und Conaway, 2011). Dieser bis zu 30 Untereinheiten umfassende Protein-Komplex ist in drei Domänen organisiert, nämlich Kopf, Mitte und Schwanz. Das Cdk8-Modul kann optional in dem Mediator-Komplex anwesend sein und dadurch als Regulator der Komplex-Aktivität wirken und die Interaktion zwischen dem Mediator-Komplex und der RNAPII modulieren (zusammengefasst in Conaway und Conaway, 2011). Das regulatorische Cdk8-Modul ist zwischen verschiedenen Spezies ebenfalls hoch konserviert und es konnte gezeigt werden, dass dieses Submodul sowohl als Ko-Repressor als auch als Ko-Aktivator agieren kann (zusammengefasst in Borggrefe und Yue, 2011).

Die Transkription von *Wg*-Zielgenen in *Drosophila* (oder der verwandten *Wnt*-Proteine in anderen Spezies) wird durch die Stabilisation und die Translokation von Armadillo (*Arm*, *Drosophila*  $\beta$ -Catenin) in den Nukleus und dessen Bindung an den TF Pangolin (*Pan*, *Drosophila* TCF) vermittelt. Das Adapterprotein Legless (*Lgl*, *Drosophila* Bcl-9) vermittelt die Rekrutierung und Bindung von Pygopus (*Pygo*) an den *Arm*-*Pan*-Komplex (zusammengefasst in Städeli et al., 2006). Es gibt Hinweise darauf, dass in *Drosophila* *Pygo* die Transkription von *Wg*-Zielgenen aktiviert, indem er mit *Skd* und *Kto* interagiert um dadurch den Mediator-Komplex zu rekrutieren (Carrera et al., 2008).

*Kto* und *Skd* spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Flügelscheibe (Janody et al., 2003; Loncle et al., 2007; Carrera et al., 2008; Janody und Treisman, 2011; Mao et al., 2014). *Kto* und *Skd* bilden einen Komplex (*Kto*-*Skd*-Komplex) und wirken als negative Regulatoren für die Expression einer Reihe von Genen. In der Flügelscheibe verursachen *kto* und *skd* mutante Klone nicht unterscheidbare Phänotypen und zeigen identische Effekte auf Genexpressionen (Janody et al., 2003; Carrera et al., 2008; Janody und Treisman, 2011; Mao et al., 2014). Auch ist in der Flügelscheibe der Phänotyp der *skd-kto*-Doppelmutante von dem der Einzelmutanten nicht unterscheidbar (Janody et al., 2003). In *Drosophila* sind *kto* und *skd* am *Wg*-, *Notch*- sowie *Hh*-Signalweg beteiligt, die bei der

Flügelscheibenentwicklung eine wesentliche Rolle spielen. Bei der Kompartimentierung der Flügelscheibe weisen *kto* und *skd* eine identische Wirkung hinsichtlich der Zellaffinität auf (Janody et al., 2003). Ferner besteht eine konsistente Anforderung für *skd* und *kto* für die Expression von Genen, die durch Wg positiv reguliert werden (Carrera et al., 2008). Von der D/V-Grenze aus aktiviert Wg (als Morphogen) unter anderem die Expression von *vestigial* (*vg*), *Distal-less* (*Dll*) und *senseless* (*sens*) (Zecca et al., 1996; Neumann und Cohen, 1997a, Nolo et al., 2000). An der D/V-Grenze lokalisierte *skd* oder *kto* mutante Klone exprimieren Wg an der D/V-Grenze (d.h. die Wg-D/V-Expression bleibt erhalten), während die *vgQE-lacZ*-, *Dll-lacZ*- und *Sens*-Expression verloren gehen (Carrera et al., 2008). Zusätzlich kommt es zu einer Ausweitung und Verstärkung der *wg-lacZ*- und Wg-Expression in *skd* oder *kto* mutanten Klone an der D/V-Grenze (Carrera et al., 2008). Auch konnte gezeigt werden, dass die Repression von *teashirt* (*tsh*) in der pouch der Flügelscheibe sowohl Wg als auch *skd* und *kto* erfordert (Zirin und Mann, 2004; Carrera et al., 2008).

#### 2.4.1 Klonaler *kto*-Verlust und Wg-Expression

Für die vorliegende Arbeit wurden *kto* mutante Klone im ersten Larvenstadium induziert und in L3 Flügelimaginalscheiben analysiert. Die Auswirkungen dieser Klone, auf die Expression von Ap, Wg, Vg und Omb wurden unter Verwendung von Antikörpern gegen das entsprechende Protein untersucht.

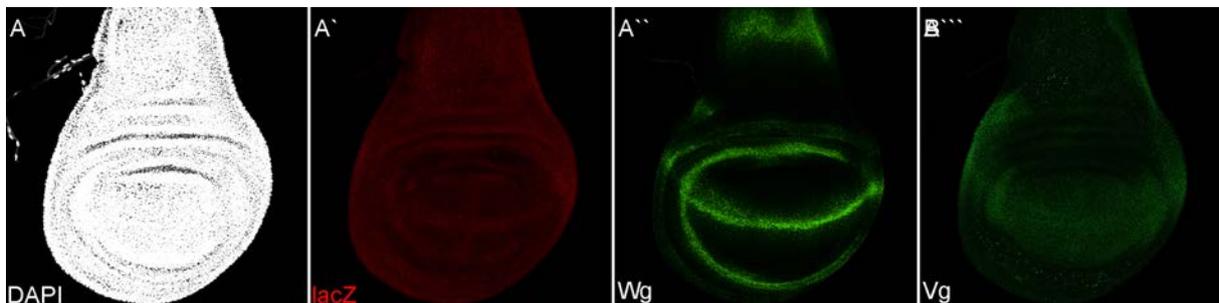


Abbildung 24 Wg- und Vg-Expression in einer wildtypischen Flügelimaginalscheibe DAPI (Weiß; A), *arm-lacZ* (Rot; A'), anti-Wg (Grün; A''), anti-Vg (Grün; A'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

*kto* mutante Klone, welche die D/V-Grenze überspannten (Abb. 26; Abb. 27 A, B) oder mit der Wg-Expression an der D/V-Grenze in Kontakt standen (Abb. 27 C), zeigten eine Ausbreitung der Wg-Expression innerhalb des Klons. Innerhalb der pouch lokalisierte *kto* Klone, die keinen direkten Kontakt zur D/V-Grenze hatten, zeigten im weitesten distal gelegenen Teil des Klons eine ektopische Wg-Expression (Abb. 25 A, B). Solche Klone wurden sowohl im D- als auch im V-Kompartiment auf Höhe der A/P-Grenze beobachtet. Es wurden nur wenige *kto* Klone gefunden, die komplett im D- oder V-Kompartiment lokalisiert waren und mit der D/V-Grenze in Kontakt standen. In diesen Klonen wurde – neben einer Ausbreitung der Wg-Expression – eine schwache Ablenkung der Wg-D/V-Expression, in Richtung des Klons, festgestellt (Abb. 25 A; Abb. 26 A).

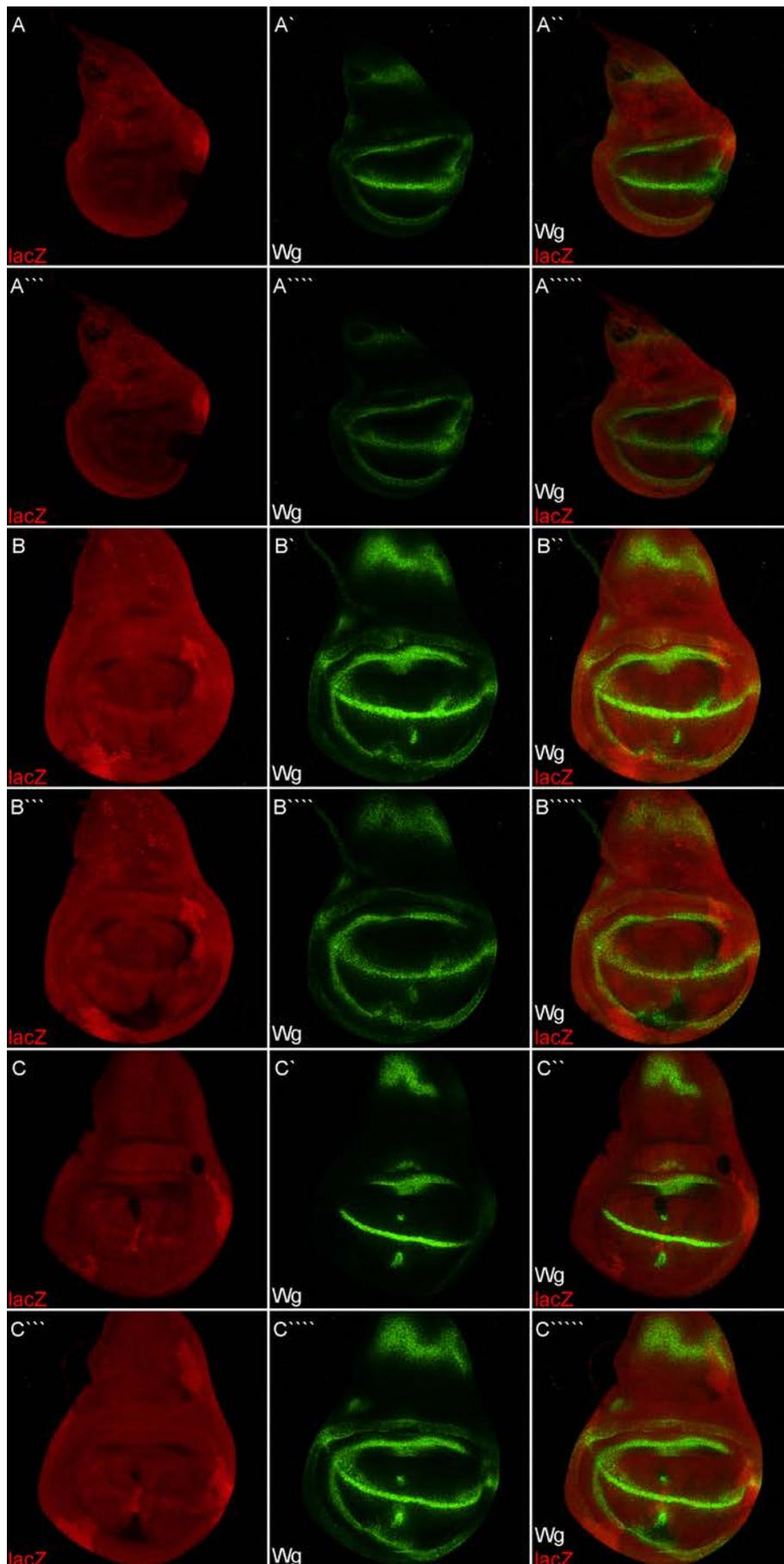


Abbildung 25 Effekte des klonalen *kto* Verlusts auf die *Wg*-Expression  
 L3 Flügelimaginalscheibe mit *kto* mutanten Klonen. Die *arm-lacZ*-Expression markiert das Wildtyp-

Gewebe und ist mit anti- $\beta$ -Gal (Rot) markiert. anti- $\beta$ -Gal (Rot; A, B, C), anti-Wg (Grün; A', B', C'), Überlagerung des anti-Wg (Grün) und anti- $\beta$ -Gal (Rot) Signals (A'', B'', C''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; In (A-A'', B-B'', C-C'') ist die apikale Hälfte und in (A'''-A''''', B'''-B''''', C'''-C''''') ist die basale Hälfte der Flügelscheibe gezeigt. (A) Der posteriore *kto* mutante Klon (im PV Quadranten der pouch) verursachte eine Ablenkung der Wg-DV-Expression nach ventral. (B, C) In der pouch lokalisierte *kto* mutante Klone, zeigten eine ektopische Wg-Expression im distalen Teil des Klons. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 2.4.2 Klonaler *kto*-Verlust und Vg-Expression

An der D/V-Grenze lokalisierte *kto* Klone wiesen eine erhöhte Vg-Expression auf (Abb. 26). In kleinen Klonen war die Ausdehnung der Expression von Vg mit der von Wg vergleichbar (Abb. 26 B), in größeren Klonen zeigte die Vg-Expression hingegen eine geringere Ausdehnung (Abb. 26 A).

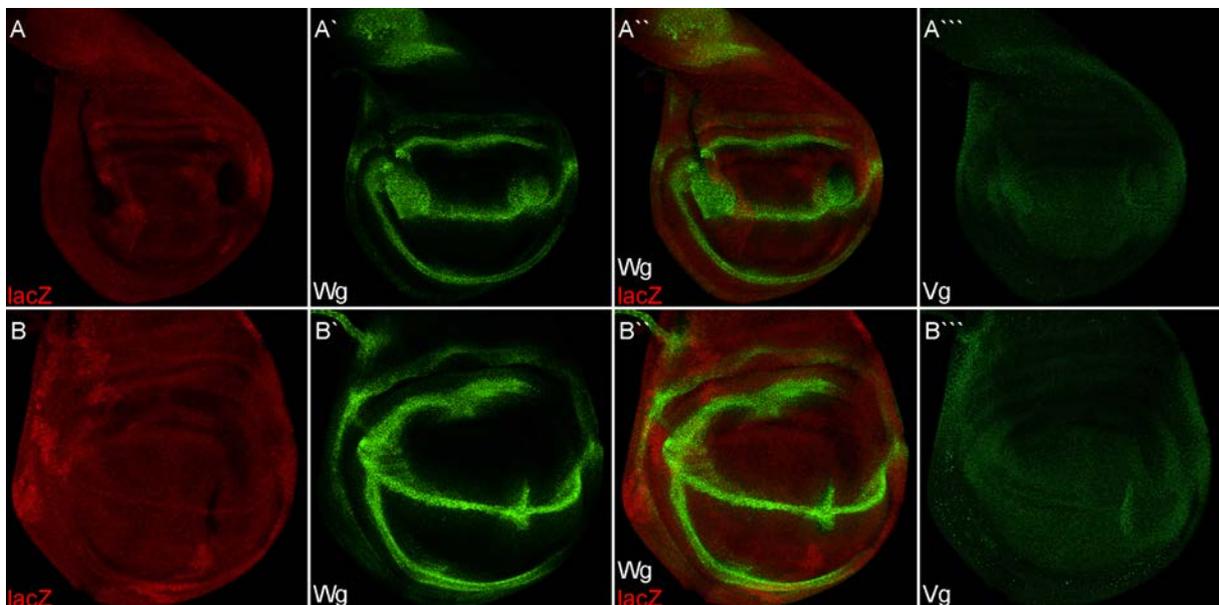


Abbildung 26 Effekte des klonalen *kto* Verlusts auf die Wg- und Vg-Expression

L3 Flügelimaginalscheibe mit *kto* mutanten Klonen. Die *arm-lacZ*-Expression markiert das Wildtyp-Gewebe und ist mit anti- $\beta$ -Gal (Rot) markiert. anti- $\beta$ -Gal (Rot; A, B), anti-Wg (Grün; A', B'), Überlagerung des anti-Wg (Grün) und anti- $\beta$ -Gal (Rot) Signals (A'', B''). anti-Vg (Grün; A''', B'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A) Der anteriore *kto* mutante Klon, der die D/V-Grenze überspannt, zeigte eine Ausbreitung der anti-Wg Färbung. Der posteriore *kto* mutante Klon (im PD Quadranten der pouch) verursachte zusätzlich eine schwache Ablenkung der Wg-DV-Expression nach dorsal. (B) Ein *kto* mutanter Klon, der die D/V-Grenze überspannt, zeigte eine Ausbreitung der anti-Wg Färbung sowie eine Zunahme der anti-Vg Färbung. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 2.4.3 Klonaler *kto*-Verlust und Omb-Expression

Die Fluoreszenzfärbung für Omb ergab eine stärkere Omb-Expression in *kto* mutanten Klonen, die in der medialen pouch – also im Bereich mit einer starken endogenen Omb-Expression – lokalisiert waren (Abb. 27). In jüngeren L3 Flügelscheiben schien die Omb-Expression in diesen *kto* Klonen stärker als in späteren L3 Flügelscheiben (Abb. 27 A, C), im Vergleich zur *wt* Expression.

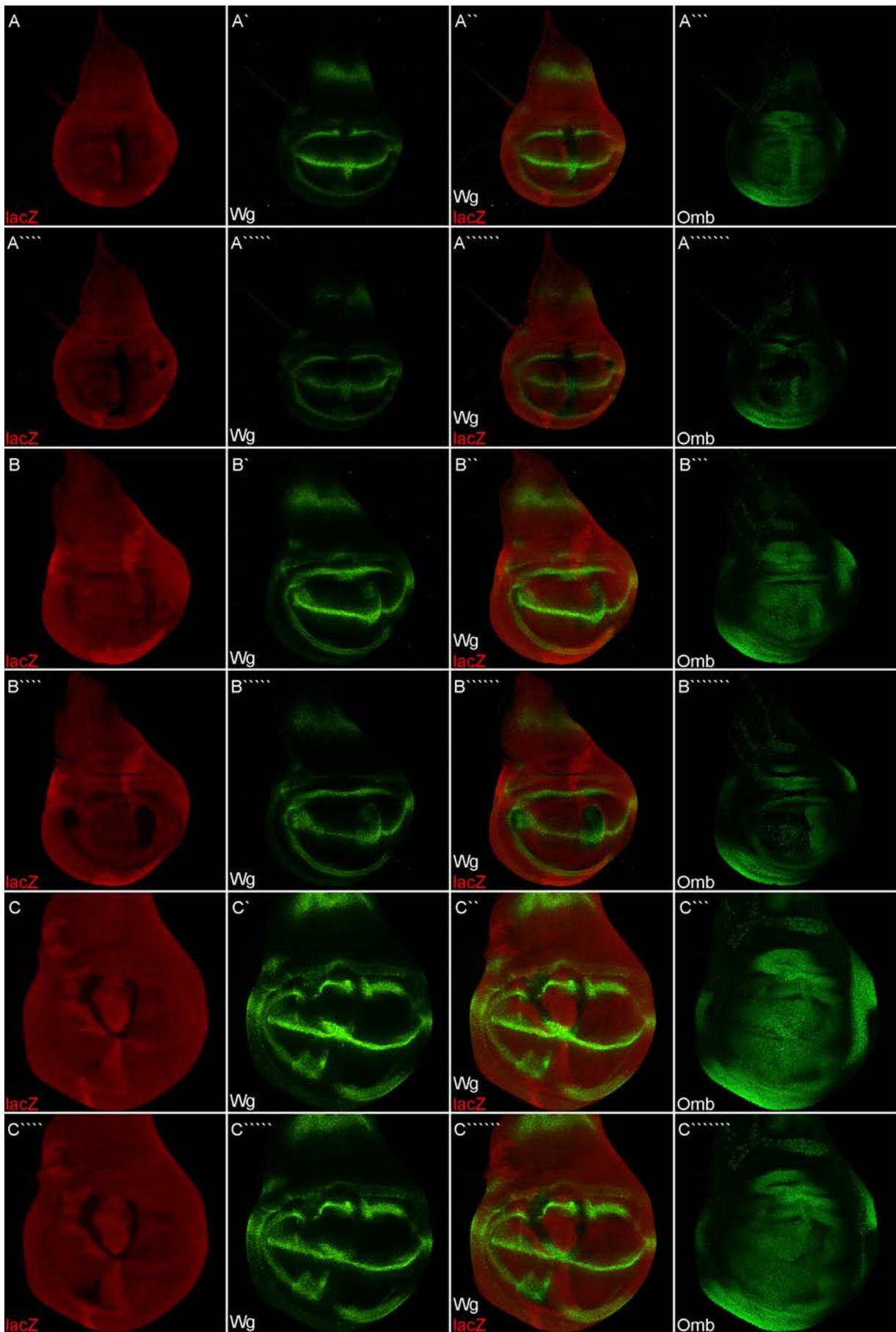


Abbildung 27 Effekte des klonalen *kto* Verlusts auf die Wg- und Omb-Expression

L3 Flügelimaginalscheibe mit *kto* mutanten Klonen. Die *arm-lacZ*-Expression markiert das Wildtyp-Gewebe und ist mit anti- $\beta$ -Gal (Rot) markiert. anti- $\beta$ -Gal (Rot; A, B, C), anti-Wg (Grün; A', B', C'), Überlagerung des anti-Wg (Grün) und anti- $\beta$ -Gal (Rot) Signals (A'', B'', C''). anti-Omb (Grün; A''', B''', C'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; In (A-A''', B-B''', C-C''') ist die apikale Hälfte und in (A''''-A''''''', B''''-B''''''', C''''-C''''''') ist die basale Hälfte der Flügelscheibe gezeigt. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 2.4.4 Klonaler *kto*-Verlust und Ap-Expression

Folgende Ergebnisse beschreiben die Effekte von *kto* mutanten Klonen auf die Expression von Ap und beziehen sich auf Beobachtungen an einzelnen Klonen. Es wurden nur wenige Flügelimaginalscheiben erhalten, die *kto* Klone enthielten und gleichzeitig gegen Ap gefärbt waren.

Wie in Abb. 28 A gezeigt, wurde in einem vollständig im V-Kompartiment lokalisierten *kto* Klon eine Ap<sup>+</sup> Zellgruppe im weitesten dorsal gelegenen Teil des Klons detektiert. Sowohl der Klon als auch die Ap<sup>+</sup> Zellgruppe wiesen eine runde Gestalt auf. Die Fluoreszenz-Intensität von Ap war in der Ap<sup>+</sup> Zellgruppe innerhalb des Klons deutlich höher als in der dorsalen pouch (Abb. 28 A). In der dorsalen pouch lokalisierte *kto* Klone zeigten ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenz-Intensität für Ap (Abb. 28 B, C).

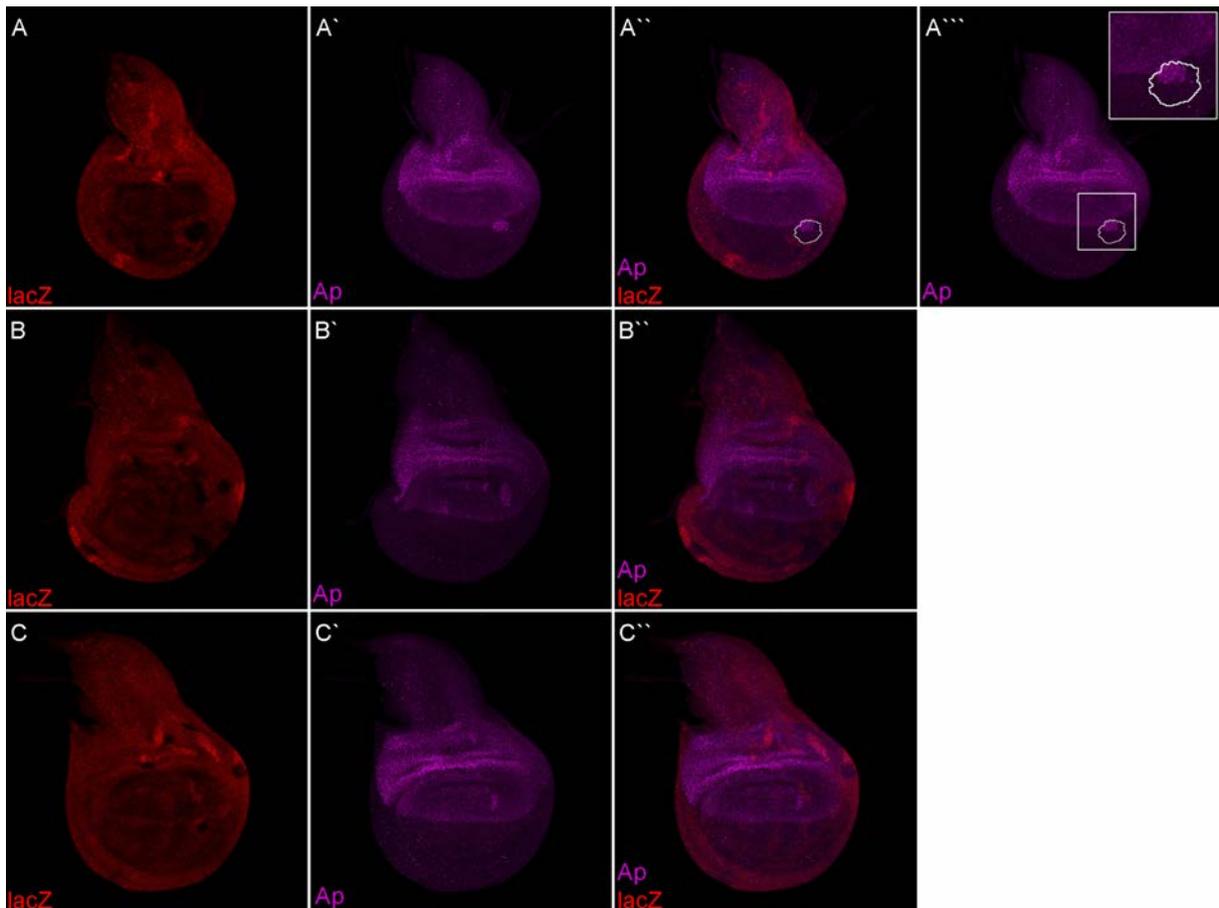


Abbildung 28 Effekte des klonalen *kto* Verlusts auf die Ap-Expression

Gezeigt sind L3 Flügelimaginalscheiben mit *kto* mutanten Klonen. (A-C) Wildtyp-Gewebe ist mit anti- $\beta$ -Gal (Rot) markiert und zeigt die *arm-lacZ*-Expression. anti- $\beta$ -Gal (Rot; A), anti-Ap (Magenta; A'-C'), Überlagerung des anti-Ap (Magenta) und anti- $\beta$ -Gal (Rot) Signals (A''-C''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. In (A''-A''') ist der Klon mit einer weißen

Linie gekennzeichnet. (A) Der posteriore *kto* mutante Klon (im PV Quadranten der pouch) zeigte eine anti-Ap Färbung im dorsal gelegenen Teil des Klons. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

## 2.5 Diskussion: *kohtalo*

### *Kto* und *skd* an der D/V-Kompartimentsgrenze

An der D/V-Grenze lokalisierte *kto* mutante Klone verursachten eine Ausbreitung der Wg-Expression in den Klon hinein (Abb. 25 B; Abb. 26). *kto* Klone, welche die D/V-Grenze kreuzten, wiesen neben einer Expansion der Wg-Expression auch eine gesteigerte Vg-Expression auf (Abb. 26). Aufgrund der Position der betroffenen Klone kann davon ausgegangen werden, dass die erhöhte Immunfluoreszenz gegen Vg innerhalb des Klons auf die Aktivität des vgBE zurückzuführen ist. Diese Annahme steht im Einklang mit der Beobachtung, dass an der D/V-Grenze lokalisierte *skd* oder *kto* mutante Klone *wg* und *vgBE-lacZ* an der D/V-Grenze exprimieren und dass deren Expression in die Klone hinein expandiert (Janody et al., 2003; Carrera et al., 2008; Janody und Treisman, 2011). Janody und Treisman (Janody und Treisman, 2011) schlussfolgerten, dass in Zellen nahe der D/V-Grenze *Kto* und *Skd* für die Repression von *wg* und vgBE benötigt werden, aber nicht für deren Aktivierung.

Im Unterschied zu *kto* Klone zeigten *omb* l-o-f Klone in vergleichbarer Lage, keine Ausweitung der Wg-Expression an der D/V-Grenze (Abb. 13). Es wurde berichtet, dass die Expression von *vgQE-lacZ* in *skd* oder *kto* mutante Klone verloren geht (Carrera et al., 2008). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit, mittels Antikörperfärbung gegen Vg, für *kto* Klone jedoch nicht eindeutig bestätigt werden (Abb. 26). In der Flügelscheibe wird *omb* für die Expression des vgQE, aber nicht für die Expression des vgBE benötigt (del Alamo Rodríguez et al., 2004). Dementsprechend zeigten *omb* Nullmutante L3 Flügelscheiben eine Vg-Expression auf der D/V-Grenze und einen Verlust der Vg-Expression in der vgQE-Domäne (Abb. 44). Interessanterweise zeigten einige *omb* l-o-f Klone, welche die D/V-Grenze überspannten, eine Ausbreitung der NRE-GFP Reporteraktivität an der D/V-Grenze (Abb. 22 C; Anhang Abb. 78 C). Dies könnte darauf hinweisen, dass *omb* benötigt wird um eine Notch-Signalaktivität in Zellen nahe der D/V-Grenze zu verhindern.

In jüngeren L3 Flügelscheiben war die *Omb*-Expression in *kto* mutanten Klonen deutlich erhöht, wie in Abb. 27 (A) zu sehen. Die Doppelfärbung gegen Wg und *Omb* zeigte neben einer stärkeren *Omb*-Expression auch eine Ausbreitung der Wg-D/V-Expression in den Klon hinein sowie einen Verlust der Wg-IR-Expression in der dorsalen hinge (Abb. 27). Die Überexpression von *Omb* führte zu einer Reduktion oder einem Verlust der Wg-IR-Expression in der dorsalen hinge aber nicht zu einer Ausbreitung der Wg-D/V-Expression (Abb. 21; Abb. 42; Abb. 43).

Zellen an der D/V-Grenze exprimieren und sezernieren Wg, das als weitreichendes Morphogen wirken kann um Zielgene – einschließlich *omb* – in der pouch zu aktivieren (Zecca et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Wg auf lange Distanz wirkt und die Transkription von Zielgenen (gezeigt an *Dll* und *vg*) graduell hochreguliert, abhängig von der Konzentration und der Entfernung von den Wg sezernierenden Zellen (Zecca et al., 1996). Es ist daher denkbar, dass eine Expansion der Wg-D/V-Expression – wie in *kto* Klonen beobachtet (Abb. 26; Abb. 27) – eine stärkere *Omb*-Expression verursachen kann. Allerdings war eine stärkere *Omb*-Expression nur innerhalb des *kto* Klons feststellbar (Abb. 27), was auf eine zellautonome Regulation schließen lässt und durch eine alleinige

Funktion von Wg nicht zu erklären ist. Ferner scheint die Omb-Expression in der hinge – die unabhängig von Wg reguliert wird – ebenfalls in *kto* Klonen stärker als in *wt* Gewebe (Abb. 27 A, C).

Nach Carrera und Kollegen (Carrera et al., 2008) sind *skd* und *kto* für die Expression des Dpp-Zielgens *spalt* (*sal*) in der pouch nicht erforderlich. In der zitierten Publikation wird eine Flügelscheibe mit einem in der pouch lokalisierten *kto* Klon gezeigt, in dem eine leicht stärkere Immunfluoreszenz von *sal-lacZ* zu erkennen ist. In der Flügelscheibe wird *omb* in der pouch durch Wg und Dpp reguliert, in der hinge hingegen nur durch den Dpp-Signalweg (Grimm und Pflugfelder, 1996). Die stärkere Omb-Expression in *kto* Klonen – in der pouch und/oder in der dorsalen hinge – könnte möglicherweise durch den Dpp-Signalweg vermittelt werden. In der hinge Region kann Wg als Vermittler der erhöhten Omb-Expression in *kto* Klonen ausgeschlossen werden, da in *kto* hinge-Klonen die Wg-Expression verloren geht.

Dpp gehört zu den Bone Morphogenic Protein (BMP) Liganden der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )-Superfamilie (Padgett et al., 1987). Der Dpp-Signalweg enthält nur wenige Komponenten die zudem hoch konserviert sind. Die Signaltransduktion beginnt, wenn Dpp-Dimere an einen Rezeptorkomplex, bestehend aus Thickvein (Tkv, *Drosophila* Typ-I-Rezeptor) und Punt (*Drosophila* Typ-II-Rezeptor), binden. Bei Ligandenbindung wird Tkv durch Punt phosphoryliert um als aktiviertes Tkv wiederum Mothers-against-Dpp (Mad, P-Mad in seiner phosphorylierten Form, *Drosophila* Smad) zu phosphorylieren. Nach Komplexbildung von P-Mad mit Medea (Med, *Drosophila* Co-Smad) transloziert der P-Mad/Med-Komplex in den Nukleus, wo es mit zusätzlichen TF die Transkription von Dpp-Zielgenen aktiviert (zusammengefasst in Hamaratoglu et al., 2014). Für humane Krebszellen wurde gezeigt, dass der Med12 Knockdown zu einer Hochregulation von Typ-II-Rezeptorprotein führt und damit zu einer Aktivierung der Signalwegtransduktion (Huang et al., 2012). Interessanterweise konnte MED12 auch im Zytoplasma nachgewiesen werden während andere Untereinheiten des Cdk8-Moduls nur im Nukleus lokalisiert sind. Die Ergebnisse von Huang und Kollegen (Huang et al., 2012) weisen darauf hin, dass zytoplasmatisches MED12 mit dem Typ-II-Rezeptor direkt interagieren kann um dessen Funktion negativ zu beeinflussen. Die Repression von MED12 führt daher zu einer Aktivierung der TGF- $\beta$ -Signalisierung (Huang et al., 2012). Für *Drosophila* wurde eine vergleichbare Beteiligung von Kto an der Dpp-Signalisierung bisher nicht beschrieben. Um zu überprüfen ob eine veränderte Dpp-Signalisierung in *kto* mutanten Klonen, in der Flügelimaginalscheibe, für die stärkere Omb-Expression verantwortlich ist, könnte eine P-Mad Färbung durchgeführt werden.

Janody und Kollegen (Janody et al., 2003) untersuchten die Auswirkungen von *kto* und *skd* auf die A/P- und D/V-Kompartimentsgrenze der Flügelimaginalscheibe. *skd* oder *kto* mutante Klone die vor Bildung der D/V-Grenze induziert wurden und im D-Kompartiment von L3 Flügelscheiben lokalisiert sind, enthalten *ap*-defiziente Zellen im weitesten ventral gelegenen Teil des Klons, wohingegen ventrale Klone *ap* exprimierende Zellen in ihrem am weitesten dorsal gelegenen Teil aufweisen (Janody et al., 2003). Damit zeigen diese Klone einen ähnlichen Phänotyp wie *omb* Klone, die vollständig im D- oder V-Kompartiment von L3 Flügelscheiben lokalisiert sind. Ähnlich wie *omb* Klone sind *skd* und *kto* Klone in der Lage die Wg-Expression an der D/V-Grenze entweder in die dorsale oder ventrale Richtung zu verzerren (Janody et al., 2003). Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit

den eigenen Beobachtungen an *kto* Klonen an der D/V-Grenze überein. *omb* und *kto* Klone zeigten einen ähnlichen Effekt auf die Wg-D/V-Expression – in der pouch von L3 Flügelscheiben – wenn der Klon vollständig im D- oder V-Kompartiment lokalisiert war und Kontakt zur Wg-D/V-Expression bestand. Dabei kam es zu einer Ablenkung der Wg-Expression in Richtung des Klons (Abb. 18; Abb. 25 A; Abb. 26 A). Passend zu dieser Beobachtung wiesen ventral der D/V-Grenze lokalisierte Klone, die in Kontakt zur Wg-D/V-Expression standen und für *omb* oder *kto* mutant waren, eine ektopische Ap-Expression im weitesten dorsal gelegenen Teil des Klons auf (Abb. 18; Abb. 28 A). Diesen Klonen war eine abgerundete Klونغestalt, die runde Gestalt der Ap<sup>+</sup> Zellgruppe wie auch die Position der Ap<sup>+</sup> Zellgruppe, innerhalb des Klons, gemeinsam.

In der pouch lokalisierte *kto* Klone, die in einiger Entfernung zur Wg-D/V-Expression – d.h. ohne Kontakt zur D/V-Grenze – positioniert waren, wiesen eine starke ektopische Wg-Expression im weitesten distal gelegenen Teil des Klons auf (Abb. 25 B,C). Zu bemerken ist, dass dieser Effekt ausschließlich im medialen Bereich der Flügelscheibe, etwa auf Höhe der A/P-Grenze, festgestellt wurde. Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp, könnte eine Fehlexpression von Ap liefern, ähnlich wie im Model (Abb. 23) für *omb* Klone beschrieben. Allerdings wurde in der Literatur bisher kein entsprechender Phänotyp für *kto* oder *skd* Klone beschrieben. Zudem wurde in *kto* Klonen – anders als in *omb* Klonen – keine zirkuläre Wg-Expression festgestellt (vergleiche Abb. 25 B',C' mit Abb. 19 A' und Abb. 20 B'').

Es scheint unwahrscheinlich, dass der in *kto* Klonen beobachtete Effekt auf die Ap-Expression durch eine stärkere Omb-Expression vermittelt wird. Verglichen mit *kto* Klonen zeigten *omb* g-o-f Klone einen zum Teil gegenteiligen Effekt auf die Ap-Expression, wenn die Klone in der dorsalen Hälfte der pouch lokalisiert waren. So war in einigen *omb* g-o-f Klone eine Reduktion oder ein Verlust der Ap-Expression feststellbar (Abb. 21; Anhang Abb. 78), während *kto* Klone eine stärkere Ap-Expression aufwiesen (Abb. 28).

### *Kto* und *skd* an der A/P-Kompartimentsgrenze

In der Flügelscheibe verursacht der Verlust von *kto* und *skd* eine Verzerrung der A/P-Kompartimentsgrenze (Mao et al., 2014). *skd* oder *kto* mutante Klone anteriorer Herkunft, die in der Nähe der A/P-Grenze lokalisiert sind, kreuzen häufig die A/P-Kompartimentsgrenze in Richtung des posterioren Kompartiments (Janody et al., 2003). Im Hinblick auf die A/P-Kompartimentsgrenze wurde bei *omb* mutanten Klonen ein ähnliches Verhalten beschrieben wie für *kto* und *skd*. Dabei verschieben *omb* Klone anteriorer Herkunft, die nahe der A/P-Grenze lokalisiert sind, die A/P-Kompartimentsgrenze gleichfalls in Richtung des posterioren Kompartiments (Shen und Dahmann, 2005). *omb*, *kto* oder *skd* Klone, die (teilweise) in das posteriore Kompartiment migrieren, exprimieren Ci aber nicht *hh-lacZ* (Janody et al., 2003, Shen und Dahmann, 2005). Damit sind in der Flügelscheibe *omb* wie auch *kto* und *skd* für die normale Position der A/P-Grenze notwendig. Für die Segregation von anterioren und posterioren Zellen ist die Aktivität von Ci in anterioren Zellen erforderlich (Dahmann und Basler, 2000). Eine direkte Beeinflussung der Ci-Aktivität wurde für *Kto*

und *Skd* nachgewiesen (Mao et al., 2014), für *Omb* wird eine Funktion stromabwärts oder parallel zu *Ci* angenommen (Shen und Dahmann, 2005).

*Omb* unterscheidet sich durch seine Wirkung auf die Zellproliferation wie auch Apoptose, in der Flügelscheibe (siehe 4.9.1 und 4.9.2) von *Kto* und *Skd*. So wurde berichtet, dass *kto* und *skd* keinen offensichtlichen Einfluss auf die Zellproliferation oder die Apoptose haben (Carrera et al., 2008).

## 2.6 *capricious (caps)* und *tartan (trn)*

Die Gene *capricious (caps)* und *tartan (trn)*, die beide LRR-Transmembranproteine kodieren, zeigen während der Larvalentwicklung eine dynamische Expression in der Flügelimaginalscheibe (Milán et al., 2001). Im frühen zweiten Larvenstadium, wenn die D/V-Grenze festgelegt wird, werden *caps* und *trn* ausschließlich im D-Kompartiment exprimiert. Als frühe Zielgene von *Ap* tragen *caps* und *trn* zur Etablierung der D/V-Affinitätsgrenze bei, während ihrer transienten Expression in dorsalen Zellen. Es wurde vorgeschlagen, dass *Caps* und *Trn* den Zellen eine dorsal-spezifische Zellaffinität verleihen (Milán et al., 2001). Später in der Entwicklung, im dritten Larvenstadium, werden *caps* und *trn* dann in zwei lateralen Domänen in der Flügelscheibe exprimiert (im D- und V-Kompartiment), dabei wird die Expression von *caps* und *trn* durch *spalt (sal)* reprimiert (Milán et al., 2001; Milán et al., 2002). In der L3 Flügelscheibe erzeugen *Caps* und *Trn* dann Affinitätsunterschiede zwischen medial und lateral gelegenen Zellen (Milán et al., 2002). An der Aufrechterhaltung der D/V-Grenze sind beide Proteine nicht beteiligt.

*Omb* ist für die Aktivierung von *sal* (ebenfalls ein *Dpp*-Zielgen) in der distalen Flügelscheibe erforderlich (del Alamo Rodriguez et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben die *sal*-Expression in der *pouch* verloren geht und die Expression von *caps* und *trn* (visualisiert mittels *lacZ*-Linien) auf die gesamte *pouch* erweitert ist (del Alamo Rodriguez et al., 2004).

### 2.6.1 Systemischer *omb*-Verlust und *trn-lacZ*- und *caps-lacZ*-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von *trn* und *caps* mit Hilfe von Enhancer-Trap-Linien (*trn-lacZ*, *caps-lacZ*) visualisiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Auswirkungen eines klonalen *omb* Verlusts auf die Expression von *caps-lacZ* und *trn-lacZ* untersucht werden. Hierfür durchgeführte Kreuzungen (siehe 5.2.13) ergaben jedoch keine für die klonale Analyse geeignete Genotypen.

Die *trn-lacZ*- und *caps-lacZ*-Expression wurde zunächst mittels X-Gal Färbung in wildtypischen und *I(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten L3 Flügelscheiben untersucht. Im Vergleich zu *wt* L3 Flügelscheiben zeigten *I(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben eine ektopische *trn-lacZ*- und *caps-lacZ*-Expression in der distalen Flügelscheibe (Abb. 29; Abb. 30), in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von del Alamo Rodriguez und Kollegen (del Alamo Rodriguez et al., 2004). Die ektopische Aktivierung von *trn-lacZ* und *caps-lacZ* erzeugte innerhalb der *pouch* ein teilweise variables und komplexes Färbemuster. Vorwiegend in späten L3 *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben konnten distale Bereiche der *pouch* ungefärbt oder zumindest schwächer gefärbt sein als umliegende Bereiche (Abb. 29; Abb. 30). In der dorsalen hinge war die *trn-lacZ*- und *caps-lacZ*-Expression häufig medial reduziert oder unterbrochen (Abb. 29; Abb. 30).

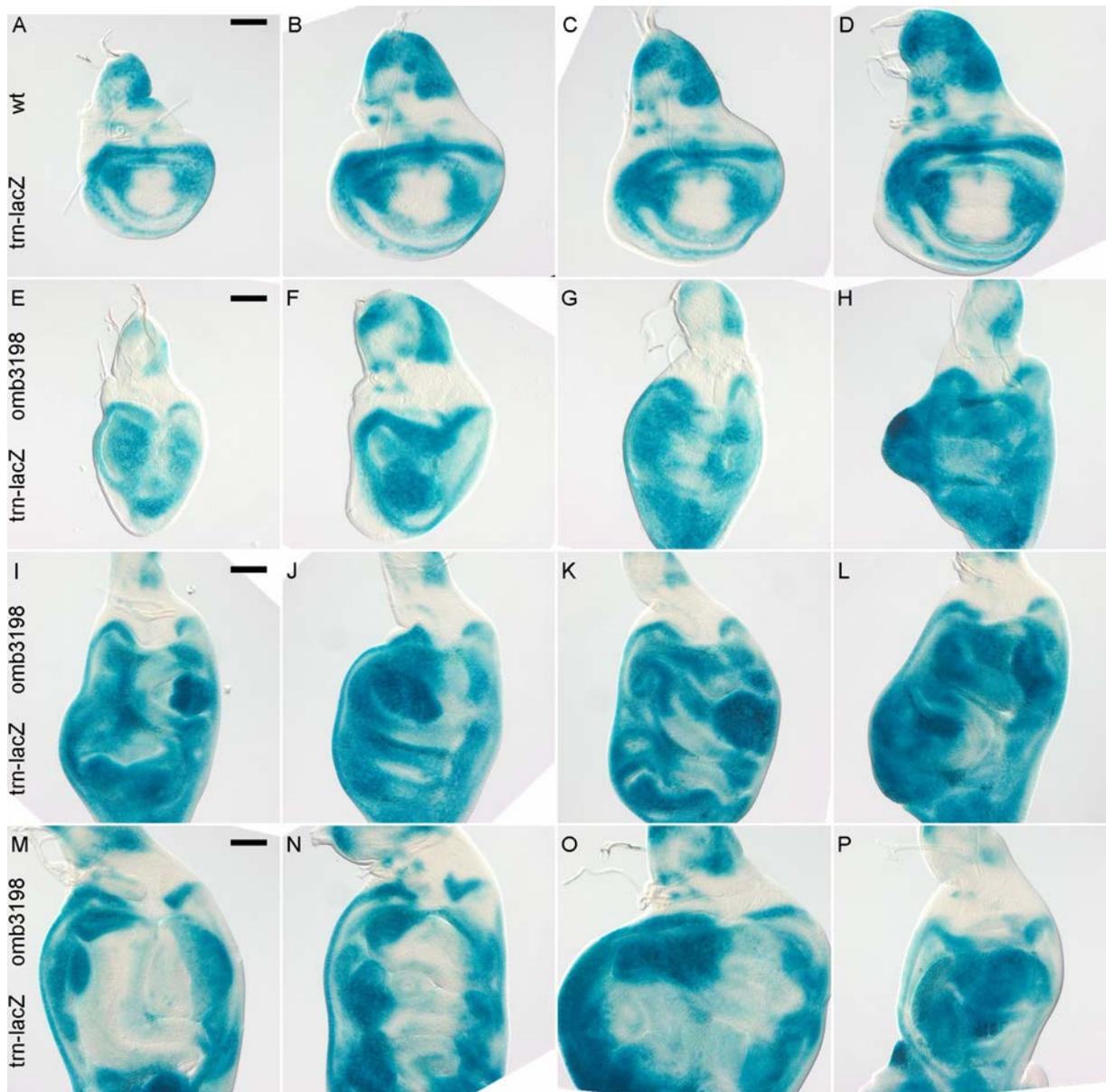


Abbildung 29 Expressionsmuster von *trn-lacZ* in *wt* und *I(1)omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben

Die *trn-lacZ*-Expression in Flügelscheiben einer wildtypischen (Kontrolle; A-D) und *I(1)omb*<sup>3198</sup> (E-P) Larven des dritten Larvenstadiums wurde mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. Dargestellt sind Flügelscheiben des frühen/mittleren (B) und späten (A, C-F) dritten Larvenstadiums. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. (E-P) In *I(1)omb*<sup>3198</sup> mutanten Flügelscheiben wurde *trn-lacZ* in der distalen Flügelscheibe ektopisch exprimiert. (G-P) In der dorsalen Hinge war die *trn-lacZ*-Expression unterbrochen.

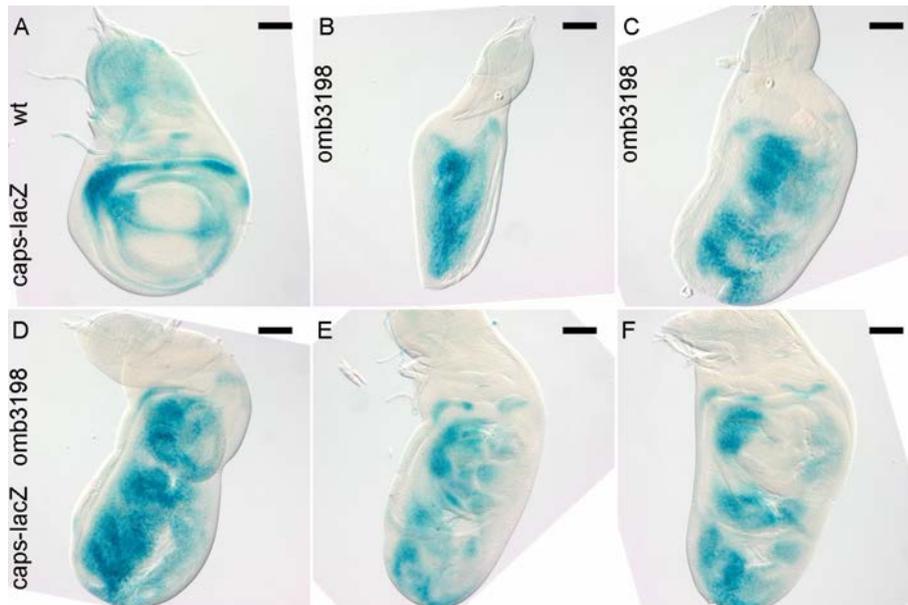


Abbildung 30 Expressionsmuster von *caps-lacZ* in *wt* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Die *caps-lacZ*-Expression in Flügelscheiben einer wildtypischen (Kontrolle; A) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (D-F) Larven des dritten Larvenstadiums wurde mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. Dargestellt sind Flügelscheiben des frühen/mittleren (B) und späten (A, C-F) dritten Larvenstadiums. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. In *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten Flügelscheiben war in der distalen Flügelscheibe eine ektopische *caps-lacZ*-Expression festzustellen, in der dorsalen hinge war die *caps-lacZ*-Expression reduziert und medial unterbrochen.

## 2.6.2 Klonale *omb*-Überexpression und *caps-lacZ*-Expression

In Abb. 31 sind die Effekte von zufällig positionierten UAS-*omb* überexprimierenden Zellklonen (*omb* g-o-f Klone) auf die *caps-lacZ*-Expression gezeigt. In L3 Flügelscheiben zeigten *omb* g-o-f Klone, welche in der medialen pouch lokalisiert waren, eine relativ starke ektopische *caps-lacZ* Aktivität (weiße Pfeilspitzen in Abb. 31). Einige *omb* g-o-f Klone, die in anderen Bereichen der Flügelscheibe positioniert waren, wiesen ebenfalls eine ektopische, aber deutlich schwächere *caps-lacZ* Aktivität auf (weiße Pfeile in Abb. 31).

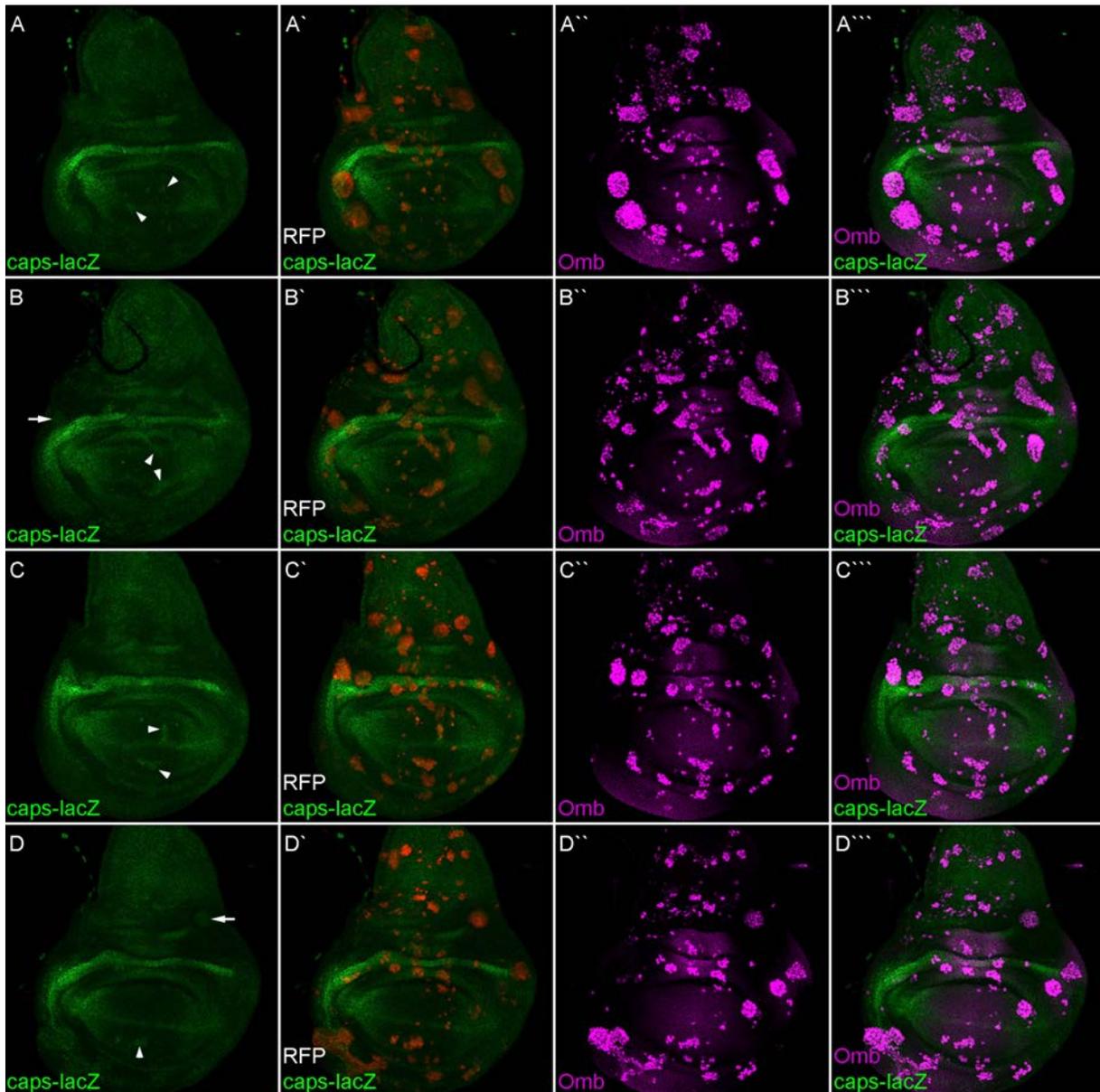


Abbildung 31 Effekte der klonalen *omb* Überexpression auf die *caps-lacZ*-Expression *caps-lacZ* (Grün; A-D), anti-Omb (Magenta; A''-D''), Überlagerung des *caps-lacZ* (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A'-D'), Überlagerung des *caps-lacZ* (Grün) und anti-Omb (Magenta) Signals (A'''-D'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Dargestellt sind L3 Flüglimaginalscheiben, in denen UAS-*omb* überexprimierende Klone im ersten Larvenstadium induziert wurden. Der Nachweis der Expression von UAS-*omb* in Zellklonen erfolgte durch Immunfluoreszenz gegen Omb und durch Coexpression von UAS-mRFP. (A-D) Klone in der medialen pouch (in der Omb-Domäne) zeigen eine starke *caps-lacZ*-Expression (weiße Pfeilspitzen). Außerhalb der pouch, in Bereichen mit einer schwachen oder ohne *caps-lacZ* Färbung, weisen die Klone häufig eine schwache *caps-lacZ*-Expression auf (weiße Pfeile). Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

### 2.6.3 Diskussion: *capricious* und *tartan*

Es ist bekannt, dass *omb* für die Aktivierung der *sal*-Expression, in der distalen Flügelscheibe, erforderlich ist (del Alamo Rodriguez et al., 2004). In der späten L3 Flügelscheibe reprimiert *Sal* die Expression von *trn* und *caps* (Milán et al., 2002), so dass beide Gene komplementär zur *sal* Domäne exprimiert werden (del Alamo Rodriguez et al., 2004). In *omb* Nullmutanten Flügelscheiben (wie auch

in Klonen) fehlt die Expression von *sal* und die Expression von *caps* und *trn* expandiert in die pouch (del Alamo Rodriguez et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wies das Färbemuster von *caps-lacZ* und *trn-lacZ* im *omb* Nullmutanten Hintergrund häufig ungefärbte Bereiche in der distalen Flügelscheibe auf (Abb. 29 und Abb. 30). Dies könnte möglicherweise auf eine unvollständige Aufhebung der Sal vermittelten negativen Kontrolle (Repression) der *caps*- und *trn*-Expression beruhen, was jedoch unwahrscheinlich ist, oder aber auf eine von *sal* unabhängige Regulation der *caps*- und *trn*-Expression hindeuten. Sekundäre Effekte durch den *omb* Verlust sind ebenfalls denkbar.

Überexpressionsklone von *omb* – die im ersten Larvenstadium induziert wurden – zeigten in L3 Flügelscheiben eine ektopische *caps-lacZ* Aktivität in der pouch – sowohl im D- als auch im V-Kompartiment (Abb. 31). Es konnte gezeigt werden, dass in der Flügelscheibe die *sal*-Expression durch eine Überexpression von Omb (*omb g-o-f*) nicht oder nur geringfügig beeinflusst wird (Shen et al., 2010). Damit scheint die ektopische *caps-lacZ*-Expression in *omb g-o-f* Klonen (Abb. 31) nicht über *sal* zu erfolgen. Dies könnte darauf hindeuten, dass bei Verlust und Überexpression von Omb zwei verschiedene Mechanismen die *caps* (*caps-lacZ*) -Expression vermitteln – vermutlich ein *sal*-abhängiger Mechanismus (bei Omb Verlust) und ein *sal*-unabhängiger Mechanismus (bei Omb Überexpression).

Im zweiten Larvenstadium induziert Apterous die Expression von *caps* und *trn* in der Flügelscheibe (Milán et al., 2001). *omb g-o-f* Klone zeigten keine zellautonome Aktivierung von *ap* (gezeigt mittels *ap-lacZ*), vielmehr zeigten einige dorsale *omb* Überexpressionsklone eine Reduktion der *ap-lacZ*-Expression (Abb. 21; Anhang Abb. 77). Damit sprechen die vorgestellten Ergebnisse gegen eine Ap vermittelte Aktivierung von *caps* oder *trn* in *omb g-o-f* Klone.

Es gibt Hinweise darauf, dass Caps oder Trn exprimierende Klone ventraler Herkunft versuchen in das dorsale Kompartiment zu migrieren (Milán et al., 2001). Dementsprechend verschieben ventral lokalisierte Klone, die Caps oder Tartan exprimieren, häufig die *ap*-Expression (gezeigt mittels *ap-lacZ*) als auch die Wg-DV-Expression nach dorsal (Milán et al., 2001) – ohne aber in das dorsale Kompartiment einzuwandern. Caps und Trn exprimierende Klone, die vor Bildung der D/V-Grenze generiert wurden und die D/V-Grenze überlagern, zeigen eine Präferenz für das dorsale Kompartiment – d.h. sie besitzen einen wesentlich kleineren ventralen Anteil. Viele von diesen Klonen verzerren die Wg-DV-Expression nach dorsal (Milán et al., 2001).

Wenngleich die Möglichkeit besteht, dass in der pouch lokalisierte *omb* l-o-f Klone eine ektopische Expression von *caps* und *trn* bewirken, zeigten *omb* l-o-f Klone generell keine Präferenz für das dorsale Kompartiment (siehe 2.3). Ferner befinden sich *omb g-o-f* Klone gleichermaßen im D und im V-Kompartiment der pouch. Im Fall einer *caps*- und/oder *trn*-Expression in *omb* l-o-f Klonen (in der pouch) ist es denkbar, dass die von Caps und Trn vermittelte Zellaffinität einem anderen Mechanismus untergeordnet ist und/oder die Interaktion mit möglichen Signalpartnern (z.B. Zelloberflächenproteinen) gestört ist. Es wurde vorgeschlagen, dass Caps und Trn mit anderen Oberflächenproteinen interagieren, die im D-Kompartiment exprimiert werden (Milán et al., 2001; Milán et al., 2005).

Interessanterweise besitzen ventrale Caps und Trn exprimierende Klone Signaleigenschaften von ventralen Zellen (Milán et al., 2001). Diese Klone induzieren in benachbarten ventralen Zellen keine Wg-Expression – auch ist die Wg-DV-Expression normal, wo ventrale Klone mit dem D-Kompartiment in Kontakt stehen (Milán et al., 2001). In dieser Hinsicht unterscheiden sie sich von ventralen Ap sowie Fng exprimierenden Klonen, die dorsale Signaleigenschaften aufweisen (Panin et al. 1997; Fleming et al. 1997; Milán et al., 2001; Milán und Cohen, 2003).

Das im vorgestellten Model (Abb. 23) vorgeschlagene Migrationsverhalten von *omb* I-o-f Klonen – in das dorsale als auch in das ventrale Kompartiment einzuwandern – kann durch eine veränderte Caps oder Trn Aktivität nicht erklärt werden.

## 2.7 *pointed (pnt)*

Das Gen *pointed (pnt)* kodiert für zwei Isoformen, PntP1 und PntP2 (Klämbt, 1993). Phosphoryliertes PntP2 ist ein downstream Effektor des EGFR-Signalweges (Scholz et al., 1993) und in der frühen Flügelimaginalscheibe ist PntP2 für die Expression des EGF-Liganden *vein* notwendig. Nach Initiierung der *vein*-Expression wird diese durch eine positive Rückkopplungsschleife, welche durch PntP2 vermittelt wird, amplifiziert und aufrechterhalten (Paul et al., 2013). Als Teil dieser Rückkopplungsschleife ist der Vn/EGFR-Signalweg für die *vn*-Expression erforderlich (Wang et al., 2000). Die Expression von *pntP2* und *vein* ist am Ende des zweiten Larvenstadiums auf den proximalen (dorso-proximalen) Bereich der Flügelimaginalscheibe begrenzt. Zu diesem Zeitpunkt werden *pntP2* und *vein* auch in anderen Zelltypen exprimiert: *pntP2* in Myoblasten und *vein* in Trachealzellen (Paul et al., 2013). In der L3 Flügelscheibe wird *pntP2* fast ausschließlich in den Myoblasten exprimiert, während *vn* in epidermalen Zellen exprimiert wird (Paul et al., 2013). Damit ist deren Beziehung nur transient und PntP2 nur in der frühen Flügelscheibe für die Expression von *vein* notwendig (Paul et al., 2013).

Boisclair Lachance und Kollegen konstruierten ein Pnt-GFP-Transgen um die Protein Expression beider Isoformen von *pnt* (PntP1 und PntP2) zu visualisieren. In der L3 Flügelscheibe wird Pnt-GFP in einem Teil des Notums, in der dorsalen und ventralen hinge (genauer: in der dorsalen hinge, distal und proximal der H/H-Falte) und in einem kreuzartigen Streifenmuster in der pouch exprimiert (Boisclair Lachance et al., 2014). Damit ähnelt das Expressionsmuster in der pouch der Expression von *rhomboid (rho)*.

### 2.7.1 Systemischer *omb*-Verlust und *pnt-lacZ*-Expression

Die in dieser Arbeit verwendete *pnt-lacZ* Enhancer-Trap-Linie gab nur einen Teil der Pnt-GFP-Expression wieder (siehe Boisclair Lachance et al., 2014), sowohl in der Flügel- als auch in der Beinimaginalscheibe. In wildtypischen Flügelscheiben, konnte nur in späten L3 Flügelscheiben eine punktförmige Expression in der dorsalen hinge, distal und proximal der H/H-Falte, beobachtet werden (Abb. 32 C, D). In *I(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten L3 Flügelscheiben wurde hingegen keine *pnt-lacZ*-Expression in der dorsalen hinge festgestellt (Abb. 32 F-K). Die Hälfte der untersuchten *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben (4 von 8) zeigten eine ektopische *pnt-lacZ*-Expression im Zentrum der Scheibe (in der

distalen pouch)(Abb. 32 F-I), während die andere Hälfte der Flügelscheiben keine Expression erkennen ließen (Abb. 32 J-K).

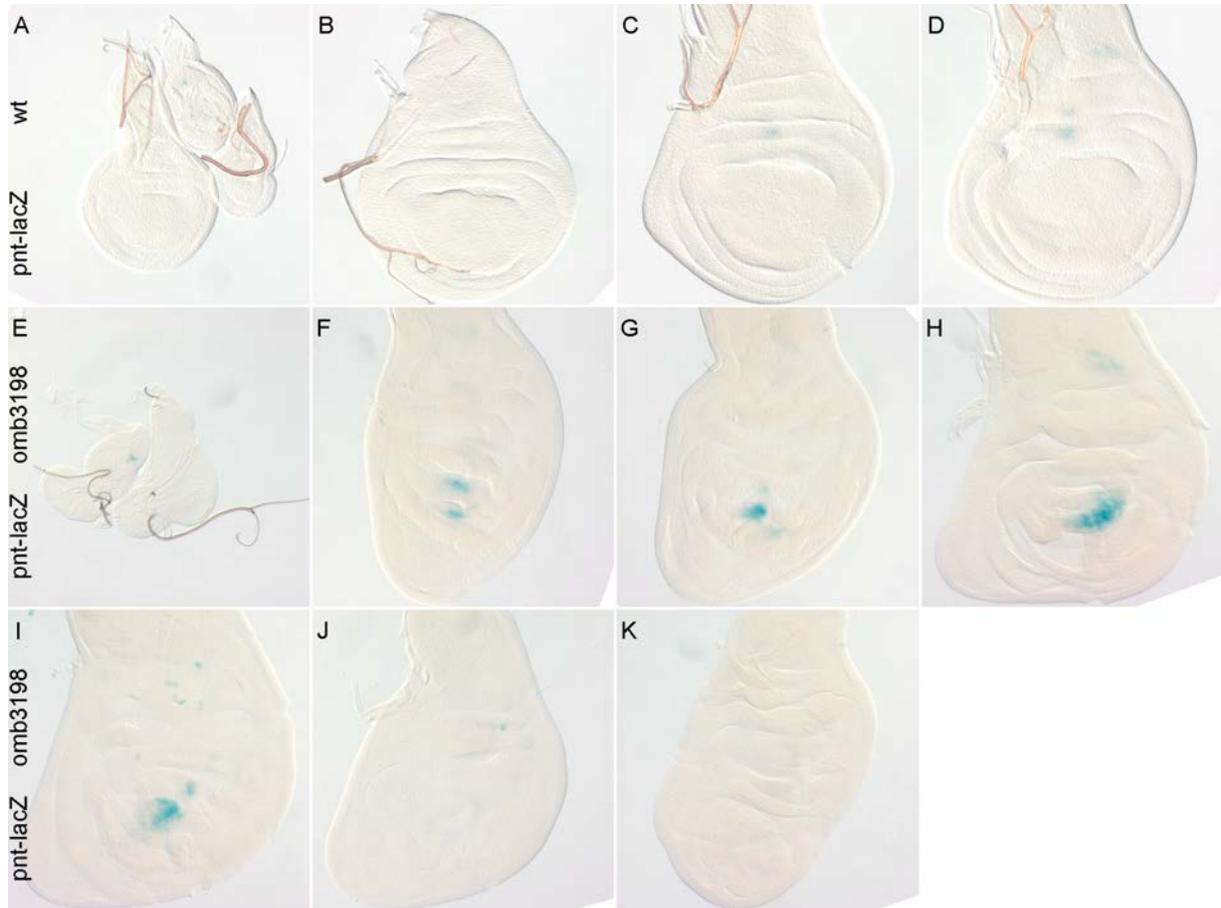


Abbildung 32 Expressionsmuster von *pnt-lacZ* in *wt* und *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Die *pnt-lacZ*-Expression in Flügelscheiben von wildtypischen (Kontrolle; A-D) und *I(1)omb<sup>3198</sup>* (E-K) Larven des dritten Larvenstadiums wurde mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. Dargestellt sind Flügelscheiben des frühen/mittleren (A, E) und späten (B-D, F-K) dritten Larvenstadiums. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. (C, D) In spätem L3 *wt* Flügelscheiben zeigte die *pnt-lacZ* Linie eine punktförmige Expression distal und proximal der H/H-Falte. (F-K) In *I(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten Flügelscheiben wurde keine *pnt-lacZ*-Expression in der dorsalen Hinge festgestellt. (F-I) In der distalen Flügelscheibe wurde *pnt-lacZ* ektopisch exprimiert.

## 2.8 *kekkon1 (kek1)*

In der Augen- und Flügelimaginalscheibe reguliert *kekkon1 (kek1)* die EGFR-Aktivität durch eine negative Rückkopplungsschleife (Ghiglione et al., 2003). Das *kek1* Gen kodiert ein Transmembranprotein, das sechs zusammenhängende Leucin-reiche Repetitionseinheiten (LRR; Leucine-Rich Repeats) und eine Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domäne enthält (Musacchio und Perrimon, 1996). Kek1 ist in der Lage mit dem EGF-Rezeptor Heterodimere (inaktive Komplexe) zu bilden, wodurch aktivierende Liganden daran gehindert werden an den Rezeptor zu binden (Ghiglione et al., 1999; Ghiglione et al., 2003). Die Aktivierung des EGF-Rezeptors induziert die Transkription von negativen Regulatoren, wie Kekkon1 und Argos, die infolgedessen den Wirkungsbereich der EGFR-Signalisierung einschränken. *kek1* wird in solchen Zellen induziert, die eine hohe und mittlere EGFR-Aktivierung erfahren (Shilo, 2005).

### 2.8.1 Systemischer *omb*-Verlust und *kek1-lacZ*-Expression

Die Expression von *kek1* wurde unter Verwendung einer Enhancer-Trap-Linie (*kek1-lacZ*) untersucht. Musacchio und Perrimon (Musacchio und Perrimon, 1996) zeigten, dass die *kek1-lacZ* Linie 15A6 die Expression des endogenen *kek1* Gens spiegelt. In der wildtypischen L3 Flügelscheibe wurde *kek1-lacZ* in der Intervenenregion zwischen der dritten und vierten Longitudinalvene exprimiert. In der hinge bildete die *kek1-lacZ*-Expression einen unvollständigen Ring, mit einer prominenten Unterbrechung im P-Kompartiment der dorsalen hinge (Abb. 33 A-C). In der dorsalen hinge war die Expression zusätzlich durch die H/H-Falte in eine distale und proximale Domäne unterteilt. In der ventralen hinge war die *kek1-lacZ*-Expression hingegen sehr schwach ausgeprägt (Abb. 33 A-C). Im Vergleich zur Kontrolle war in *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben keine Unterbrechung der *kek1-lacZ*-Expression in der dorsalen hinge festzustellen (Abb. 33 D-I). In späten L3 Flügelscheiben wurde zusätzlich eine Ausweitung der Expression, von der dorsalen hinge in die dorsale pouch, festgestellt (Abb. 33 F-I). Diese ektopische Expression von *kek1-lacZ* betraf vorwiegend die mediale Flügelscheibe. Die meisten späten L3 Flügelscheiben zeigten eine stark erhöhte *kek1-lacZ*-Expression in der anterior-ventralen hinge (Pleura) und eine ebenfalls starke ektopische Expression im Zentrum der Scheibe (vermutlich innerhalb der ventralen pouch) (Abb. 33 G-I).

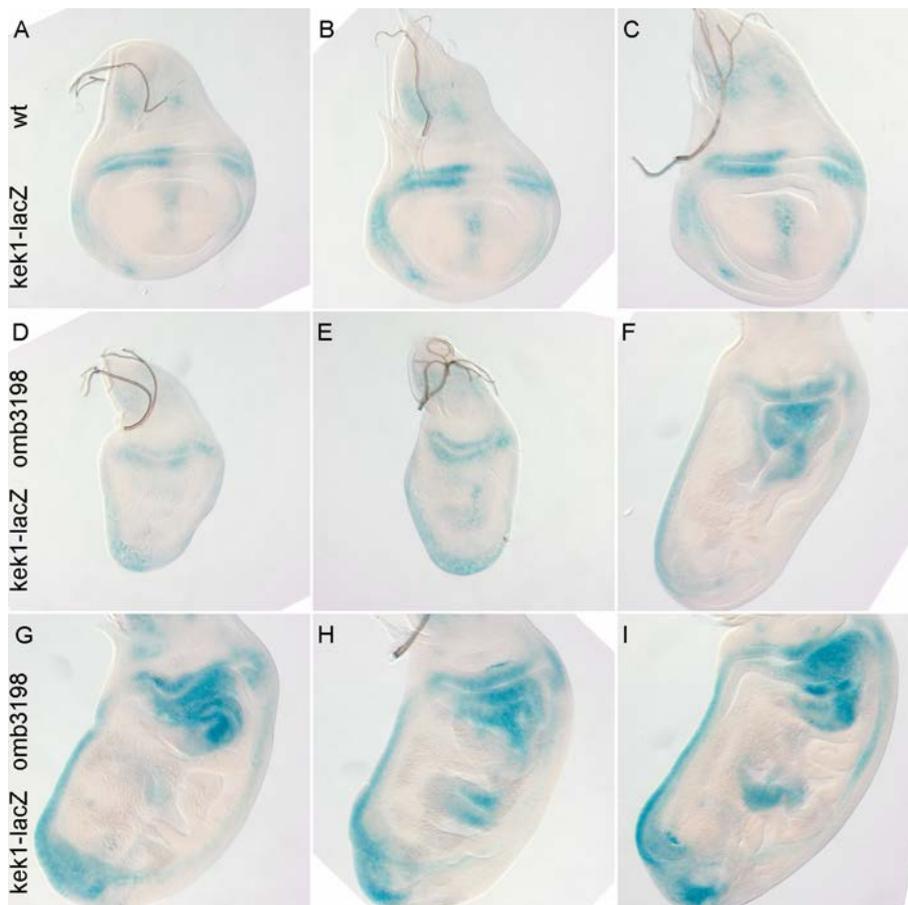


Abbildung 33 Expressionsmuster von *kek1-lacZ* in *wt* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
Die *kek1-lacZ*-Expression in Flügelscheiben von wildtypischen (Kontrolle; A-C) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (D-I) Larven des dritten Larvenstadiums wurde mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. Dargestellt sind Flügelscheiben des frühen/mittleren (D, E) und späten (F-I) dritten Larvenstadiums. In allen Bildern ist

anterior links und dorsal oben. (A-C) In *wt* Flügelscheiben weist die *kek1-lacZ*-Expression eine Unterbrechung in der dorsalen hinge auf. (D-I) In *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten Flügelscheiben war die *kek1-lacZ*-Expression in der dorsalen hinge geschlossen und in späten L3 Flügelscheiben in die dorsale pouch erweitert. (H-I) In der distalen Flügelscheibe wurde *kek1-lacZ* ektopisch exprimiert.

## 2.9 Diskussion: EGFR Signalaktivität

### EGFR-Signalwegaktivität in der pouch von *omb* Nullmutanten Flügelscheiben

Die Abhängigkeit der *kek1*-Expression von der EGFR-Aktivität in der L3 Flügelscheibe wurde bereits nachgewiesen. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Expression einer dominant-negativen Form des EGF-Rezeptors (MS1096-Gal4>UAS-DER<sup>DN</sup>) zu einer starken Reduzierung der *kek1*-Expression (visualisiert mittels *kek1-lacZ*) innerhalb der pouch von L3 Flügelscheiben führt (Ghiglione *et al.*, 2003). Umgekehrt resultiert die Expression einer aktivierten Form des EGF-Rezeptors (MS1096-Gal4>UAS- $\lambda$ top) in eine Erweiterung der *kek1-lacZ*-Expression in der pouch von L3 Flügelscheiben (Ghiglione *et al.*, 2003). MS1096-Gal4 treibt Expression in der dorsalen Hälfte der pouch (Capdevila und Guerrero, 1994).

Mit *kekkon1* (*kek1-lacZ*; Abb. 33) und *pointed* (*pnt-lacZ*; Abb. 32) werden in der distalen pouch von *omb* Nullmutanten Flügelscheiben zwei Faktoren ektopisch exprimiert, die über eine negative bzw. positive Rückkopplungsschleife den EGFR-Signalweg regulieren (Ghiglione *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2013). Da *kek1* und *pnt* als Reporter für die EGFR-Signalisierung fungieren, wurde geschlussfolgert, dass der *omb* Verlust zu einer ektopischen Aktivierung des EGFR-Signalweges in der dorsalen hinge und pouch führt. Nicht in allen untersuchten *omb* Nullmutanten Flügelscheiben wurde eine ektopische Expression von *kek1-lacZ* (bzw. *pnt-lacZ*) in der distalen pouch beobachtet (Abb. 33; Abb. 32). Es ist bekannt, dass *kek1* in Zellen induziert wird, die eine hohe EGFR-Aktivierung erfahren (Shilo, 2005). Dies könnte darauf hinweisen, dass nicht in allen *omb* Nullmutanten Flügelscheiben eine ausreichend starke ektopische EGFR-Signalisierung – in der medialen pouch – vorliegt um *kek1-lacZ* und *pnt-lacZ* zu aktivieren. Ferner unterscheiden sich in *omb* Nullmutanten Flügelscheiben, die ektopische Expression von *kek1-lacZ* (bzw. *pnt-lacZ*) von der ektopischen *ap*-Expression innerhalb der medialen pouch. Im Vergleich zu *kek1-lacZ* wird *ap* in einem weiteren Bereich exprimiert, sodass *ap* exprimierende Zellen große Domänen im V-Kompartiment bilden (Abb. 8). In der wildtypischen Flügelscheibe wird *ap* auch in Zellen exprimiert, die in Bereichen liegen, die nur niedrige Level an Vn aufweisen und folglich nur eine schwache Vn/EGFR-Signalisierung erhalten (Wang *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2013).

In *omb* Nullmutanten Flügelscheiben werden neben *ap* auch die Gene des *iro-C* fehlexprimiert. So konnte in der medialen pouch von *omb* Nullmutanten Flügelscheiben eine starke Aktivierung der *iro-C*-Genexpression (visualisiert mittels *mirr-lacZ*) nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2016). Da bekannt ist, dass der Vn/EGFR Signalweg sowohl die *ap* als auch die *iro-C*-Genexpression im dorso-proximalen Bereich der frühen Flügelimaginalscheibe induziert (Wang *et al.*, 2000; Zecca und Struhl, 2002a), liegt die Vermutung nahe, dass in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben ein aktivierender EGFR-Ligand – vermutlich Vn oder Spi – fehlexprimiert wird und eine ektopische EGFR-Signalisierung auslöst.

Sowohl Vn exprimierende Klone im D-Kompartiment von *vn* mutanten Flügelscheiben als auch Rho exprimierende Klone – welche als ektopische Quellen von aktivem Spi fungieren – in *vn* mutanten

oder wildtypischen Flügelscheiben bilden *ap* exprimierende Domänen, die mehrere Zelldurchmesser größer sind als der Klon (Zecca und Struhl, 2002a). Hierbei wird *ap* auch in einem Bereich mit niedrigerer EGFR-Signalisierung exprimiert. Wie an der normalen D/V-Kompartimentsgrenze, exprimieren die Zellen an der Grenze dieser ektopischen *ap* Expressionsdomäne ebenfalls *Wg* (Zecca und Struhl, 2002a). Solche Vn oder Rho exprimierende Klone zeigen auch einen nicht-zellautonomen Effekt auf die *iro-C*-Genexpression, jedoch wird die *Iro-C*-Expression in einem kleineren Bereich induziert und/oder aufrechterhalten (Zecca und Struhl, 2002a). Diese Ergebnisse passen zu der Annahme, dass ein Ligand des EGF-Rezeptors in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben fehlexprimiert wird, in dessen Folge vermutlich Zielgene des EGFR-Signalwegs, wie *ap* und *iro-C*, in der distalen Flügelscheibe fehlexprimiert werden.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass es in *omb* Nullmutanten Flügelscheiben zu einer Aktivierung des EGFR-Signalweges in der medialen pouch kommt. Dies spricht für eine repressive Wirkung von Omb auf die Signalaktivität des EGFR-Signalweges. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese werden in *omb* Nullmutanten Flügelscheiben *apterous* und die Gene des *Iro-C*, in der medialen pouch ektopisch exprimiert.

#### EGFR-Signalwegaktivität in der hinge von *omb* Nullmutanten Flügelscheiben

In *omb* Nullmutanten Flügelscheiben findet sich ektopische *iro-C*-Genexpression in der medialen pouch (Wang et al., 2016). Zusätzlich kann aber auch eine ektopische Expression in der dorsalen hinge – distal der H/N-Falte – festgestellt werden (Anhang Abb. 79 (Wang et al., 2016)). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung, wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben die EGFR-Signalisierung innerhalb der dorsalen hinge wie auch in der pouch deutlich erhöht ist, wie durch die Expression des EGFR-Signalweg Reporters *kek1* angezeigt (Abb. 33). Wang und Kollegen (Wang et al., 2000) untersuchten die Auswirkungen einer Fehlregulation der EGFR-Signalisierung in der Flügelimaginalscheibe. Hierbei zeigte sich, dass die Expression eines konstitutiv aktivem EGF-Rezeptors, innerhalb der *omb* Expressionsdomäne (*omb-Gal4/UAS-EGFR<sup>Δtop4.2</sup>*), zu einer Reduzierung der *Vg*-Expression in der pouch führt (Wang et al., 2000). Ferner wird auch bei klonaler Überexpression der aktivierten Form von EGFR (*UAS-EGFR<sup>Δtop4.2</sup>*) die *Vg*-Expression innerhalb des Klons reduziert (Wang et al., 2000). Desgleichen wurde in *omb* Nullmutanten Flügelscheiben (sowie in *omb l-o-f* Klonen) eine Reduzierung der *vgQE*-Aktivität in der pouch festgestellt (del Alamo Rodriguez et al., 2004; siehe 4.3.1). Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, kommt es in *omb* Nullmutanten Flügelscheiben zu einer Erweiterung der *Vg*-Expression von der anterioren D/V-Grenze in die dorsale hinge (weiße Pfeilspitzen in Abb. 44). Eine ähnliche Modulation der *Vg*-Expression in der anterior-dorsalen hinge kann auch nach EGFR-Hyperaktivierung in der *omb* Expressionsdomäne (*omb-Gal4/UAS-EGFR<sup>Δtop4.2</sup>*) festgestellt werden (Anhang Abb. 79 (Wang et al., 2000)). Morphologische Defekte, innerhalb der dorsalen hinge und der dorsalen pouch, wie in *omb* Nullmutanten Flügelscheiben beobachtet, sind mit einer EGFR-Hyperaktivierung in diesen Bereichen vereinbar (Anhang Abb. 79 (Wang et al., 2000)).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die veränderte Vg-Expression, wie sie durch EGFR-Hyperaktivierung in der *omb* Domäne erhalten wird (Anhang Abb. 79 (Wang et al., 2000)), weitgehend die Vg-Expression in *omb* Nullmutanten Flügelscheiben widerspiegelt; mit einer reduzierten Vg-Expression innerhalb der pouch und einer Erweiterung der Vg-Expression in die dorsale hinge. Dies steht im Einklang mit einer erhöhten und nach distal erweiterten EGFR-Signalisierung in der dorsalen hinge sowie einer erhöhten EGFR-Signalisierung in der pouch von *omb* Nullmutanten Flügelscheiben.

### 3 Einleitung: Omb-Funktion in der Flügelgelenkentwicklung (Thema 2)

#### 3.1 Entwicklung des Flügelgelenks bei *Drosophila*

Die Flügelentwicklung bei *Drosophila* ist einer der am besten untersuchten Prozesse der Entwicklungsbiologie. Die größten Anstrengungen richteten sich auf die Untersuchung der Wachstums- und Musterbildungsprozesse in der Flügelanlage der larvalen Flügelimaginalscheibe, aus der das spätere Flügelblatt entsteht. Zusätzlich zu der Flügelanlage (pouch) besitzt die Flügelimaginalscheibe auch die Anlage für einen Teil des Thorax (notum) und für das Flügelgelenk (hinge), welches das Flügelblatt mit der Körperwand verbindet. Das Flügelgelenk ist hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion weitaus komplexer als das Flügelblatt. Die vergleichsweise große Flügelfläche der adulten Flügel ist hauptsächlich auf die Streckung der Epithelzellen während der Metamorphose zurückzuführen (Fristrom et al., 1993). Die Regionen notum, hinge und pouch weisen in dem zweidimensionalen Anlagenplan der Flügelimaginalscheibe vergleichbare Größen auf (Bryant, 1975). Der von Bryant erstellte Anlageplan ergibt ein Flächenverhältnis von 0.35 : 0.32 : 0.33 (notum : hinge : pouch). Bei einer gleich großen Zelloberfläche, wie bei den Zellen des Hauptepithels der Flügelimaginalscheibe des dritten Larvenstadiums (L3) gegeben, erlaubt das Flächenverhältnis eine entsprechende Schätzung der Zellzahl. Die hinge von L3 Flügelimaginalscheiben weisen charakteristischerweise drei apikale und zwei basale Falten auf, welche die pouch umgeben (del Alamo Rodriguez et al., 2002). Experimentelle Hinweise sprechen dafür, dass die Gelenkanlage Einfluss auf die Entwicklung des Flügelblatts nimmt und für dessen Entstehung notwendig ist (Ng et al., 1995; Neumann und Cohen, 1996a).

Das Flügelgelenk wird gewöhnlich als eine Spezialisierung entlang der proximo-distalen (P-D) Achse untersucht, die sich vom proximal gelegenen Thorax zur distal gelegenen Spitze des Flügels erstreckt. Diese Betrachtungsweise ist gerechtfertigt, weil die meisten Gene, deren Funktion in der Gelenkentwicklung analysiert wurden, in der Flügelimaginalscheibe ein kreisförmiges Expressionsmuster (in der pouch) oder ein ringförmiges Expressionsmuster (in der hinge) aufweisen, deren Zentrum die künftige distale Flügelspitze entspricht (Abb. 34 B). Gene, welche die Gelenkentwicklung proximal beschränken, werden im Notum-Bereich der Flügelimaginalscheibe exprimiert.

Die anfängliche Unterteilung der Flügelimaginalscheibe in Notum und Flügelanlage wird durch die EGFR und Wg Signalwege vermittelt. Während des zweiten Larvenstudiums aktiviert der Vn/EGFR-Signalweg neben der *ap*-Expression (siehe 1.6 und 1.7) auch die Expression der Gene des *iroquois*-Komplexes (*iro-C*) in der proximalen Flügelimaginalscheibe (Wang et al., 2000; Zecca und Struhl, 2002a). Der *iroquois*-Komplex (*iro-C*) wird von den drei Genen *mirror* (*mirr*), *araucan* (*ara*) und *caupolican* (*caup*) gebildet, die für Proteine mit einer Homöodomäne kodieren (Gomez-Skarmeta et al., 1996). Ein Unterschied zwischen *ap* und *iro-C* besteht hinsichtlich der Ausdehnung ihrer Expressionsdomänen. Im Vergleich zu den *iro-C*-Genen induziert der Vn/EGFR-Signalweg *ap* anfänglich in einem viel größeren Bereich, der schließlich das gesamte dorsale Kompartiment füllt (Wang et al., 2000; Zecca und Struhl, 2002a). Im Gegensatz zur *ap*-Expression scheint für die Aufrechterhaltung der *iro-C*-Genexpression eine kontinuierliche EGFR-Signalisierung erforderlich zu sein (Zecca und Struhl, 2002a).

Den Genen des *iro-C* wird eine Selektor-ähnliche Rolle zugeschrieben (Cavodeassi et al., 1999, Diez del Corral et al., 1999, Wang et al., 2000). Die Expression dieser Gene, im proximalen Bereich der Flügelscheibe, ist für die Notum-Spezifikation essentiell, da – frühzeitig induzierte und proximal lokalisierte – Klone, die für *Iro-C* mutant sind, die Identität der dorsalen hinge annehmen (Diez del Corral et al., 1999). Die Gene des *iro-C* scheinen Zellen spezielle Affinitätseigenschaften zu verleihen, so besitzen Zellen die *Iro-C* ektopisch exprimieren eine unterschiedliche (also veränderte) Zellaffinität und lösen sich aus dem Zellverbund mit nicht-*iro-C* exprimierenden Zellen (Diez del Corral et al., 1999; Zecca und Struhl, 2002b). Distal begrenzt wird die Expression der *iro-C*-Gene durch den repressiven Einfluss von *msh* (muscle-segment homeobox, *Dr* – FlyBase) und *Dpp* (Cavodeassi et al., 2002; Villa-Cuesta und Modolell, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung der endogenen N/H-Falte in der proximalen Flügelimaginalscheibe die komplementäre Expression von *Omb* in der hinge und des *Iro-C* im Notum erfordert (Wang et al, 2016).

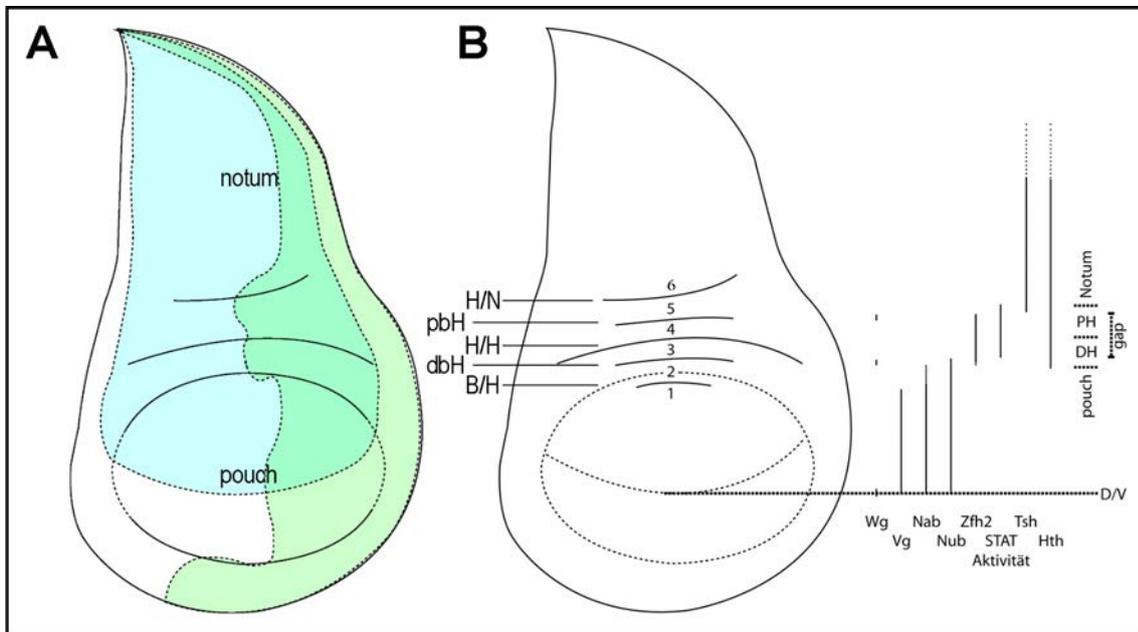


Abbildung 34 Expressionsmuster hinge-relevanter Gene

(A,B) schematische Zeichnung der Flügelimaginalscheibe des dritten Larvenstadiums. (A) dorsales Kompartiment: hellblau, posteriores Kompartiment: hellgrün. (B) Die drei apikalen Falten (B/H: Blade/Hinge, H/H: Hinge/Hinge, H/N: Hinge/Notum) und die beiden basalen Falten (dbH: distale basale Hinge, pbH: proximale basale Hinge) in der dorsalen hinge sind gekennzeichnet. Die Expressionsdomänen einiger Gene sind für die dorsale Flügelimaginalscheibe gekennzeichnet. dorsal ist oben und anterior ist links. D/V: D/V-Kompartimentgrenze; DH, distale hinge; PH, proximale hinge; gap: gap-Domäne. (A) verändert nach (Pflugfelder et al., 2017). (B) verändert nach (Terriente et al., 2008 und Ayala-Camargo et al., 2013).

## 4 Ergebnisse und Diskussion (Thema 2)

### 4.1 *decapentaplegic (dpp)*

Für die Etablierung und Aufrechterhaltung der A/P-Kompartimentsgrenze, in der Flügelimaginalscheibe, ist die Expression des posterioren Selektorgens *en* (und *inv*) als auch die Signalisierung von Hh und Dpp erforderlich (Morata und Lawrence, 1975; Blair und Ralston, 1997; Rodriguez und Basler, 1997; Dahmann und Basler, 2000; Shen und Dahmann, 2005).

#### 4.1.1 Systemischer *omb*-Verlust und *dpp-lacZ*-Expression

Die Expression von *dpp* wurde mittels einer Enhancer-reporter-Linie (*dpp-lacZ*) untersucht. Die Aktivität der Linie BS3.0 spiegelt die Expression von *dpp* in den Imaginalscheiben (Blackman et al., 1991). In der wildtypischen Flügelscheibe wird *dpp* in einem schmalen Streifen anteriorer Zellen entlang der A/P-Kompartimentgrenze exprimiert (Abb. 35 A).

In L3 Flügelscheiben der Serie *wt*, *bi*, *bi/omb*<sup>3198</sup> und *l(1)omb*<sup>3198</sup> erschien mit abnehmendem *Omb* Niveau sowohl die Expressionsstärke als auch der Expressionsbereich von *dpp-lacZ* in gleicher Weise verstärkt (Abb. 35; Abb. 37; Anhang Abb. 80 bis Abb. 83). In *l(1)omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben war stets eine prominente Erweiterung der *dpp-lacZ*-Expression in das anteriore Kompartiment der pouch feststellbar (Abb. 35 F; Abb. 37), wobei das Expressionsmuster im A-Kompartiment der pouch unregelmäßig erschien. In der pouch von *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben war die Ausdehnung der *dpp-lacZ*-Expression ebenfalls, wenn auch schwächer, erweitert (Anhang Abb. 81 und Abb. 82).

In der dorsalen hinge wurde die Position der apikalen und basalen Falten anhand der DAPI Kernfärbung bestimmt und für die Beschreibung der Expression herangezogen. Im Vergleich zu *wt* wurde in *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben des späten dritten Larvenstadiums eine verstärkte und/oder breitere *dpp-lacZ*-Expression in der dorsalen hinge, vor allem in Domäne 3 (zwischen der dbH- und H/H-Falte), festgestellt (Abb. 35; Abb. 36 B, C; Anhang Abb. 80 und Abb. 81). In *wt* war die Expression von *dpp-lacZ* in Domäne 3 schwächer und auf einen schmäleren Streifen begrenzt (Anhang Abb. 80), im Vergleich zur Expression in den anderen Domänen der dorsalen hinge. Relativ zur wildtypischen Positionierung war die *dpp-lacZ*-Expression bei *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben in Domäne 3 nach posterior erweitert (Abb. 35; Abb. 36 B, C; Anhang Abb. 80 bis Abb. 81).

In der dorsalen hinge von *l(1)omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben war das Expressionsmuster von *dpp-lacZ* teilweise unregelmäßig. In der ungefähren Höhe der Wg-OR-Expression (Domäne 4) war stets eine starke *dpp-lacZ*-Expression vorhanden (Abb. 35; Abb. 36 D; Abb. 37). In einigen Flügelscheiben war dies auch die einzige prominente Expression innerhalb der dorsalen hinge, wobei sowohl distal als auch proximal die *dpp-lacZ*-Expression reduziert oder auf einen schmalen Streifen (innerhalb der dorsalen hinge) begrenzt war (Abb. 37). Die prominente Expression in Domäne 4 war meist ungewöhnlich breit und anscheinend vorwiegend nach posterior erweitert.

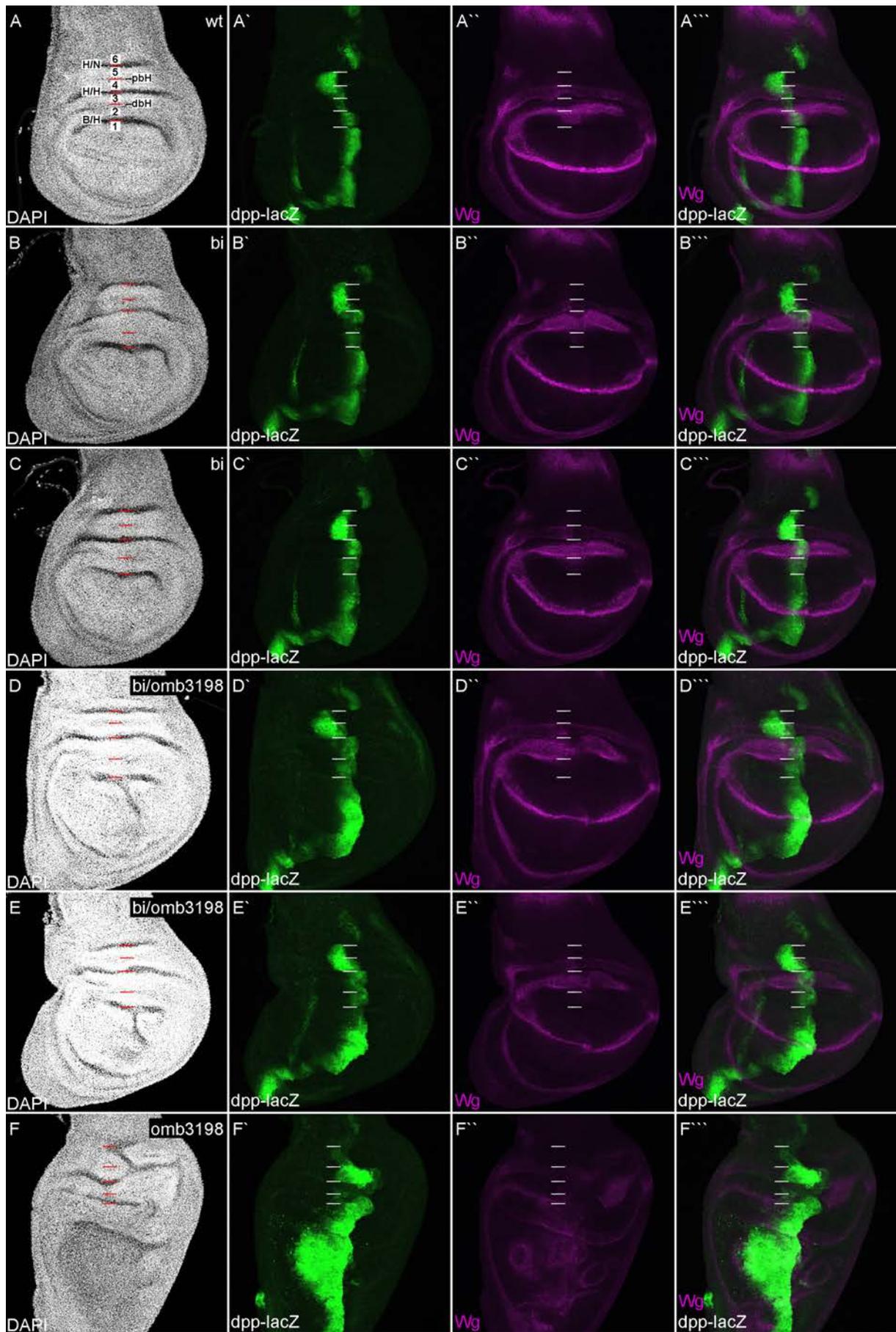


Abbildung 35 *dpp-lacZ*-Expression in *wt*, *bi*, *bi/omb*<sup>3198</sup> und *l(1)omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben

Dargestellt sind *wt* (A), *bi* (B, C), *bi/omb<sup>3198</sup>* (D, E) und *I(1)omb<sup>3198</sup>* (F) L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-F), *dpp-lacZ* (Grün; A'-F'), anti-Wg (Magenta; A''-F''), Überlagerung des *dpp-lacZ* und anti-Wg Signals (Grün, Magenta; A'''-F'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Die drei apikalen Falten (B/H, H/H, H/N) und die zwei basalen Falten (dbH, pbH) in der dorsalen Hinge sind markiert. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

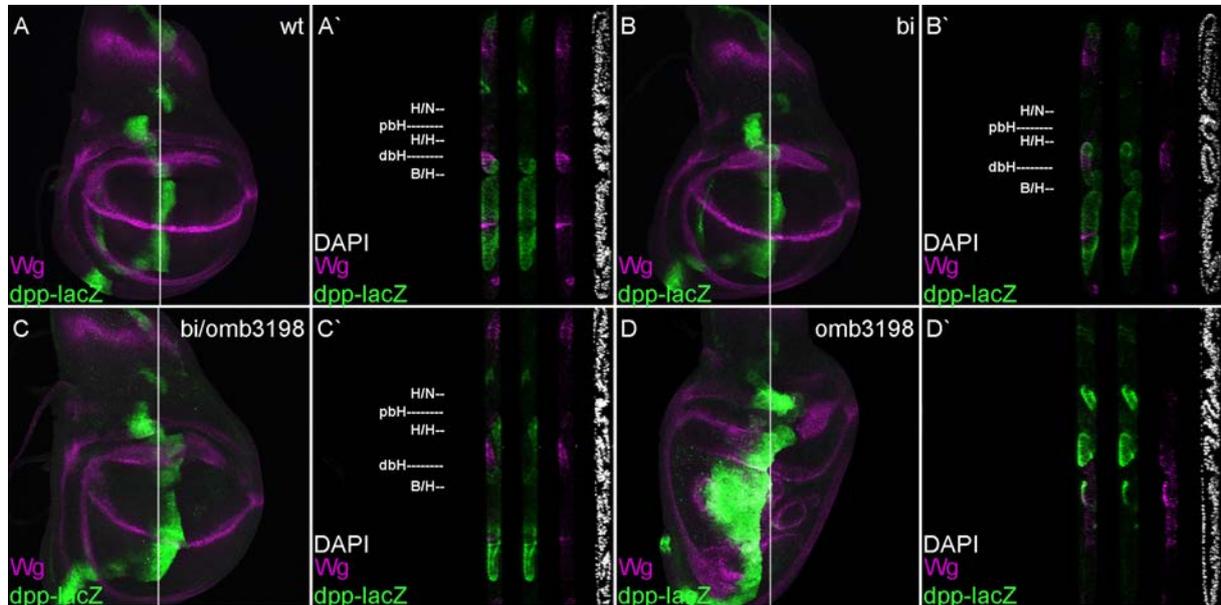


Abbildung 36 *dpp-lacZ*-Expression in XZ-Bildern von *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelimaginalscheiben. Dargestellt sind *wt* (A), *bi* (B), *bi/omb<sup>3198</sup>* (C) und *I(1)omb<sup>3198</sup>* (D) L3 Flügelimaginalscheiben. (A-D) Überlagerung des *dpp-lacZ* (Grün) und anti-Wg Signals (Magenta). In den Bildern (A-D) ist anterior links und dorsal oben, in den XZ-Bildern (A'-D') ist apikal links und basal rechts. Weiße Linien in A-D markieren Positionen der XZ-Schnitte in A'-D'. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

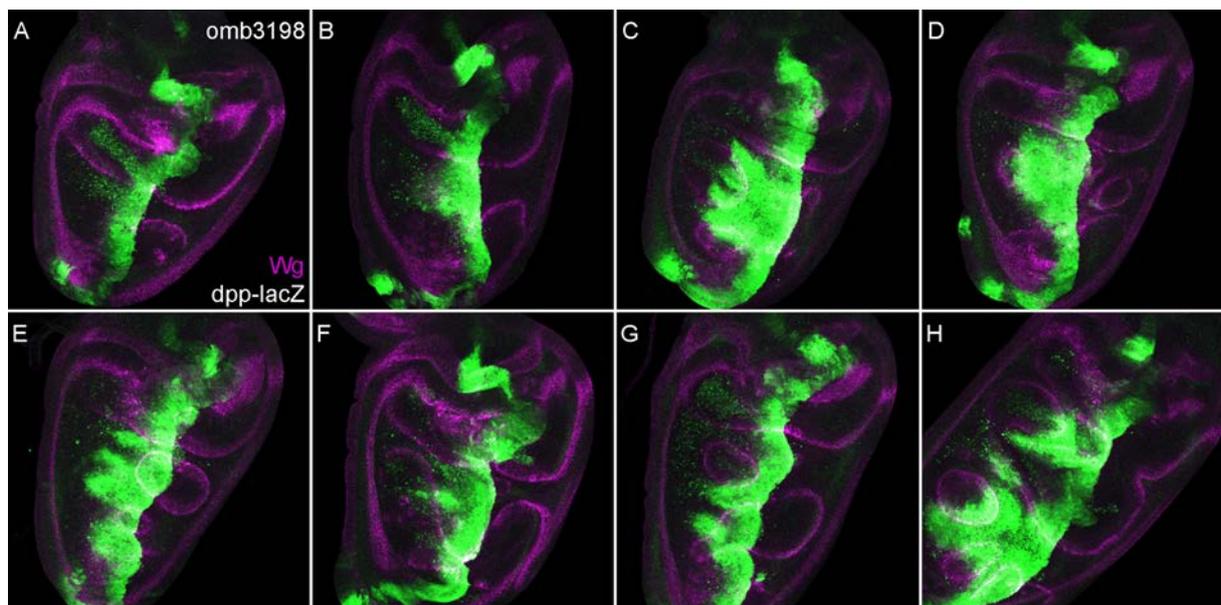


Abbildung 37 *dpp-lacZ*-Expression in *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelimaginalscheiben. Dargestellt sind *I(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelimaginalscheiben. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A-H) Überlagerung des *dpp-lacZ* (Grün) und anti-Wg Signals (Magenta). (A-H) Im A-Kompartiment der pouch ist ein unregelmäßiges Expressionsmuster von *dpp-lacZ* erkennbar. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

## 4.2 *wingless (wg)*

Im zweiten Larvenstadium wird *wingless (wg)* zunächst in einer distalen (anterior-ventralen) Domäne exprimiert, unter der Kontrolle des Hh-Signalwegs (del Alamo Rodriguez et al., 2002). Diese frühe *wg*-Expression ist für das Flügelschicksal von distalen Zellen der Flügelimaginalscheibe erforderlich (Morata und Lawrence, 1977b). Durch die kombinierte Wirkung der *Wg*- und *Dpp*-Signalwege werden dann die Gene des *elbow/no ocelli (el/noc)* Gen-Komplexes – *el* und *noc* kodieren Zink-Finger-Proteine mit identischen Expressionsdomänen – in der distalen Flügelscheibe aktiviert (Weihe et al., 2004). Anfänglich werden die beiden Gene *teashirt (tsh)* und *homothorax (hth)* in allen Zellen der Flügelimaginalscheibe exprimiert (Fasano et al., 1991; Rieckhof et al., 1997; Pai et al., 1998). Im zweiten Larvenstadium werden dann *tsh* und *hth* in der distalen Flügelscheibe durch *el* und *noc* reprimiert (Azpiazu und Morata, 2000; Casares und Mann, 2000; Wu und Cohen, 2002; Weihe et al., 2004). Die Zellen der distalen *el/noc* Expressionsdomäne bilden das Flügelblatt und die Gelenkregion des adulten Flügels wohingegen die *tsh* exprimierenden Zellen zur Körperwand werden (Wu und Cohen, 2002; Weihe et al., 2004).

Die frühe distale *wg*-Expression verschwindet und entlang der D/V-Kompartimentgrenze der Flügelscheibe – im künftigen Flügelrand – wird eine neue *wg* Expressionsdomäne gebildet, dabei wird *wg* durch den Notch-Signalweg aktiviert (Diaz-Benjumea und Cohen, 1995; Kim et al., 1995; Rulifson und Blair, 1995; de Celis et al., 1996; Doherty et al., 1996). An der D/V-Grenze ist *Wg* zum Einen an der Spezifizierung des Flügelrandes beteiligt und zum Anderen wirkt *Wg* entlang der D-V Achse der Flügelscheibe als weitreichendes Morphogen (long-range morphogen) an der Musterbildung der Flügelzellen mit und fördert die Zellproliferation der Flügelzellen (Phillips und Whittle, 1993; Diaz-Benjumea und Cohen, 1995; Zecca et al., 1996; Neumann und Cohen, 1997).

Innerhalb der hinge, in der späten L3 Flügelimaginalscheibe, wird *wg* in zwei konzentrischen Ring-Domänen exprimiert, im inneren Ring (IR) in der distalen hinge und im äußeren Ring (OR) in der proximalen hinge (Couso et al., 1993). Diese beiden ringförmigen Expressionsdomänen von *wg* (*wg*-IR- und *wg*-OR-Domäne) werden während des dritten Larvenstadiums nacheinander in der hinge etabliert (Williams et al., 1993; Neumann und Cohen, 1996a). Im frühen dritten Larvenstadium wird *wg* zunächst in der *wg*-IR-Domäne aktiviert. Die Aktivierung der *wg*-IR-Expression erfordert das Zinkfinger-Protein Rotund (Rn) (St. Pierre et al., 2002), das POU-Protein Nubbin (Nub) (Ng et al., 1995) und ein nicht-zellautonomes Signal, das von den angrenzenden *vg* exprimierenden Zellen stammt (Liu et al., 2000; del Alamo Rodriguez et al., 2002). Die *wg*-IR-Domäne wird distal durch *Nab* und *Dve* begrenzt (Neumann und Cohen, 1996a; Terriente Félix et al., 2007; Perea et al., 2013). Die Aufrechterhaltung der *wg*-Expression in der *wg*-IR-Domäne beruht auf einen autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus, der das Homöodomän-Protein Homothorax (Hth) erfordert (Azpiazu und Morata, 2000; Casares und Mann, 2000; del Alamo Rodriguez et al., 2002).

In der Mitte des dritten Larvenstadiums wird die *wg*-Expression in der *wg*-OR-Domäne durch *Zfh2* (Zinc finger homeodomain 2) aktiviert (Perea et al., 2009). Die *wg*-OR-Expression wird distal durch die Expression der Gene *el/noc* und *nub* begrenzt und proximal durch *tsh* (Perea et al., 2009). Später aktiviert *Wg* die Expression des *el/noc* Genkomplexes in der *wg*-OR-Domäne, was wiederum die anfängliche *wg* Aktivität reprimiert. Die Aufrechterhaltung der *wg*-Expression erfolgt in der *wg*-OR-Domäne durch eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife an der *Hth* beteiligt ist, wie auch in der

wg-IR-Domäne (Perea et al., 2009). Die wg-OR-Domäne markiert den am weitesten proximal gelegenen Bereich der hinge.

Die wg-Expression in der wg-IR-Domäne wird durch den *spade*-Enhancer (*wgspd*) kontrolliert. *Spade* mutanten (*wgspd*<sup>fg</sup>) Flügelimaginalscheiben fehlt daher die wg-IR-Expression (Neumann und Cohen, 1996a). Anders als in der *pouch* ist die *omb*-Expression in der hinge nicht von Wg abhängig (Grimm und Pflugfelder, 1996). In Übereinstimmung hiermit zeigte das *omb* Expressionsmuster nur eine geringfügige Beeinträchtigung in *wgspd*<sup>fg</sup> mutanten L3 Flügelimaginalscheiben (Anhang Abb. 84).

In der dorsalen und ventralen hinge überschneidet die *omb*-Expression die wg-IR- und wg-OR-Domäne sowohl in der larvalen als auch in der pupalen Entwicklungsphase. In dieser Arbeit wurde daher eine mögliche Abhängigkeit der wg-Expression – in der dorsalen hinge – von Omb untersucht.

#### 4.2.1 Systemischer *omb*-Verlust und Wg-Expression

Die *omb*-Expression überlappt im Zentrum der dorsalen hinge mit der wg-Expression in der wg-IR- und wg-OR-Domäne. In Abb. 38 (und Abb. 35 A`-F`) sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von L3 Flügelimaginalscheiben der Serie *wt*, *bi*, *bi/omb*<sup>3198</sup> und *l(1)omb*<sup>3198</sup> zu sehen. Weitere Abbildungen finden sich im Anhang (z.B.: Abb. 86 bis Abb. 91). Im Folgenden wird die Expression von Wg anhand der Immunfluoreszenzfärbung gegen das Wg-Protein beschrieben. In *wt* Flügelscheiben, des dritten Larvenstadiums, wurde mit zunehmendem Alter der Scheiben eine Zunahme der Intensität sowie der Ausdehnung der Immunfluoreszenz von Wg beobachtet (Anhang Abb. 86). Die deutlichste Zunahme fand in der Wg-IR-Domäne statt. Eine ähnliche entwicklungsabhängige Zunahme von Wg wurde auch in *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben beobachtet (Abb. 35 B-E; Anhang Abb. 87 und Abb. 88). In *omb* hypomorphen L3 Flügelscheiben konnte die Wg-IR-Expression im Zentrum der dorsalen hinge hingegen beeinträchtigt sein. So wurde in der dorsalen hinge von *bi/omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben häufig eine teilweise Reduktion der Wg-IR-Expression festgestellt (Abb. 35 D, E; Abb. 38 C). Dabei scheint die Wg-IR-Expression im distalen Bereich stärker beeinträchtigt als im proximalen Bereich und im P-Kompartiment stärker als im A-Kompartiment. In der dorsalen hinge von *bi* L3 Flügelscheiben wurde ein ähnlicher aber schwächerer Phänotyp festgestellt (Abb. 35 B, C).

Zusätzlich zu einer Reduktion der Wg-Expression in Teilen der Wg-IR-Domäne in *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben wurde mit abnehmendem Omb Niveau (in der Serie *wt*, *bi*, *bi/omb*<sup>3198</sup>) häufig eine verstärkte Ausdehnung der Immunfluoreszenz von Wg in beiden Ring-Domänen in der dorsalen hinge beobachtet (Abb. 35 A-E). Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei der Immunfluoreszenz gegen *Zfh2*, in *omb* hypomorphen L3 Flügelscheiben, festgestellt (Abb. 45). Vermutlich kann dieser Effekt auf eine Erweiterung der Falten der dorsalen hinge zurückgeführt werden. Morphologische Veränderungen in *omb* hypomorphen L3 Flügelscheiben, welche diesem Effekt zugrunde liegen könnten, werden in 4.8.1 erläutert.

Im Vergleich zu *wt* – wie auch zu *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup> – wurde in *l(1)omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben eine generelle Abnahme der Fluoreszenz-Intensität von Wg festgestellt (Anhang Abb. 91). In *l(1)omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben waren die beiden Wg-Ringe im Zentrum der dorsalen hinge häufig unterbrochen (Abb. 38 D). Bei der Wg-IR-Domäne war diese Unterbrechung meist stärker ausgeprägt und auch häufiger zu beobachten als bei der Wg-OR-Domäne.

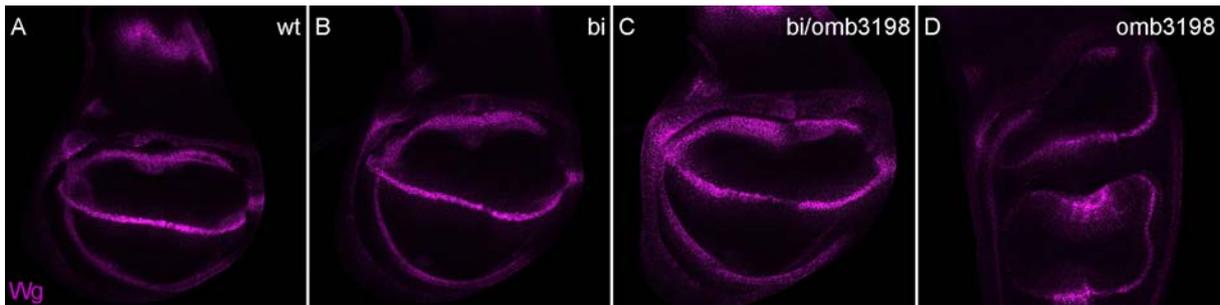


Abbildung 38 Wg-Expression in *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
 Immunfluoreszenzfärbung gegen Wg in L3 Flügelimaginalscheiben. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

Unter Verwendung einer Enhancer-Trap-Linie (*wg-lacZ*) wurde die *wg*-Expression auch in der zwar lethalen aber nicht völlig amorphen *l(1)omb<sup>15</sup>* Mutante (Shen et al., 2010) untersucht. Eine Unterbrechung im Zentrum der dorsalen Hinge zeigten 15 von 20 der L3 Flügelscheiben in der *wg*-IR-Domäne und nur 5 von 20 in der *wg*-OR-Domäne (nach X-Gal Färbung; nicht gezeigt).

#### 4.2.2 Klonaler *omb*-Verlust und Wg-Expression

Die Effekte von *l(1)omb<sup>44</sup>* mutanten Klonen (*omb* I-o-f Klone) auf die Wg-Expression waren in der dorsalen Hinge kompartimentspezifisch. Im P-Kompartiment lokalisierte *omb* I-o-f Klone verursachten einen teilweisen Verlust der *wg-lacZ* sowie eine starke Reduktion der Wg-Expression in der *wg*-IR-Domäne (Abb. 39; Abb. 40 B). Die Expression im proximalen Bereich der Domäne schien nicht betroffen zu sein, da an der proximalen Grenze der Wg-IR-Domäne eine streifenartige Expression verblieb. *omb* I-o-f Klone, welche die Wg-OR-Domäne überlagerten, zeigten keinen offensichtlichen Effekt auf die Wg-Expression (Abb. 39 B, C). Aufgrund der relativ schwachen Expression in der Wg-OR-Domäne ist eine Untersuchung dieser Domäne allerdings schwierig. Im A-Kompartiment lokalisierte *omb* I-o-f Klone hatten keinen erkennbaren Effekt auf die *wg-lacZ*- und Wg-Expression in der *wg*-IR- und/oder *wg*-OR-Domäne, innerhalb der dorsalen Hinge (Abb. 40).

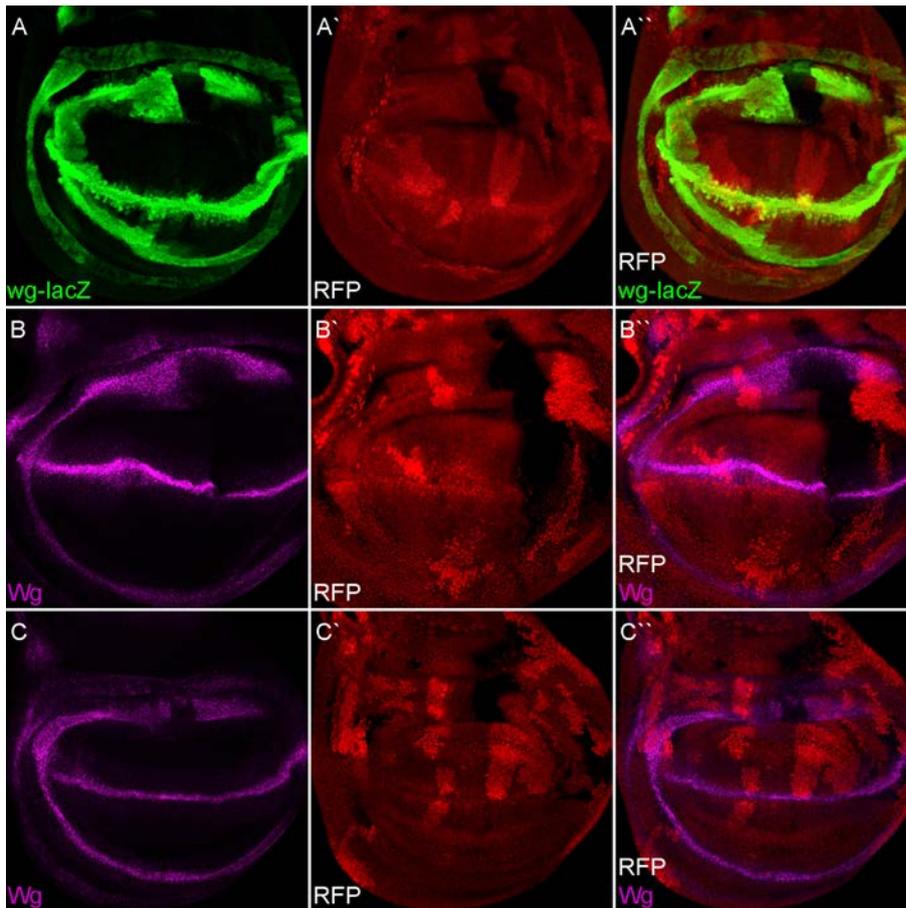


Abbildung 39 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *wg-lacZ*- und *Wg*-Expression  
 Gezeigt sind *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben. *wg-lacZ* (anti-β-Galaktosidase; Grün; A), anti-*Wg* (Magenta; B-C), mRFP (Rot; A'-B'), Überlagerung des *wg-lacZ* und mRFP Signals (Grün, Rot; A''), Überlagerung des anti-*Wg* und mRFP Signals (Magenta, Rot; B''-C''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. (A-C) Im P-Kompartiment lokalisierte *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone führten zum teilweisen Verlust der *wg-lacZ*- und *Wg*-Expression in der *wg*-IR-Domäne. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

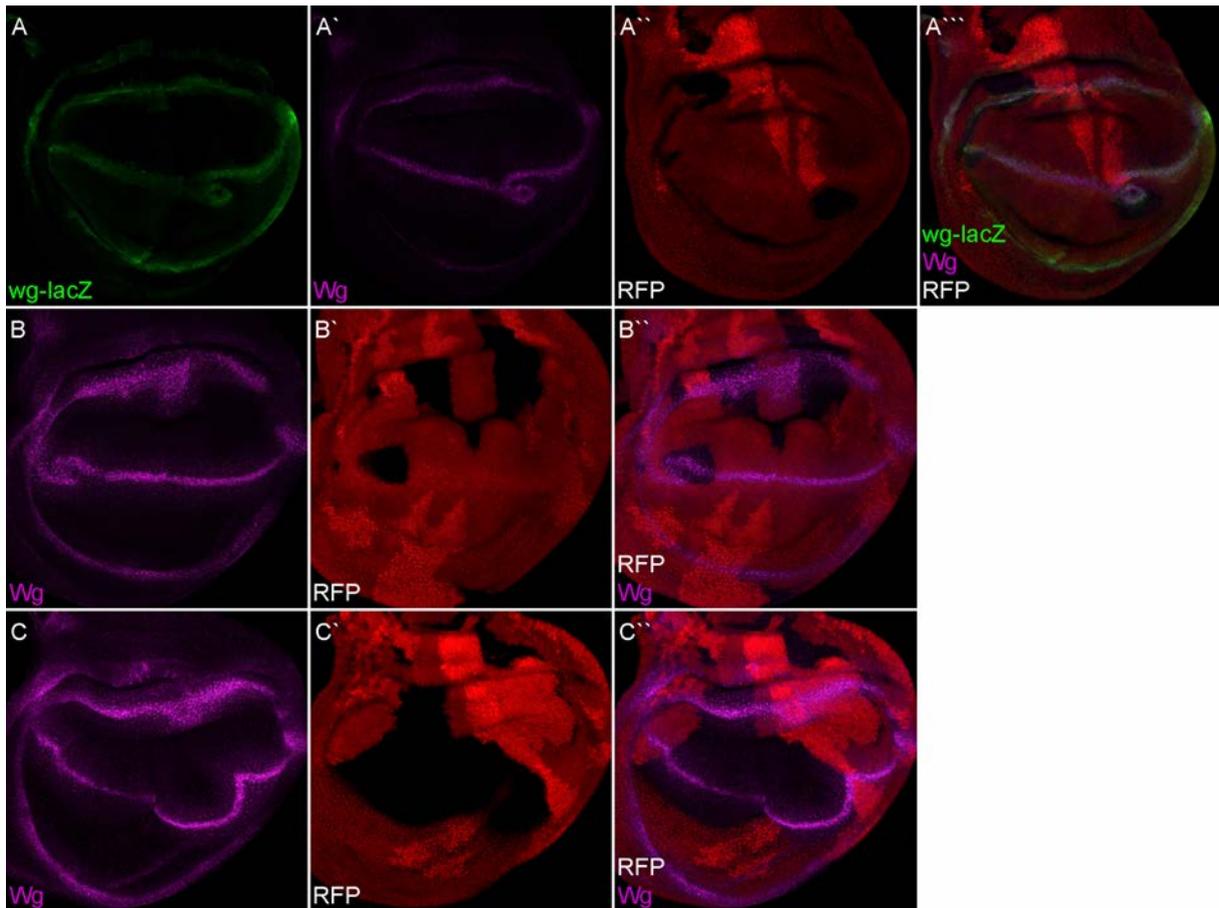


Abbildung 40 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *wg-lacZ*- und *Wg*-Expression  
 Gezeigt sind *I(1)omb<sup>44</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimagnalscheiben. *wg-lacZ* (Grün; A), anti-*Wg* (Magenta; A',B-C), mRFP (Rot; A'',B'-C''), Überlagerung des *wg-lacZ*, anti-*Wg* und mRFP Signals (Grün, Magenta, Rot; A'''), Überlagerung des anti-*Wg* und mRFP Signals (Magenta, Rot; B''-C''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. (A-C) In *I(1)omb<sup>44</sup>* mutanten Klonen, welche im A-Kompartiment die dorsale hinge kreuzten, wurde keine Modulation der *wg-lacZ*- und *Wg*-Expression in der *wg*-IR- und *wg*-OR-Domäne festgestellt. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 4.2.3 *omb*-Knockdown und *Wg*-Expression

Es wurden auch die Auswirkungen eines Knockdowns von *omb* mittels RNAi auf das *Wg* Expressionsmuster untersucht. Die Reduktion von *Omb* im P-Kompartiment (*en>ombRNAi*) resultierte ebenfalls in eine teilweise Reduktion der *Wg*-IR-Expression, in der dorsalen hinge (weiße Pfeile in Abb. 41). Nur im proximalen Bereich der *Wg*-IR-Domäne wurde eine schmale streifenartige Immunfluoreszenz gegen *Wg* detektiert (Abb. 41). In der *Wg*-OR-Domäne erschien die Immunfluoreszenz gegen *Wg* hingegen unverändert.

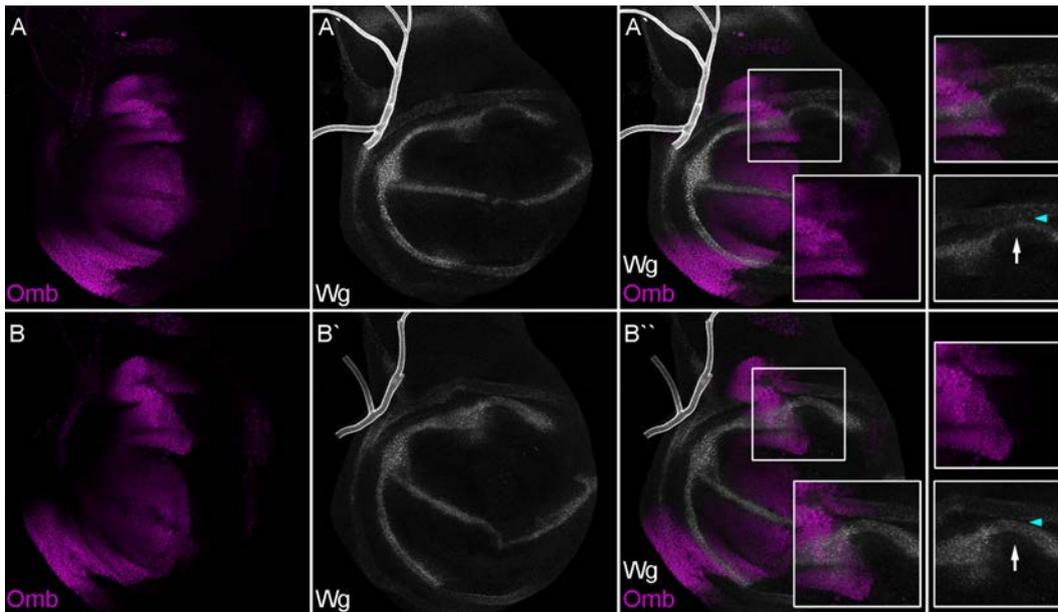


Abbildung 41 Effekte der Expression von *ombRNAi* auf die *Wg*-Expression

L3 Flügelimaginalscheiben des Genotyps *w; en>stingerGFP; UAS-ombRNAi* wurden nach 96h auf 29,8°C fixiert und gefärbt. anti-Omb (Magenta; A, B), anti-Wg (Weiß; A'-B'), Überlagerung des anti-Omb und anti-Wg Signals (Magenta, Weiß; A''-F''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A, B) RNAi gegen Omb zeigte in der *en*-Domäne eine deutliche Reduktion der durch Immunfluoreszenz nachweisbaren Omb Proteinmenge, im Vergleich zu Zellen des anterioren Kompartiments. (A'-B'') Im P-Kompartiment der dorsalen Hinge war die Immunfluoreszenz gegen Wg in der Wg-IR-Domäne reduziert (weiße Pfeile) und auch der Abstand zwischen der Wg-IR- und Wg-OR-Domäne erschien verringert (türkise Pfeilspitzen). Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl beim *omb* Knockdown (im P-Kompartiment) als auch in posterioren *omb* l-o-f Klonen ein verringerter Abstand zwischen der Wg-IR- und Wg-OR-Domäne in der dorsalen Hinge festgestellt wurde (türkise Pfeilspitzen in Abb. 41; Abb. 39). Ein ähnlicher Phänotyp – d.h. ein verminderter Abstand zwischen Wg-IR- und Wg-OR-Domäne – konnte auch in der dorsalen Hinge von *omb* hypomorphen (*bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup>) L3 Flügelscheiben beobachtet werden (Abb. 35; Abb 38; Abb. 45).

#### 4.2.4 *omb*-Überexpression und *Wg*-Expression

Die ektopische Expression von Omb in der *dpp*-Domäne führte zu einer Reduktion der Wg-IR-Expression in der dorsalen Hinge (weißer Pfeil in Abb. 42 A', B'), sowie zu einer Aktivierung von *wg* außerhalb der normalen *wg* Expressionsdomänen (weiße und türkise Pfeilspitzen in Abb. 42 A', B'). Interessanterweise wurde im Notum neben einer starken Immunfluoreszenz gegen Omb in der Dpp-Domäne auch eine schwächere flankierende Fluoreszenz von Omb beobachtet (Abb. 42 A, B). In Abbildung 42 sind zwei mittlere-späte L3 Flügelscheiben gezeigt die *omb* ektopisch in der *dpp*-Domäne exprimieren. Eine L3 Flügelscheibe zeigte eine ektopische streifenförmige *Wg*-Expression im Notum, an beiden Seiten der starken ektopischen Omb-Expression (weiße Pfeilspitzen in Abb. 42 B'), wobei diese flankierende *Wg*-Expression mit der Wg-OR-Domäne in Verbindung stand (Abb. 42 B'). Die *Wg*-D/V-Expression war in dieser Flügelscheibe reduziert (blauer Pfeil in Abb. 42 B'). Die zweite L3 Flügelscheibe zeigte hingegen keine Reduktion der *Wg*-D/V-Expression und nur eine

schwache ektopische Wg-Expression an den Seiten der *dpp*-Domäne innerhalb des Notums (Abb. 42 A`).

Im Notum der Flügelscheibe resultiert die ektopische Expression von *omb* in der Ausbildung eines zweiten Flügelpaares (Grimm und Pflugfelder, 1996). In Übereinstimmung damit, zeigten die untersuchten L3 Flügelscheiben ein ektopisches Wg Expressionsmuster im proximalen Bereich des Notums (Abb. 42 A, B).

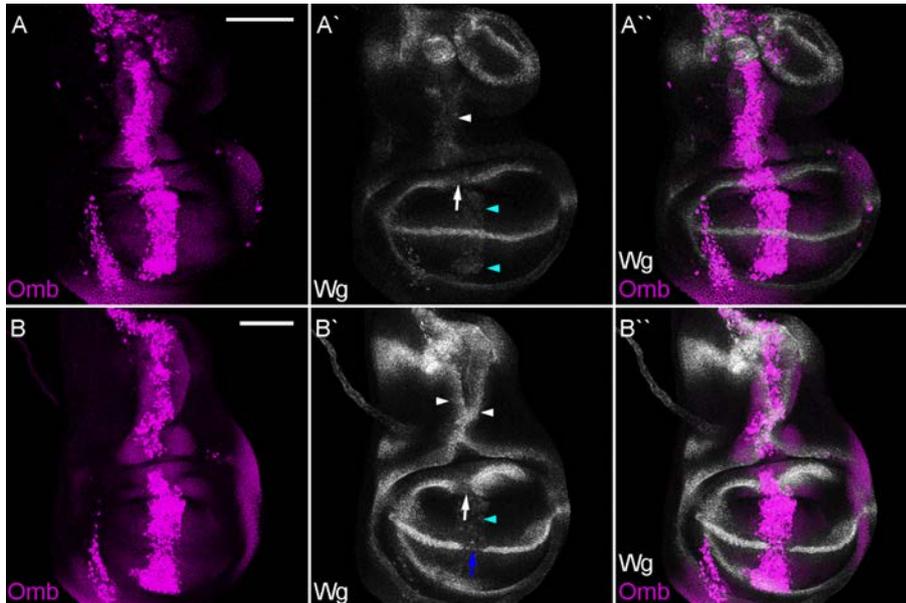


Abbildung 42 Effekte der Überexpression von Omb auf die Wg-Expression  
L3 Flügelimaginalscheiben des Genotyps *w; tub-Gal80ts/X-lacZ; dpp-Gal4/UAS-omb* wurden nach 72h auf 29°C fixiert und gefärbt. anti-Omb (Magenta; A, B), anti-Wg (Weiß; A`-B`), Überlagerung des anti-Omb und anti-Wg Signals (Magenta, Weiß; A``-B``). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A, B) Die ektopische Expression von Omb entlang der A/P-Kompartimentsgrenze resultierte in einer ektopischen Aktivierung von *wg* (visualisiert mittels Immunfluoreszenz gegen Wg) in der pouch (türkise Pfeilspitzen) und im Notum (weiße Pfeilspitzen). In der Wg-IR-Domäne (weißer Pfeil in A`, B`) und an der D/V-Grenze (blauer Pfeil in B`) war die Immunfluoreszenz gegen Wg reduziert. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 4.2.5 Klonale *omb*-Überexpression und Wg-Expression

Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurden *omb* Überexpressionsklone (*omb* g-o-f Klone) im ersten Larvenstadium generiert und in L3 Flügelscheiben analysiert. Die Expression von Wg wurde mittels einer Immunfluoreszenzfärbung gegen das Wg-Protein visualisiert, die Klone waren durch die Fluoreszenz von mRFP positiv markiert. In größeren *omb* g-o-f Klonen konnte eine verminderte Immunfluoreszenz gegen Wg in der Wg-IR-Domäne detektiert werden (weißer Pfeil in Abb. 43 A``, B``; Abb. 21), d.h. es erfolgte eine zellautonome Reduktion der Wg-IR-Expression.

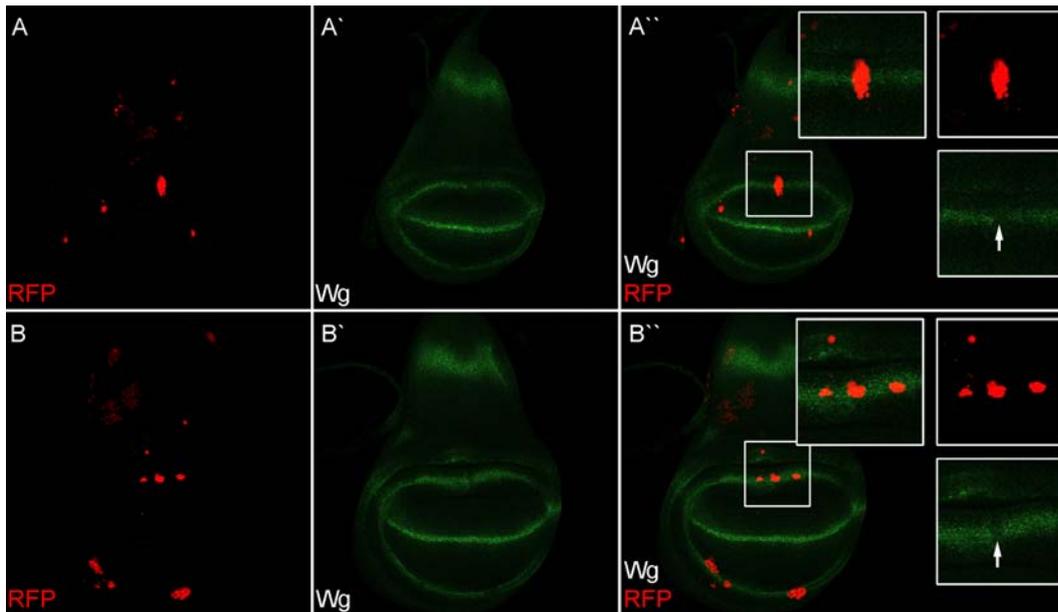


Abbildung 43 Effekte der klonalen *omb* Überexpression auf die *Wg*-Expression  
 mRFP (Rot; A, B) anti-*Wg* (Grün; A'-B'), Überlagerung des anti-*Wg* und mRFP Signals (Grün, Rot; A''-B''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Dargestellt sind L3 Flügelimaginalscheiben, in denen UAS-*omb* überexprimierende Klone im ersten Larvenstadium induziert wurden. Der Nachweis der Expression von UAS-*omb* in Zellklonen erfolgte durch Immunfluoreszenz gegen *Omb* (nicht gezeigt) und durch Coexpression von UAS-mRFP. (A, B) Die klonale Überexpression von UAS-*omb* führte zu einer zellautonomen Reduktion der *Wg*-IR-Expression (weiße Pfeile), im Zentrum der dorsalen Hinge. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

### 4.3 *vestigial* (*vg*)

Durch die Aktivität des Notch-Signalweges wird entlang der D/V-Grenze *vestigial* (*vg*) induziert (Kim et al., 1996). In der distalen Flügelscheibe aktiviert *Vg* (indirekt) die Expression einer Reihe von Genen, die für die P-D Flügelentwicklung erforderlich sind (Liu et al., 2000; del Alamo Rodriguez et al., 2002). Zu diesen Zielgenen von *Vg* zählen: *nubbin* (*nub*), *rotund* (*m*), *defective proventriculus* (*dve*), *nab* und *four-jointed* (*fj*) (Ng et al., 1995; St. Pierre et al., 2002; Koelzer und Klein, 2006; Terriente Félix et al., 2007; Cho und Irvine, 2004) (siehe Abb. 34 B). Die korrekte Expression von *Vg* und dessen Zielgenen – die als „pouch Gene“ in kreisförmigen Domänen unterschiedlicher Ausdehnung exprimiert werden – sind für die korrekte *wg*-Expression in der Hinge erforderlich. In der Flügelimaginalscheibe wird die *Vg*-Expression durch die beiden intronischen Enhancerelemente *vgBE* (*vestigial boundary enhancer*) und *vgQE* (*vestigial quadrant enhancer*) reguliert, die in komplementären Domänen aktiviert werden (Williams et al., 1994; Kim et al., 1996). Dabei ist die *Vg*-Expression über den *vgBE* von der Aktivität des Notch-Signalweges an der D/V-Grenze abhängig und wird entlang dieser Grenze aktiviert (Kim et al., 1996). Die Expression von *Vg* über den *vgQE* wird durch Notch indirekt inhibiert und durch die kombinatorische Wirkung der Dpp- und *Wg*-Signalwege, in den übrigen Zellen der pouch, aktiviert (Williams et al., 1994; Kim et al., 1996; Neumann und Cohen, 1996b; Certel et al., 2000).

*Vg* ist entscheidend für die Festlegung der Flügelidentität, sodass *vg* Nullmutanten kein Flügelblatt ausbilden und in der Flügelscheibe ein massiv vermindertes Wachstum aufweisen (Williams et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass in *omb* Nullmutanten Flügelimaginalscheiben – sowie in *omb*

mutanten Klonen – die *vg*QE-Expression (visualisiert mittels *vg*<sup>QE</sup>-*lacZ*) verloren geht (del Alamo Rodríguez et al., 2004). Die Ergebnisse von del Alamo Rodríguez und Kollgen deuten außerdem darauf hin, dass *omb* für die initiale Aktivierung der *vg*QE-Expression erforderlich ist, jedoch nicht für deren Aufrechterhaltung in der Flügelscheibe (del Alamo Rodríguez et al., 2004). Eine Beeinträchtigung der *vg*BE-Expression wurde in *omb* Nullmutanten Flügelscheiben hingegen nicht festgestellt (siehe del Alamo Rodríguez et al., 2004).

#### 4.3.1 Systemischer *omb*-Verlust und *Vg*-Expression

In der wildtypischen L3 Flügelscheibe zeigte die Immunfluoreszenz gegen *Vg* in der pouch eine abgestufte Färbung entlang der D-V Achse, mit der stärksten Färbung an der D/V-Grenze und der schwächsten Färbung im proximalen Bereich der pouch (Abb. 44 A). Außerhalb der pouch erstreckte sich die *Vg* Färbung entlang der D/V-Grenze; im P-Kompartiment entlang der gesamten D/V-Grenze (bis ins Notum) während im A-Kompartiment die Färbung etwa auf Höhe der H/N-Falte endete. In *l(1)omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben war die abgestufte *Vg*-Expression in der pouch nicht mehr detektierbar (Abb. 44 B-F). Die Expression entlang der D/V-Grenze blieb hingegen erhalten, jedoch erschien die *Vg* Färbung in der medialen pouch schwächer und schmaler als in den lateralen Bereichen. Im V-Kompartiment zeigte *Vg* ein variables und komplexes Färbemuster ähnlich dem von *Wg* (Abb. 44 B-F). Wie an der Immundoppelfärbung in Abb. 44 (B''-F'') zu sehen, war die Färbung von *Vg* und *Wg* hinsichtlich der Fluoreszenz-Intensität komplementär; die *Vg* Färbung war meist medial schwächer als lateral, dahingegen war die *Wg* Färbung lateral schwach und medial stärker. Außerhalb der pouch von *l(1)omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben kam es zur Modifikation der *Vg*-Expression im A-Kompartiment. So wurde eine Erweiterung der *Vg* Färbung von der D/V-Grenze nach ventral (genauer: in die anterior-ventrale hinge (Pleura)) beobachtet (weiße Pfeile in Abb. 44), als auch in die dorsale hinge (in der ungefähren Höhe der *Wg*-OR-Expression) (weiße Pfeilspitzen in Abb. 44).

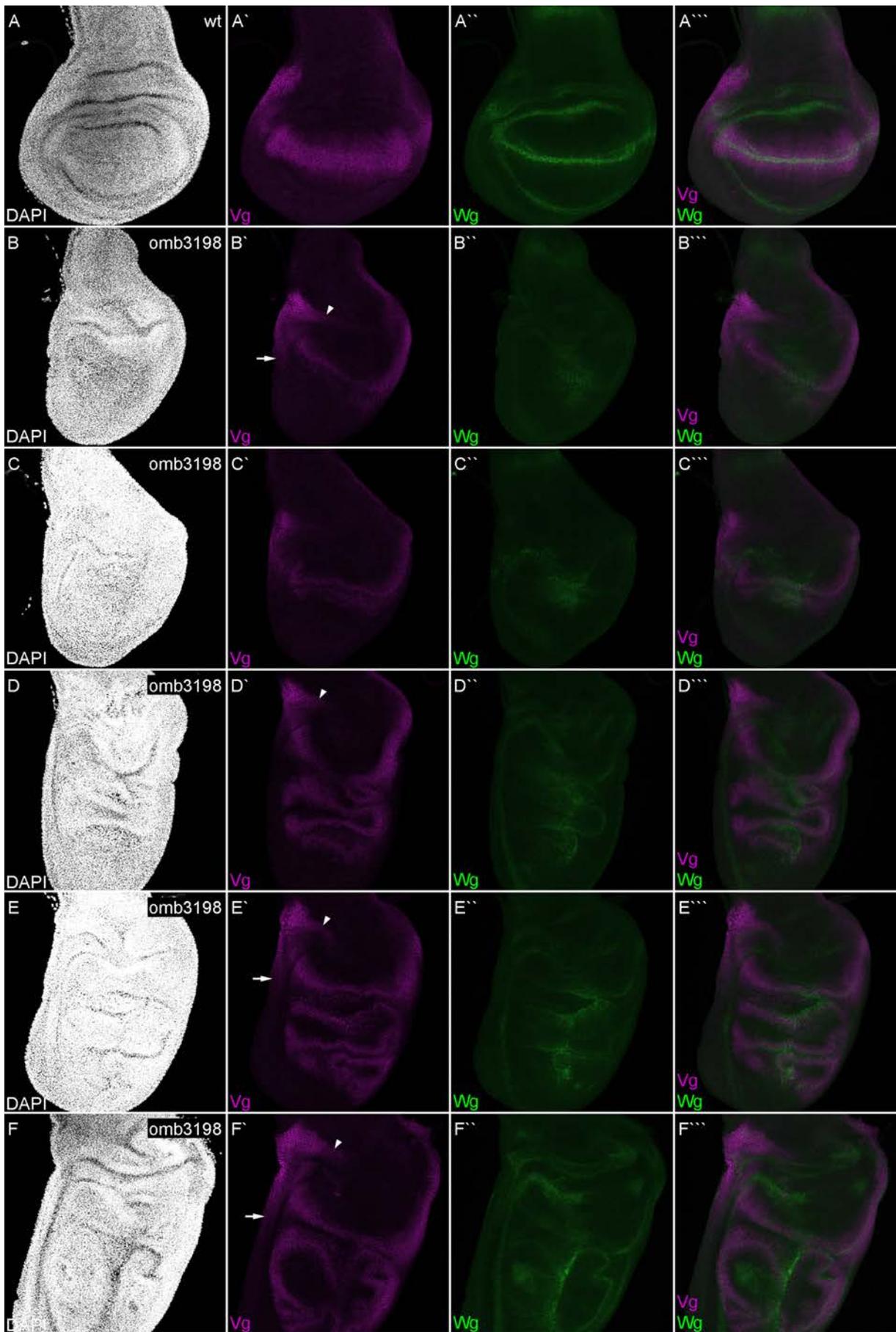


Abbildung 44 Vg- und Wg-Expression in *wt* und *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *wt* (A) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (B-F) L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-F), anti-Vg (Magenta; A'-F'), anti-Wg (Grün; A''-F''), Überlagerung des anti-Vg und anti-Wg Signals (Magenta, Grün; A'''-F'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 4.3.2 Diskussion: *vestigial* und *wingless*

Die Zielgene von Vg werden in konzentrischen Domänen unterschiedlicher Ausdehnung exprimiert, dabei entspricht der am weitesten distal gelegene Punkt der Flügelimaginalscheibe dem Mittelpunkt der Expressionsdomäne. In *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben konnte eine verminderte Vg-Expression an der D/V-Grenze, ein Verlust der vgQE-Aktivität in der dorsalen und ventralen pouch sowie eine Fehlexpression im V-Kompartiment der distalen Flügelscheibe nachgewiesen werden (Abb. 44). Ferner konnte in einer früheren Studie gezeigt werden, dass in *omb* mutanten Klonen die vgQE-Expression (visualisiert mittels *vg<sup>QE</sup>-lacZ*) verloren geht (del Álamo Rodríguez et al., 2004). Die Aktivierung von vgQE führt zur Vergrößerung der Expressionsdomäne von *vg* in der distalen Flügelscheibe (Zecca und Struhl, 2007a,b). Damit ist der Wirkungsbereich von Vg in der *omb* Nullmutanten Flügelscheibe wesentlich eingeschränkt.

Die Aktivierung der Wg-Expression in der Wg-IR Domäne verläuft in zwei Phasen: im frühen L3-Stadium erfolgt die initiale Aktivierung und anschließend die Aufrechterhaltung der Wg-IR-Expression. In *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben kam es zu einem Verlust der Wg-IR-Expression im Zentrum der dorsalen hinge, dabei zeigten bereits frühe-mittlere L3 Flügelscheiben diesen Phänotyp (siehe beispielsweise Anhang Abb. 89 bis Abb. 91). *omb* Nullmutante Klone, die vor Beginn der Wg-IR-Expression induziert wurden, verursachen einen teilweisen Verlust der Wg-IR-Expression (Abb. 39). Beides weist darauf hin, dass in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben bereits die initiale Aktivierung der Wg-IR-Expression (in der frühen L3 Flügelscheibe) beeinträchtigt ist. Die initiale Aktivierung der Wg-IR-Expression erfordert ein distales Signal von *vg* exprimierenden Zellen, das auf Zellinteraktionen zwischen den *vg* exprimierenden und nicht-*vg* exprimierenden Zellen basiert – also nicht-zellautonom wirkt (Liu et al., 2000; del Álamo Rodríguez et al., 2002). In *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben kam es zum Verlust der Vg-Expression in der vgQE-Domäne und gleichzeitig zum Verlust der Wg-IR-Expression im medialen Bereich der dorsalen hinge (Abb. 44). Dies lässt vermuten, dass in diesen Flügelscheiben das distale Signal – zumindest teilweise – gestört ist und es dadurch zu keiner normalen Wg Aktivierung im entsprechenden Bereich der wg-IR Domäne kommt. Hierzu passend zeigen *vg* Nullmutante Flügelscheiben, neben einer Reihe von Wg-Expressionsphänotypen, auch eine starke Beeinträchtigung der Wg-IR-Expression (Liu et al., 2000). *vg83b27R* ist ein Null-Allel von *vg* (Williams et al., 1991). Es wurde gezeigt, dass *vg83b27R* mutante Flügelscheiben eine einzelne Wg-Ringexpression aufweisen, die dem äußeren Ring von Wg zu entsprechen scheint (Liu et al., 2000). Die Wg-Expression im inneren Ring ist entweder nicht nachweisbar oder auf eine kleine punktförmige Expression, im Zentrum der distalen Flügelscheibe, reduziert (Cho und Irvine, 2004).

Sowohl in frühen-mittleren als auch in späten L3 *omb* Nullmutanten Flügelscheiben war die Wg-IR-Expression im medialen Bereich der dorsalen hinge unterbrochen. Möglicherweise verhindert der *Omb* Verlust sowohl die initiale Aktivierung als auch die Aufrechterhaltung der Wg-IR-Expression, in der dorsalen hinge. Dafür spricht, dass auch ein Verlust der *hth-lacZ*-Expression im Zentrum der dorsalen hinge nachgewiesen wurde (siehe 4.6.1; Abb. 49; Abb. 50 D). In den weiter lateral gelegenen

Bereichen der dorsalen hinge, war die verbleibende Expression von *Wg* und *hth-lacZ* weitgehend deckungsgleich (Abb. 50 D). In der hinge aktiviert *Wg* die Expression von *hth* und *Hth* ist wiederum erforderlich um die *Wg*-Expression in der hinge zu erhalten (Casares und Mann, 2000; del Álamo Rodríguez et al., 2002).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine normale *omb*-Expression in der Flügelscheibe erforderlich ist um die Aktivierung der *Wg*-IR-Expression innerhalb der dorsalen hinge zu gewährleisten. Möglicherweise erfolgt diese Einflussnahme indirekt über die Expression von *Vg* (innerhalb der pouch) wodurch eine distale Signalisierung ermöglicht wird.

#### 4.4 *zinc finger homeodomain-2 (zfh2)*

Im Verlauf der Larvalentwicklung wird das gelenkspezifische Gen *zfh2* (*zinc finger homeodomain-2*), in der Flügelimaginalscheibe, in einem dynamischen Muster exprimiert (Whitworth und Russell, 2003). In der Mitte des zweiten Larvenstadiums wird *zfh2* anfänglich durch *Wg* und *Dpp* aktiviert und in einer ausgedehnten distalen Domäne exprimiert (Whitworth und Russell, 2003). Im späten zweiten Larvenstadium, nach Etablierung der D/V-Kompartimentsgrenze, wird die *zfh2*-Expression durch den repressiven Einfluss von *Vg* und *Nub* distal reprimiert und ab dem frühen dritten Larvenstadium auf eine breite ringförmige Domäne in der hinge begrenzt (Whitworth und Russell, 2003; Terriente et al., 2008). Im dritten Larvenstadium besitzt *zfh2* ein ringförmiges Expressionsmuster das vollständig die *wg*-IR- und *wg*-OR-Domäne überlagert (Whitworth und Russell, 2003). Die Repression von *zfh2* in der distalen Flügelscheibe ist entscheidend für die Aktivierung von Genen die distal exprimiert werden, einschließlich: *nab*, *defective proventriculus (dve)* und *four jointed (fj)* (Perea et al., 2013). Die ektopische Expression von *Zfh2* in der pouch, verursacht die Repression mehrerer Flügelrelevanter Gene (*nub*, *nab*, *dve*, *fj*) sowie eine Reduktion der Flügelfläche und des Flügelgelenks, möglicherweise durch Störung des *Yki* Signalweges (Perea et al., 2013). Die *Zfh2*-Expression in der hinge ist erforderlich um die Expression von *nab* und *dve* zu reprimieren und auf die distale Flügelscheibe zu begrenzen (Terriente et al., 2008). In der hinge wird die *wg*-IR-Expression in einem Ring von Zellen aktiviert die *nub* und *m* exprimieren aber kein *nab* und *dve*. Der Verlust der *Zfh2*-Expression führt zur Erweiterung der *nab*- und *dve*-Expression nach proximal (in die hinge) – sodass die Expression von *nab*, *dve*, *m*, und *nub* innerhalb der gleichen Domäne exprimiert werden – infolgedessen wird die Aktivierung der *wg*-IR-Expression (durch *Rn*) reprimiert (Terriente et al., 2008). Die hypomorphe Mutante *Zfh2MS209* trägt eine P-Element-Insertion im ersten Intron der *zfh2* Transkriptionseinheit. In *Zfh2MS209* homozygot mutanten L3 Flügelscheiben bleiben die *wg*-IR- und *wg*-OR-Domäne erhalten, während das zwischen liegende Gewebe verloren geht. Aufgrund des Gewebeverlustes, kommt es im adulten Flügel zur Stauchung der Gelenkregion entlang der proximo-distalen Achse (Whitworth und Russell, 2003). Im Gegensatz zum *bifid* Phänotyp weist der *Zfh2MS209* Phänotyp jedoch keine Fusion der proximalen Venenstränge auf.

##### 4.4.1 Systemischer *omb*-Verlust und *Zfh2*-Expression

Die Expression von *Zfh2* wurde mittels Immunfluoreszenz gegen *Zfh2* visualisiert. In der hinge von L3 Flügelscheiben wurde *Zfh2* in einer breiten ringförmigen Domäne nachgewiesen (Abb. 45 A). Anhand der drei apikalen (B/H, H/H, H/N) und zwei basalen (dbH, pbH) Falten kann man die *Zfh2*-Expression

in der dorsalen hänge in drei Bereiche unterteilen (siehe Abb. 45 A und zugehörige Beschreibung) – diese entsprechen den Domänen 2 bis 4. Im Vergleich zu *wt* wurden in *bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben nur geringe Unterschiede im Expressionsmuster von *Zfh2* festgestellt (Abb. 45 B-D). Allerdings war in den *omb* hypomorphen (*bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>*) Flügelscheiben das Expressionsminimum im Zentrum der dorsalen hänge (Domäne 3 und 4) weniger stark ausgeprägt als in *wt* (Anhang Abb. 85 bis Abb. 88). Mit abnehmendem *Omb* Niveau (in der Serie *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>*) erfolgte eine Zunahme der Fluoreszenz-Intensität von *Zfh2* in der dorsalen und ventralen hänge (Anhang Abb. 85 bis Abb. 88). Gleichzeitig zeigte sich eine stärkere Ausdehnung der Immunfluoreszenz von *Zfh2* in den als Maximalprojektionen von Z-Bildstapeln dargestellten Fluoreszenzbildern (Abb. 45, Anhang Abb. 85 bis Abb. 88). In der Serie *wt*, *bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>* ähneln sich die Immunfluoreszenzfärbungen von *Zfh2* und *Wg* (*Wg*-IR sowie *Wg*-OR) in der dorsalen hänge hinsichtlich ihrer Ausdehnung und Intensität (Anhang Abb. 85 bis Abb. 88).

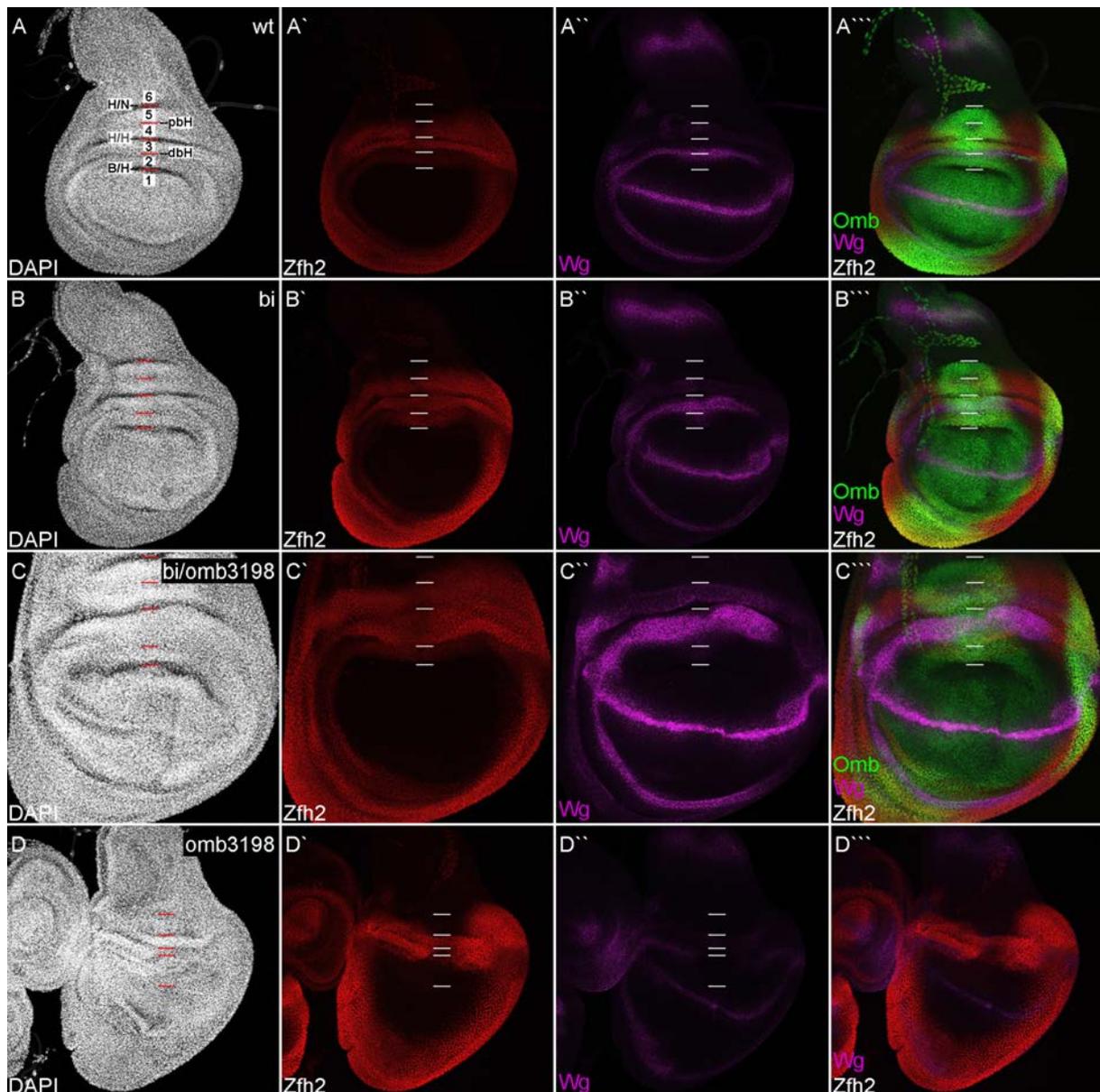


Abbildung 45 *Zfh2*-Expression in *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *wt* (A), *bi* (B), *bi/omb<sup>3198</sup>* (C) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (D) L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-D), anti-Zfh2 (Rot; A'-D'), anti-Wg (Magenta; A''-D''), Überlagerung des anti-Zfh2, anti-Wg und anti-Omb Signals (Rot, Magenta, Grün; A'''-D'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Die drei apikalen Falten (B/H, H/H, H/N) und die zwei basalen Falten (dbH, pbH) in der dorsalen hinge sind markiert. Die mediale Abschwächung der Zfh2-Expression in der dorsalen Gelenkanlage in *wt* (A'), war in *bi* (B') und *bi/omb<sup>3198</sup>* (C') Flügelscheiben nicht oder weniger stark ausgeprägt. Dies gilt auch für den proximal der pbH-Falte gelegenen Bereich in *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten Flügelscheiben (D'). (D) Die Zfh2-Expression zwischen der B/H- und dbH-Falte war in *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten Flügelscheiben nicht mehr nachweisbar und zwischen der H/H- und dbH-Falte medial stark reduziert, in einigen Fällen auch unterbrochen. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

Um zu überprüfen ob morphologische Unterschiede zwischen *omb* hypomorphen (*bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>*) und *wt* Flügelscheiben für eine entsprechende Ausdehnung der Immunfluoreszenz (in *bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>*) verantwortlich sind, wurden XZ-Bilder – entlang der D-V Achse – von Maximalprojektionen hergestellt und analysiert. (nicht gezeigt). Die Ergebnisse hierzu werden in 4.8.1 erläutert. Die Auswertung der XZ-Bilder ergab – ohne hier 4.8.1 vorgreifen zu wollen – hinsichtlich der Immunfluoreszenz von Zfh2 folgendes: Während in der *wt* Flügelscheibe die Falten eine relativ gleichmäßige Auffaltung des Hauptepithels bewirkten, zeigten *bi* und im stärkeren Ausmaß *bi/omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben, in der dorsalen hinge, eine Erweiterung der Falten an deren Scheitel. Dies bewirkte wiederum eine Überlagerung des Hauptepithels im Bereich der Falten, vermutlich verstärkt durch Einbettung der Präparate zwischen Objektträger und Deckgläschen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde gefolgert, dass die Verbreiterung der Zfh2 Domäne in der dorsalen hinge von *bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben (Abb. 45), zumindest teilweise, auf eine Erweiterung der Falten zurückgeführt werden kann. Gleiches wird auch für die Wg-IR- und Wg-OR-Domäne angenommen.

In *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben wurde eine starke Beeinträchtigung der Zfh2-Expression in der dorsalen hinge festgestellt (Abb. 46 B; Anhang Abb. 89 bis Abb. 92). In späten L3 *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben betraf dies vorwiegend den distal der H/H-Falte gelegenen Bereich (Domäne 2 und 3) und zeigte sich in einer medialen Reduzierung oder Unterbrechung der zwischen der H/H- und dbH-Falte lokalisierten Expression (Domäne 3) sowie einem völligen Fehlen der Expression distal der dbH-Falte (Domäne 2) (Anhang Abb. 91 und Abb. 92). Ein Verlust der Zfh2-Expression zwischen der pbH- und H/H-Falte (Domäne 4) wurde nur in wenigen mittleren-späten L3 *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben beobachtet (Abb. 46 B). Die Immundoppelfärbung zeigte eine gewisse Korrelation zwischen der Zfh2- und Wg-Expression in der dorsalen hinge. So wurde bei einer Unterbrechung der Wg-IR-Expression gleichfalls eine mediale Reduzierung der Zfh2-Expression distal der H/H-Falte (Domäne 2 und 3) festgestellt (Anhang Abb. 91 A, B). Bei einer gleichzeitigen Unterbrechung der Wg-IR- und Wg-OR-Expression war die Zfh2-Expression im entsprechenden Bereich (Domäne 2, 3 und 4) vollständig unterbrochen (Abb. 46 B).

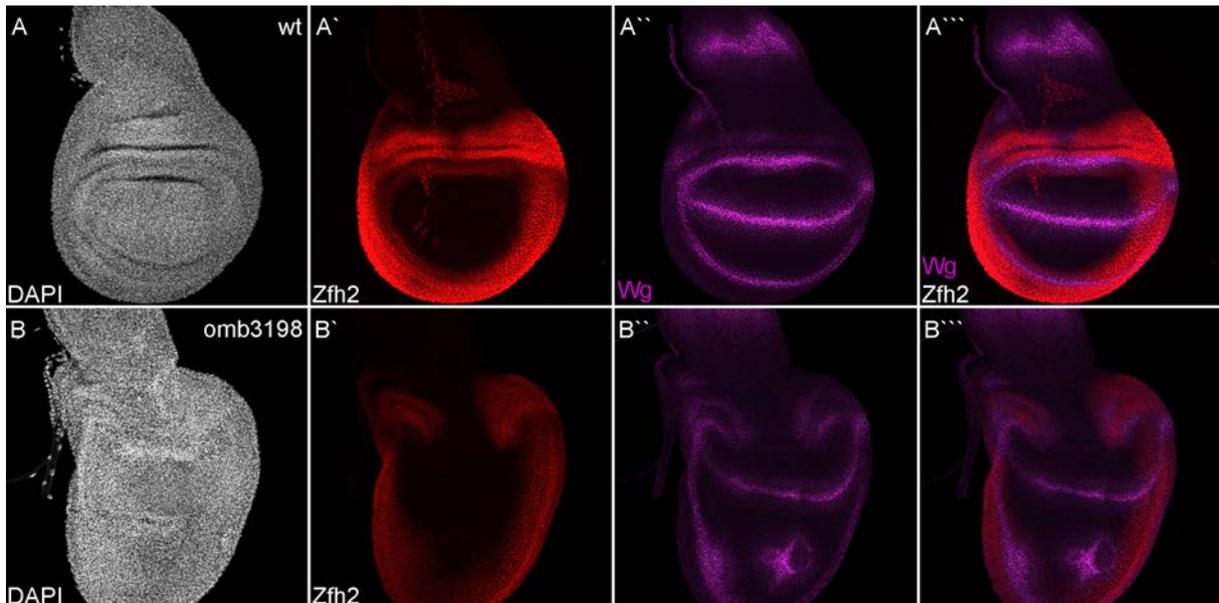


Abbildung 46 Zfh2- und Wg-Expression in *wt* und *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheibe  
 Dargestellt sind *wt* (A) und *I(1)omb<sup>3198</sup>* (B) L3 Flügelimaginalscheibe. DAPI (Weiß; A,B), anti-Zfh2 (Rot; A',B'), anti-Wg (Magenta; A'',B''), Überlagerung des anti-Zfh2 und anti-Wg Signals (Rot, Magenta; A''',B'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

Bemerkenswert ist, dass in jüngeren L3 *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben Zfh2 im medialen Bereich der dorsalen Hinge entweder nur schwach und in einem schmalen Bereich exprimiert wurde oder nicht nachweisbar war (Anhang Abb. 89). In diesen Flügelscheiben war die Wg-IR-Expression ebenfalls medial unterbrochen (Anhang Abb. 89 und Abb. 90). Aufgrund des frühen Entwicklungsstadiums war die Wg-OR-Expression nicht oder nur schwach nachweisbar.

#### 4.4.2 Klonaler *omb*-Verlust und Zfh2-Expression

*omb* l-o-f Klone, welche in der dorsalen Hinge von L3 Flügelscheiben lokalisiert waren, zeigten eine reduzierte Immunfluoreszenz gegen Zfh2, wenn der Klon distal der Wg-IR-Expression – zwischen der B/H- und dbH-Falte (Domäne 2) – lokalisiert war (weiße Pfeile in Abb. 47). Dahingegen wurde in *omb* l-o-f Klonen, die weiter proximal lokalisiert waren – also auf Höhe oder proximal der Wg-IR-Domäne – keine veränderte Immunfluoreszenz gegen Zfh2 festgestellt (Abb. 47).

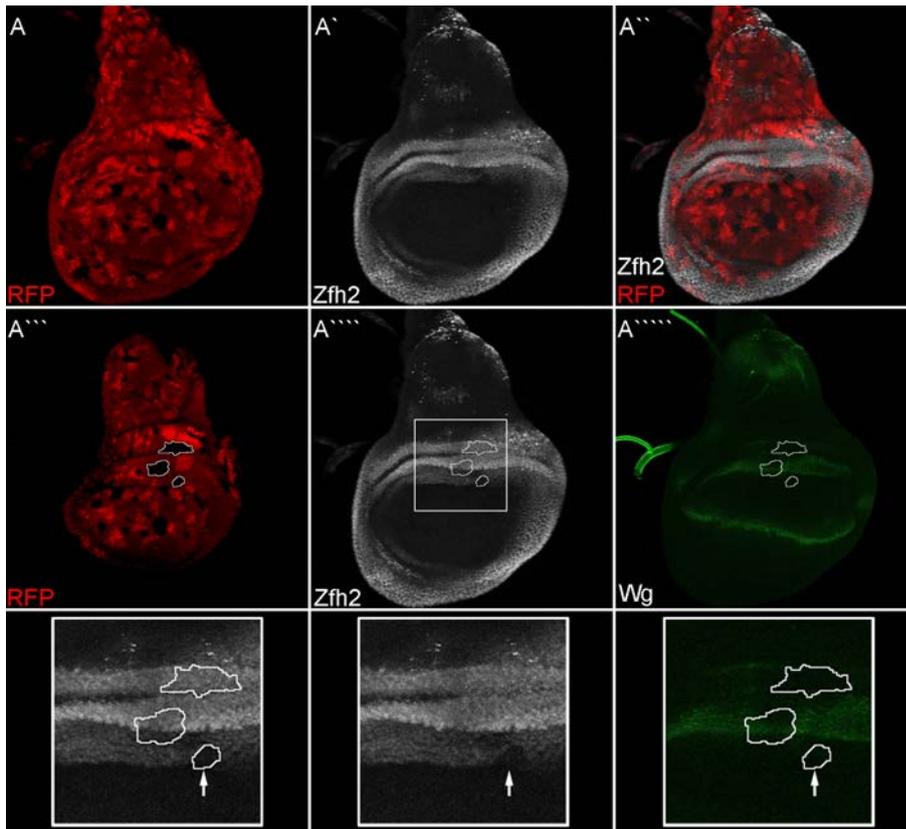


Abbildung 47 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *Zfh2*-Expression

Gezeigt sind *I(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben. mRFP (Rot; A, A'''), anti-*Zfh2* (Weiß; A', A'''''), Überlagerung des anti-*Zfh2* und RFP Signals (Weiß, Rot; A''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; (A''''') apikale und basale Einzelbilder wurden entfernt um die Klongrenzen zu kennzeichnen. (A'''''-A''''''') *I(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in der dorsalen hinge wurden gekennzeichnet. (B) Ein kleiner *I(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutanter Klon distal der *Wg*-IR-Expression zeigte eine reduzierte anti-*Zfh2* Färbung (weiße Pfeile). Weitere *I(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone proximal bzw. auf der *Wg*-IR-Expression zeigten keine veränderte *Zfh2*-Expression. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 4.4.3 Diskussion: *zinc finger homeodomain-2*

In der Flügelscheibe wird die *zfh2*-Expression durch den repressiven Einfluss von *Tsh* sowie der *Dpp*-Signalisierung proximal begrenzt (Terriente et al., 2008). So konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Tsh* zur Erweiterung der *zfh2*-Expression nach proximal führt, während in *tsh* exprimierenden Klonen die Expression von *zfh2* herunterreguliert wird (Terriente et al., 2008). In *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben wurde ein Verlust der *tsh-lacZ*-Expression im Zentrum der distalen Domäne (distal der H/N-Falte) nachgewiesen (Abb. 52). Eine Ausweitung der *Zfh2*-Expression nach proximal – in die normale *tsh* Domäne – wurde in *omb* Nullmutanten Flügelscheiben hingegen nicht festgestellt (Abb. 46 B, Anhang Abb. 89 bis Abb. 92). Dies deutet darauf hin, dass der lokale Verlust der *tsh*-Expression im *omb* mutanten Hintergrund nicht ausreichend ist, um eine ektopische *Zfh2*-Expression proximal der pbH-Falte zu induzieren. Eine Erweiterung der *tsh-lacZ*-Expression nach distal in die normale *zfh2* Domäne, was eine Reduzierung der *Zfh2*-Expression in der dorsalen hinge bewirken könnte, wurde nicht beobachtet (Abb. 52). Terriente und Kollegen (Terriente et al., 2008) zeigten, dass Klone, die eine konstitutiv aktive Form des *Tkv* Rezeptors exprimieren, die Expression von *zfh2* reprimieren und umgekehrt, dass *zfh2* in *tkv* mutanten Klonen dereprimiert wird. In Übereinstimmung hiermit, wurde in

der dorsalen hinge von *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben sowohl eine Reduktion der Zfh2-Expression als auch eine Zunahme der Dpp-Expression – also eine Verbreiterung sowie eine Zunahme der Fluoreszenz-Intensität der Immunfluoreszenz von Dpp – festgestellt (Abb. 35).

#### Zfh2 und Wg in der dorsalen hinge von *omb* Nullmutanten

Wie oben bereits erwähnt, überlagert in der *wt* L3 Flügelscheibe die Zfh2-Expression (Domäne 2, 3 und 4) die beiden Wg-Ringe in der dorsalen hinge (Abb. 45 A, Anhang Abb. 85 und Abb. 86). In *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben wurde ein teilweiser oder vollständiger Verlust der Wg- und Zfh2-Expression im Zentrum der dorsalen hinge nachgewiesen (Abb. 46 B, Anhang Abb. 89 bis Abb. 92). Beim Vergleich der Immunfluoreszenz von Wg und Zfh2 wurde folgende Korrelation festgestellt: Ein Verlust der Wg-IR-Expression ging mit einem Verlust oder einer Reduktion von Zfh2 in der Domäne 2 und 3 einher, bei einem Verlust von Zfh2 in der Domäne 2, 3 und 4 war sowohl die Wg-IR- als auch die Wg-OR-Expression unterbrochen (Abb. 46 B, Anhang Abb. 92). Es ist bekannt, dass in der Mitte des dritten Larvenstadiums die *wg*-Expression in der *wg*-OR-Domäne durch Zfh2 aktiviert wird (Perea et al., 2009). In Übereinstimmung damit wurde bei einer Unterbrechung der Zfh2-Expression in Domäne 4 der dorsalen hinge auch eine Unterbrechung der Wg-OR-Expression im gleichen Bereich der *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheibe festgestellt.

Im Allgemeinen war in der dorsalen hinge von *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben eine Beeinträchtigung der Zfh2- wie auch der Wg-Expression häufiger in der distalen hinge (Wg-IR) als in der proximalen hinge (Wg-OR) zu beobachten.

Im Rahmen einer weiterführenden Untersuchung sollte die Expression von Nub und Rn in *omb* mutanten Flügelscheiben analysiert werden. So kann eine Beeinträchtigung der Zfh2-Expression (in der dorsalen hinge) durch eine mögliche Erweiterung der Nub-Expression nicht ausgeschlossen werden. Eine Fehlexpression von *m* würde hingegen die *wg*-Expression in der hinge direkt beeinflussen (siehe oben). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression von *nub* und *m* auch in *omb* Nullmutanten Imaginalscheiben untersucht werden. Mehrere Versuche zur Einkreuzung eines *nub-Gal4* bzw. *m-lacZ* Transgens in einen *omb* Nullmutanten Hintergrund misslangen. *m-lacZ* ist eine Letalmutation (die Bloomington-Linie 7406 wird mittlerweile als rn[89] aber nicht mehr als lacZ-Linie geführt).

## 4.5 *nab*

Das Gen *nab* kodiert einen Transkriptionskofaktor (Clements et al. 2003; Terriente Félix et al. 2007; Ziv et al. 2009; Hadar et al. 2012) der in der Flügelimaginalscheibe als Corepressor von Rn die Expression von *wg* in der hinge kontrolliert (Terriente Félix et al., 2007). Das Gen *rotund* (*rn*) kodiert ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor der Krüppel-Familie (St Pierre et al., 2002). In der L3 Flügelscheibe grenzt die distale *nab*-Expression proximal an die *wg*-IR-Domäne, während die ebenfalls distale *rn*-Expression die *wg*-IR-Domäne überlappt (Terriente Félix et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Rn für die Aktivierung des *spade*-Enhancers (*wgspd*) notwendig ist (del Álamo Rodríguez et al., 2002). So führt die Mutation *rnΔ2-2* zum Verlust der *wg*-IR-Expression und zum Verlust des Flügelgelenks und weist damit einen ähnlichen Phänotyp wie *wgspd*<sup>fg</sup> auf (del Álamo Rodríguez et al., 2002). Es

wurde berichtet, dass Rn die Expression von *nab* und *dve* aktiviert wohingegen Zfh2 deren Expression reprimiert und dadurch die Expressionsdomäne von *nab* und *dve* proximal begrenzt (Terriente et al., 2008). Aufgrunddessen, dass Nab die Transkriptionsaktivität von Rn reprimiert (Terriente Félix et al., 2007) ermöglicht die Zfh2-Expression in der hinge, durch dessen repressiven Einfluß auf *nab*, die Aktivierung der wg-IR-Expression durch Rn (Terriente et al., 2008).

#### 4.5.1 Systemischer *omb*-Verlust und Nab-Expression

Die Nab-Expression wurde mittels Immunfluoreszenz gegen Nab nachgewiesen. In der *wt* Flügelscheibe füllte die Nab-Expression fast die gesamte pouch und grenzte proximal an die Wg-IR-Domäne (Abb. 48 A; Anhang Abb. 93). Entlang der D/V-Grenze wurde keine Nab-Expression festgestellt. Entlang der A/P-Grenze sowie im Zentrum der pouch war die Expression reduziert. Im Vergleich zu *wt* L3 Flügelscheiben zeigte sich in *omb* hypomorphen (*bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup>) L3 Flügelscheiben eine Zunahme der Fluoreszenz-Intensität von Nab (Abb. 48 B,C; Anhang Abb. 94). Eine Änderung der Ausdehnung der Nab-Expression war hingegen nicht feststellbar. In *l(1)omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben kam es zu einer zuweilen drastischen Umgestaltung des Nab Expressionsmusters. Dieses war meistens komplementär zur ektopischen Wg-Expression (Abb. 48 D; Anhang Abb. 95 und Abb. 96). Eine Erweiterung der Nab-Expression in die dorsale hinge wurde in keinem der drei mutanten Genotypen festgestellt (Abb. 48).

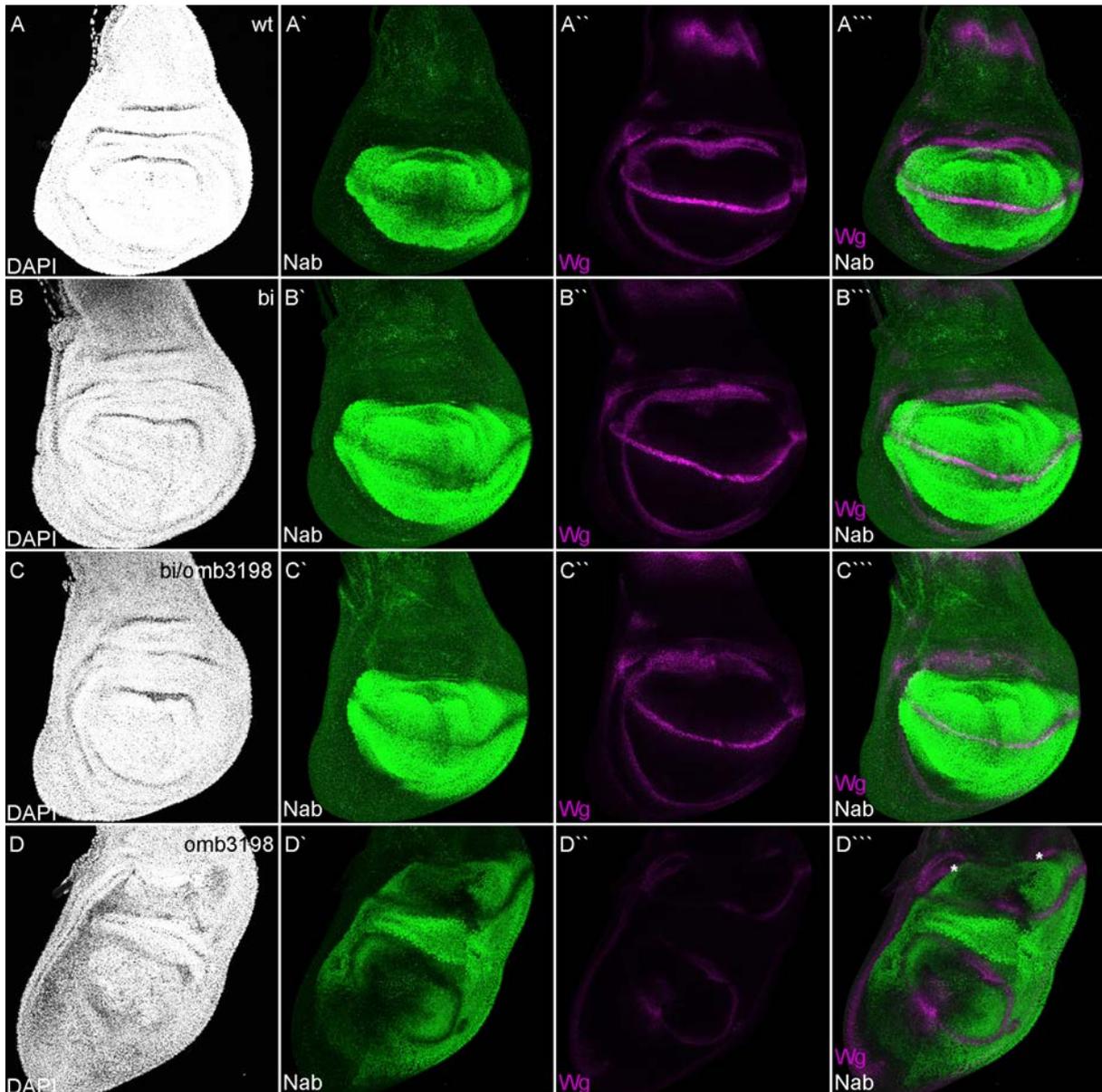


Abbildung 48 Nab-Expression in *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
 Dargestellt sind *wt* (A), *bi* (B), *bi/omb<sup>3198</sup>* (C) und *(1)omb<sup>3198</sup>* (D) L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-D), anti-Nab (Grün; A'-D'), anti-Wg (Magenta; A''-D''), Überlagerung des anti-Nab und anti-Wg Signals (Grün, Magenta; A'''-D'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A''') Die Nab-Expression grenzt an die Wg-IR-Domäne und ist proximal stärker als distal. Entlang der D/V-Grenze wird kein Nab detektiert. Im A-Kompartiment erscheint die anti-Nab Färbung an der A/P-Grenze reduziert und nimmt von medial nach lateral an Intensität zu. (D''') Flügelscheiben zeigen in Bereichen ektopischer Wg-Expression eine Verminderung oder ein Fehlen der anti-Nab Färbung. Der Stern (\*) kennzeichnet die verbleibende Wg-IR-Expression in der dorsalen Hinge. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert. (D''') Die Intensität des anti-Wg Signals wurde mittels Tonwertkorrektur weiter erhöht.

#### 4.5.2 Diskussion: Nab, Zfh2 und Wg

Es konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von *Zfh2* (mittels RNAi) im P-Kompartiment zum Verlust der *wg*-IR und *wg*-OR-Expression führt (Terriente et al., 2008). Ein Knockdown von *zfh2* innerhalb der Hinge mit dem schwächeren *zfh2-Gal4<sup>LP30</sup>* Treiber resultiert in einem ähnlichen Phänotyp, mit geringerer Penetranz in der *wg*-OR-Domäne (Terriente et al., 2008). Der Verlust der

wg-IR-Expression, in Flügelscheiben denen Zfh2 fehlt, kann darauf zurückgeführt werden, dass in allen *rn* exprimierenden Zellen auch *nab* coexprimiert wird (Terriente et al., 2008). So verursacht die Reduktion von Zfh2, neben dem Verlust der *wg*-Expression in den Ringdomänen der hinge, auch eine Erweiterung der *nab* und *dve* Expression nach proximal, in die distale hinge und damit in die *rn* Domäne (Terriente et al., 2008). Wie oben bereits beschrieben, konnte in der dorsalen hinge von *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben ein Verlust der Wg- wie auch der Zfh2-Expression nachgewiesen werden (Abb. 46). Entgegen der Erwartung wurde in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben aber keine Erweiterung der Nab-Expression nach proximal, in die hinge, beobachtet (Abb. 48) – was einen Verlust der wg-IR-Expression hervorrufen würde.

#### Nab und Wg in der distalen Flügelscheibe von *omb* Nullmutanten

Durch das Zusammenwirken von Rn und Nab – sowie durch die kombinierte Wirkung von Nab und Dve – wird in der pouch eine ektopische Expression von *wg* außerhalb der D/V-Grenze unterdrückt (Terriente Félix et al., 2007). In jungen L3 *omb* Nullmutanten Flügelscheiben wurde Wg häufig in einem schmalen diskontinuierlichen Streifen an der A/P-Grenze, in der distalen Flügelscheibe, ektopisch exprimiert (siehe beispielsweise Abb. 44 B, C; Anhang Abb. 90). In einigen Fällen schien diese ektopische streifenartige Wg-Expression die Wg-D/V mit der Wg-IR-Expression in der dorsalen und/oder ventralen hinge zu verbinden. Eine entsprechende Wg-Expression wurde in späteren L3 *omb* Nullmutanten Flügelscheiben nur selten beobachtet (Anhang Abb. 96). Bei späten L3 *omb* Nullmutanten Flügelscheiben konnte aber, im D-Kompartiment, häufig eine Ablenkung der verbleibenden Wg-IR-Expression nach distal festgestellt werden, so dass sich die Wg-IR-Expression in die pouch erstreckte und sich dadurch der Wg-D/V-Expression annährte (siehe beispielsweise Abb. 44 D). Hierzu passend war in der dorsalen pouch von *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben die Nab-Expression häufig reduziert (Abb. 48 D; Anhang Abb. 95 und Abb. 96). In *bi*, *bi/omb*<sup>3198</sup> und *l(1)omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben war die Nab-Expression weitgehend komplementär zur Wg-Expression, wie auch in *wt* (Abb. 48, Anhang Abb. 93 bis Abb. 96). Hierzu passend wurde im *omb* Nullmutanten Hintergrund eine distale Verlagerung der verbleibenden Wg-IR-Expression beobachtet, wenn gleichzeitig ein Verlust der Nab-Expression, im entsprechenden Bereich der dorsalen pouch detektiert wurde (Anhang Abb. 96). Dies deutet darauf hin, dass in *omb* Nullmutanten Flügelscheiben die Reduktion (bzw. der Verlust) von Nab die ektopische Wg-Expression in der distalen Flügelscheibe (pouch) ermöglicht.

Es ist denkbar, dass der Verlust von Omb nicht nur die Expression von Nab sondern auch dessen Funktion beeinflusst. Das menschliche Ortholog von Nab, Nab1, interagiert mit Proteinen, die als Tbx Interaktoren charakterisiert wurden. Dazu gehören die Transkriptionsfaktoren EGR1 (interagiert mit TBX2, Redmond et al., 2010) und Muskelin (interagiert mit TBX20, Debenedittis et al., 2011).

#### 4.6 *homothorax* (*hth*)

In der hinge der L3 Flügelimaginalscheibe wird *hth* in zwei ringförmigen Domänen exprimiert, die mit der wg-IR- und wg-OR-Domäne überlappen (Casares und Mann, 2000; Azpiazu und Morata, 2000). Die *hth*-Expression wird anscheinend durch den Wg Signalweg kontrolliert (del Álamo Rodríguez et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass in der hinge die Expression von Wg der von Hth

vorausgeht und dass Wg- für die Hth-Expression erforderlich ist (Casares und Mann, 2000). In Übereinstimmung hiermit wurde in *wgsp<sup>d9</sup>* mutanten Flügelscheiben ein Verlust des inneren Rings der *hth*-Expression nachgewiesen (del Álamo Rodríguez et al., 2002). Für die initiale Aktivierung der *wg*-Expression ist Hth nicht notwendig, jedoch für deren Aufrechterhaltung in der *wg*-IR- und *wg*-OR-Domäne (del Álamo Rodríguez et al., 2002; Perea et al., 2009).

#### 4.6.1 Systemischer *omb*-Verlust und *hth-lacZ*-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von *hth* durch Verwendung einer Enhancer-Trapp-Linie (*hth-lacZ*) visualisiert. Die *hth-lacZ*-Expression wurde mittels X-Gal Färbung (*wt* und *I(1)omb<sup>3198</sup>*) (Abb. 49) und Immunfluoreszenz gegen  $\beta$ -Galaktosidase (*wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *I(1)omb<sup>3198</sup>*) (Abb. 50) in L3 Flügelscheiben analysiert. In wildtypischen L3 Flügelscheiben wurde *hth-lacZ* in Teilen des Notums und in zwei annähernd konzentrischen Ringen in der hinge exprimiert (Abb. 49 A-D, Abb. 50 A). Im inneren Ring lag die stärkste Expression im medialen Bereich der dorsalen hinge sowie in der anterior-ventralen hinge (Pleura) (Abb. 50 A) und damit innerhalb der *omb* Expressionsdomäne. Die dorsale Hälfte des äußeren Rings zeigte eine starke *hth-lacZ*-Expression, wohingegen im V-Kompartiment eine entsprechende Expression kaum zu erkennen war (Abb. 49 A-D). In der pouch wurde in L3 keine *hth-lacZ* Aktivität festgestellt. In *I(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben zeigte die X-Gal Färbung eine Unterbrechung des inneren und äußeren Rings der *hth-lacZ*-Expression im Zentrum der dorsalen hinge (Abb. 49 E-H). In der anterior-ventralen hinge (Pleura) war die Expression reduziert. Einige späte L3 Flügelscheiben, mit besonders stark ausgeprägten morphologischen Veränderungen, zeigten zusätzlich eine stark verminderte *hth-lacZ*-Expression in der gesamten Scheibe (Abb. 49 H).

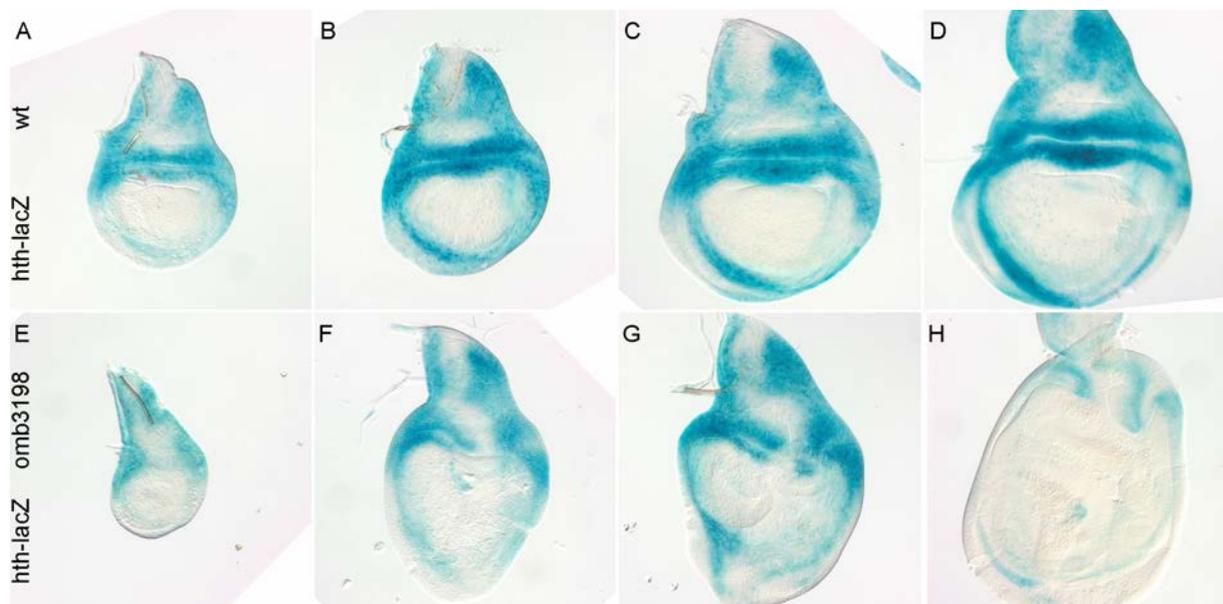


Abbildung 49 Expressionsmuster von *hth-lacZ* in *wt* und *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
Dargestellt sind *wt* (Kontrolle; A-D) und *I(1)omb<sup>3198</sup>* (E-H) L3 Flügelimaginalscheiben. Die *hth-lacZ*-Expression wurde mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. (E-H) In *I(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten Flügelscheiben war die Färbung im Zentrum der dorsalen hinge unterbrochen.

Für eine genauere Untersuchung der Expression von *hth-lacZ* wurde eine Immundreifachfärbung gegen  $\beta$ -Galaktosidase (*hth-lacZ*), Nab und Wg in L3 Flügelscheiben durchgeführt (Abb. 50). In *wt* L3 Flügelscheiben überlagerte die Immunfluoreszenz von Wg die von *hth-lacZ* in den beiden Ringen der hinge (Abb. 50 A; Anhang Abb. 93). In der Serie *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* nahm mit abnehmendem Omb Niveau die Fluoreszenz-Intensität von *hth-lacZ* in der gesamten Scheibe ab (Anhang Abb. 93 bis Abb. 95). In *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben zeigte die Immunfluoreszenzfärbung eine Unterbrechung der *hth-lacZ*- sowie der Wg-Expression im Zentrum der dorsalen hinge (Abb. 50 D), in Übereinstimmung mit den X-Gal Färbungen (Abb. 49 E-H). Der Expressionsverlust von Wg und *hth-lacZ* war auf die gleiche zentrale Region beschränkt. In außergewöhnlich großen *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben, die massive morphologische Defekte aufwiesen, kam es in zentral gelegenen Bereichen der Flügelscheibe zur ektopischen Expression von *hth-lacZ* (siehe beispielsweise Abb. 49 H).

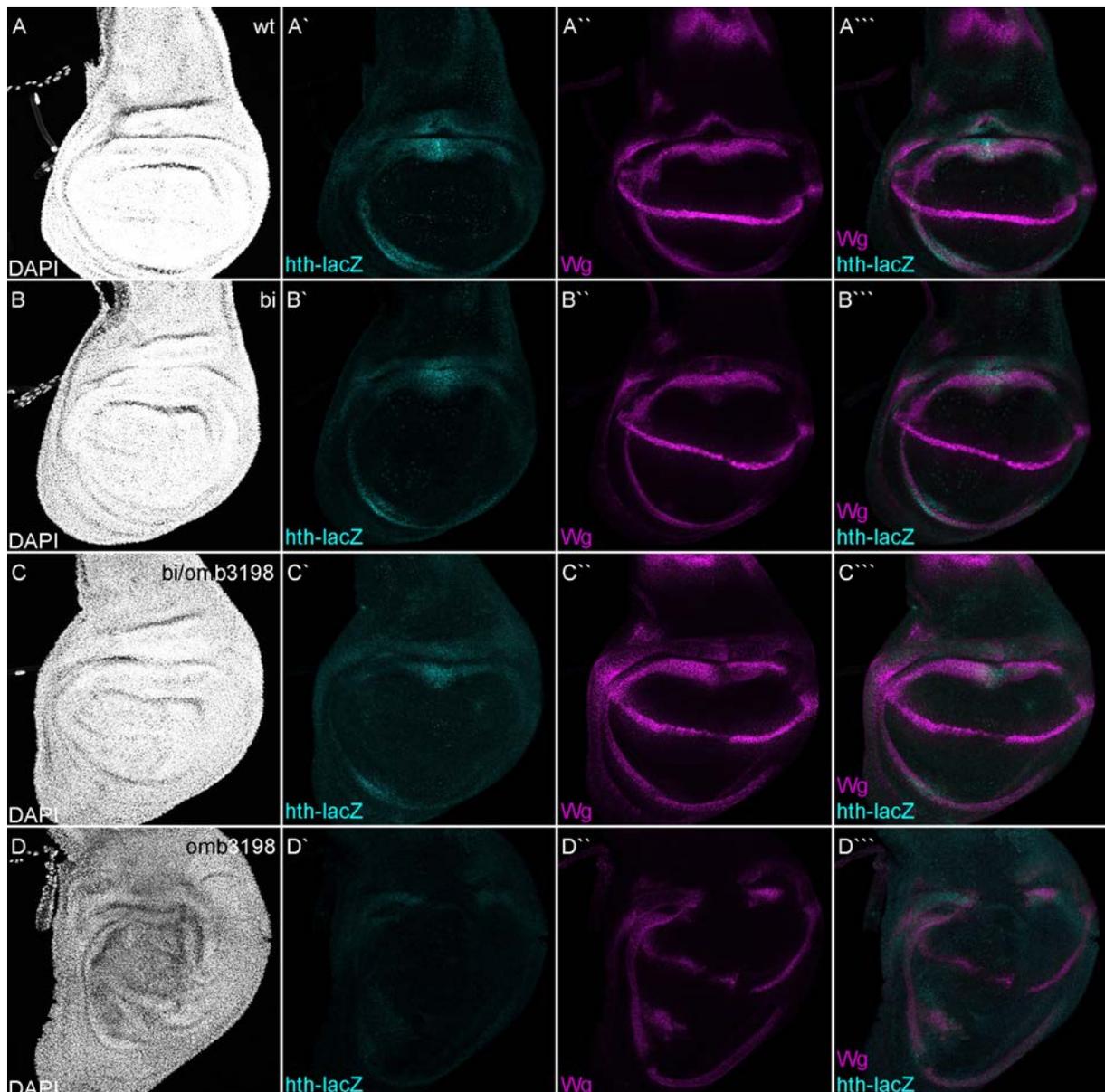


Abbildung 50 *hth-lacZ*-Expression in *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *wt* (A), *bi* (B), *bi/omb<sup>3198</sup>* (C) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (D) L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-D), *hth-lacZ* (anti-β-Galaktosidase; Türkis; A'-D'), anti-Wg (Magenta; A''-D''), Überlagerung des *hth-lacZ* und anti-Wg Signals (Türkis, Magenta; A'''-D'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A') In der hinge wird *hth-lacZ* in einem inneren Ring (distal der H/H-Falte) und einen äußeren Ring (proximal der H/H-Falte) exprimiert. (A''') *hth-lacZ* und Wg werden in der hinge coexprimiert. (D', D''') In der dorsalen hinge ist die *hth-lacZ*-Expression medial unterbrochen. (D''') *hth-lacZ* und Wg werden in der hinge coexprimiert. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert. (D''') Die Intensität des *hth-lacZ* Signals wurde mittels Tonwertkorrektur weiter erhöht.

#### 4.6.2 Klonaler *omb*-Verlust und *hth-lacZ*-Expression

Zur Überprüfung der bisherigen Ergebnisse wurde eine klonale Analyse durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass in der dorsalen hinge lokalisierte *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone eine reduzierte *hth-lacZ*-Expression aufwiesen (Abb. 51). Größere Klone, welche die dorsale hinge im P-Kompartiment überspannten, führten zu einer Reduktion der *hth-lacZ*-Expression im inneren Ring (Abb. 51 C, D). Wie bei der Wg-IR-Expression, war auch bei *hth-lacZ* der proximale Bereich des inneren Rings weniger stark beeinträchtigt. Kleinere Klone, welche distal der H/H-Falte lokalisiert waren, zeigten eine reduzierte *hth-lacZ*-Expression in der distalen Hälfte des Klons, während die Expression in der proximalen Hälfte des Klons weitestgehend unverändert erschien (Abb. 51 A, B). In den untersuchten L3 Flügelscheiben wurden keine anterioren Klone im medialen Bereich der dorsalen hinge gefunden.

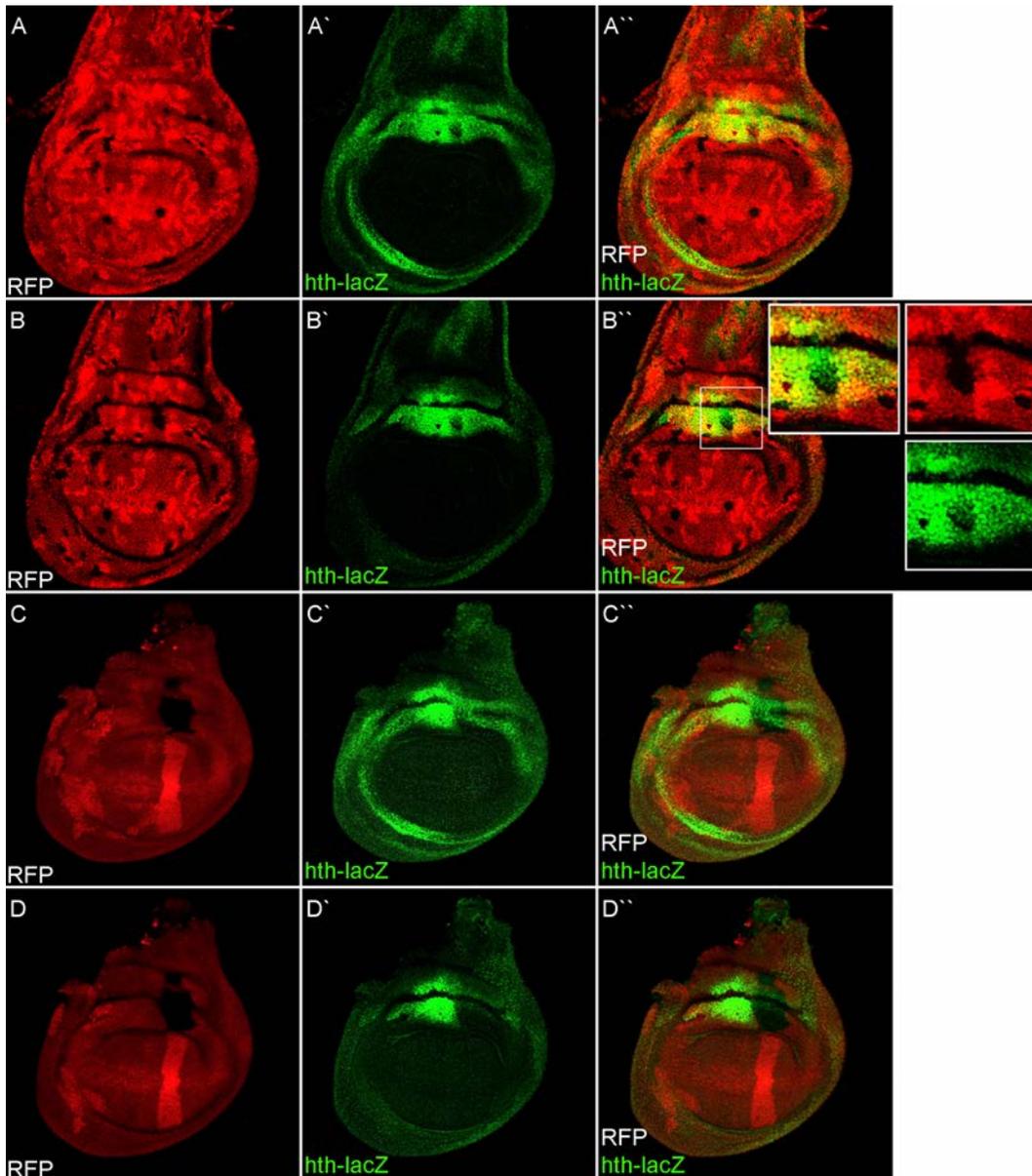


Abbildung 51 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *hth-lacZ*-Expression  
 Gezeigt sind *I(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben. mRFP (Rot; A-D), *hth-lacZ* (anti- $\beta$ -Galaktosidase; Grün; A'-D'), Überlagerung des *hth-lacZ* (Grün) und RFP (Rot) Signals (A''-D''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; In (A, C) wurden apikale und in (B, D) apikale und basale Einzelbilder entfernt. In (B, D) sind jeweils 20 mediale Einzelbilder als Maximalprojektion gezeigt. In (B'') kennzeichnet das linke Quadrat (weißer Rahmen) den Bereich der Flügelscheibe der in den rechten Quadraten vergrößert dargestellt ist. (B) Ein kleiner *I(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutanter Klon distal der H/H-Falte wies eine reduzierte *hth-lacZ* Färbung auf. (C) Ein *I(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutanter Klon zeigte eine teilweise Reduktion der *hth-lacZ* Färbung. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 4.7 *teashirt (tsh)*

In der späten L3 Flügelimaginalscheibe wird *tsh* in einer Ring-Domäne um die pouch und beinahe im gesamten Notum exprimiert (Sun et al., 1995; Bhojwani et al., 1995). Die Expressionsmuster von *tsh* und *hth* überlappen weitgehend, aber in der dorsalen hinge werden beide Gene nur im proximalen Ring der *hth*-Expression coexprimiert (Pai et al., 1998; Casares und Mann, 2000; Azpiazu und Morata, 2000). In der späten L3 Flügelscheibe wird die *tsh*- und die *nub*-Expression durch die sogenannte

gap-Domäne voneinander getrennt. Es wurde berichtet, dass die Zellen dieser drei Domänen zum Teil unabhängige Wachstumseinheiten in der hinge bilden (Zirin und Mann, 2007); eine (distale) Nub exprimierende, eine (proximale) Tsh exprimierende und die zwischenliegende gap-Domäne (aus Nub- und Tsh-negativen Zellen). So konnte gezeigt werden, dass neutrale Minute+ Klone (die in Minute Gewebe generiert wurden) dazu tendieren parallel zur Grenze der Nub oder Tsh-Expression zu proliferieren, wenn sie in der gap-Domäne lokalisiert sind oder an diese angrenzen (Zirin und Mann, 2007). Für die Bildung der gap-Domäne scheint die Wg-Signalisierung in der hinge erforderlich zu sein. So grenzen im frühen zweiten Larvenstadium die Expressionsdomänen von *nub* und *tsh* in der hinge aneinander und die gap-Domäne wird dann von Zellen gebildet, in denen die *tsh*-Expression durch die Wg-Signalisierung reprimiert wird. Infolge der lokalen Zellproliferation der Tsh- und Nub-negativen Zellen vergrößert sich die gap-Domäne bis ans Ende der Larvalentwicklung (Zirin und Mann, 2007).

Zu *tsh* existiert das paraloge Gen *tiptop* (*tio*). *Tsh* und *tio* zeigen in der Imaginalentwicklung ein sehr ähnliches Expressionsmuster und sind weitgehend redundant (Bessa et al., 2009). Die spontane *aeroplane* Mutante trägt die Insertion eines transposablen I-Elementes in einem *tsh* hinge-enhancer. Die Flügel von *tsh<sup>ae</sup>* Fliegen zeigen eine Fusion von Strukturelementen in der proximalen hinge, die zum held-out Phänotyp führen (Soanes et al., 2001).

#### 4.7.1 Systemischer *omb*-Verlust und *tsh-lacZ*-Expression

In dieser Arbeit wurde eine *tsh-lacZ* Enhancer-Trap-Linie verwendet, um die Expression von *tsh* zu untersuchen. In L3 Flügelimaginalscheiben zeigte die *tsh-lacZ* Linie Aktivität in der proximalen hinge (Domäne 5 und 6) sowie im Notum (Abb. 52 A-D). Die X-Gal Färbung der *tsh-lacZ* Linie ergab eine prominente Färbung in der dorsalen hinge die durch die H/N-Falte in eine distale und proximale Domäne unterteilt wurde (Abb. 52 A-D). Damit überlappte die distale *tsh-lacZ* Domäne mit der proximalen Domäne von *hth-lacZ* (vergleiche Abb. 52 A-D mit Abb. 49 A-D). In *wt* zeigten die L3 Flügelscheiben auch eine starke proximale *tsh-lacZ* Färbung in der anterior-ventralen hinge (Pleura) wie auch eine weiter distal gelegene, annähernd ringförmige Färbung in der gesamten ventralen hinge (Abb. 52 A-D). Im posterioren Teil überlagerte diese Färbung teilweise die proximale pouch. Das *tsh-lacZ* Muster stimmte mit dem publizierten anti-Tsh Muster weitgehend überein (Cifuentes und García-Bellido, 1997; Soanes et al., 2001; Bessa et al., 2009). Aufgrund ihrer ungewöhnlichen Positionierung und der zuweilen weit auseinanderliegenden, gefärbten Zellkerne (wie es für Zellkerne des Plattenepithels charakteristisch ist) handelte es sich bei der distalen Färbung des ventralen Kompartiments oder zumindest bei dessen posterior-ventralen Teils um eine *tsh-lacZ* Aktivität in der Peripodialmembran (Abb. 52 A-D). Für diese Annahme spricht auch die Beobachtung einer schwachen *tsh-lacZ* Färbung im A-Kompartiment von *l(1)omb<sup>ΔP6</sup>* Flügelscheiben (Abb. 52 E-H), die als Äquivalent zur peripodialen Färbung im *wt* betrachtet wurde. Im Vergleich zu *wt* war in *l(1)omb<sup>ΔP6</sup>* L3 Flügelscheiben das Expressionsmuster von *tsh-lacZ* deutlich verändert (Abb. 52 E-H). So war die *tsh-lacZ*-Expression in der ventralen hinge reduziert, überlagert von einer ausgedehnten Expression in der Peripodialmembran. In der dorsalen hinge blieb die proximale Domäne der *tsh-lacZ*-Expression nur teilweise erhalten und beschränkte sich auf einen medialen Bereich proximal der H/N-Falte (Abb. 52

F-H). Die distale Domäne der *tsh-lacZ*-Expression (distal der H/N-Falte) war häufig medial unterbrochen (Abb. 52 F-H).

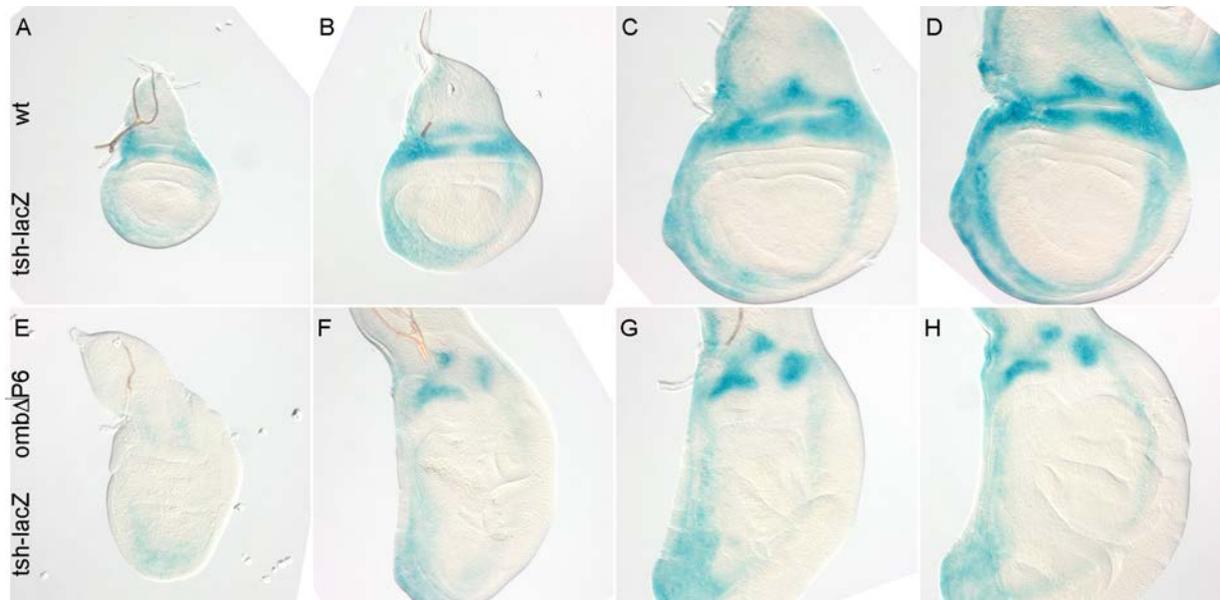


Abbildung 52 Expressionsmuster von *tsh-lacZ* in *wt* und *I(1)omb<sup>ΔP6</sup>* Flügelimaginalscheiben  
 Dargestellt sind *wt* (Kontrolle; A-D) und *I(1)omb<sup>ΔP6</sup>* (E-H) L3 Flügelimaginalscheiben. Die *tsh-lacZ*-Expression wurde mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. (E-H) In *I(1)omb<sup>ΔP6</sup>* mutanten Flügelimaginalscheiben war die Färbung im Zentrum der dorsalen Hinge unterbrochen.

#### 4.7.2 Diskussion: *teashirt*

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass in *omb* Nullmutanten Flügelimaginalscheiben die Expression von *tsh-lacZ* (wie auch *hth-lacZ* Abb. 49 E-H; Abb. 50 D) im Zentrum der proximalen Hinge (Domäne 5) verloren geht (Abb. 52 F-H). Es konnte gezeigt werden, dass Tsh überexprimierende Klone eine gesteigerte Hth-Expression in der Hinge induzieren und in umliegenden Bereichen die Entwicklung von Gelenkstrukturen fördern (Azpiazu und Morata, 2000). Der lokale Verlust der *tsh*-Expression in *omb* mutanten Flügelimaginalscheiben ist daher mit einer reduzierten Gelenkentwicklung kompatibel.

### 4.8 JAK/STAT

In *Drosophila* beinhaltet der JAK/STAT-Signalweg (Janus kinase/ signal transducers and activators of transcription) folgende Hauptkomponenten: den Liganden Unpaired (Upd), den Transmembranrezeptor Domeless (Dome), die einzige JAK-Tyrosinkinase Hopscotch (Hop), sowie den Transkriptionsfaktor Stat92E (zur Übersicht siehe: Arbouzova und Zeidler, 2006; Zeidler und Bausek, 2013). Der JAK/STAT-Signalweg ist für die Gelenkentwicklung essentiell. Während der Flügelentwicklung werden die *upd*-Expression und die Stat92E-Aktivität auf die Hinge beschränkt und die Signalwegaktivität bleibt bis ins Adultstadium auf die Gelenkregion lokalisiert (Ayala-Camargo et al., 2013). *upd* und *Stat92E* werden in der Flügelimaginalscheibe in gleichen Mustern dynamisch exprimiert. Im frühen zweiten Larvenstadium kann die 10xSTAT-GFP-Reporteraktivität in allen Zellen der

Flügelscheibe detektiert werden (Rodrigues et al., 2012, Ayala-Camargo et al., 2013). Vom späten zweiten bis zum späten dritten Larvenstadium wird die Aktivität des JAK/STAT-Signalwegs fast vollständig aus der distal gelegenen Nub-Domäne ausgeschlossen, während der Signalweg in fast allen Zellen der hinge aktiv ist, mit dem höchsten Niveau in der dorsalen hinge (Ayala-Camargo et al., 2013). Im adulten Flügel verursachen Klone die für Stat92E mutant sind einen nahezu vollständigen Verlust der Gelenkstrukturen, sodass der Flügel direkt am Thorax ansetzt (Ayala-Camargo et al., 2013). Für die Flügelimaginalscheibe wurde gezeigt, dass die Hemmung der Wg-Signalisierung in der hinge zu einer Verringerung der gap-Domäne und folglich zu einer Annäherung der beiden Wg-Ringe führt (Zirin und Mann, 2007). Dieser Phänotyp wird auch in Stat92E mutanten Klonen beobachtet (Ayala-Camargo et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität von Stat92E mittels eines 10xSTAT-GFP-Transkriptionsreporters visualisiert, der zehn multimerisierte Kopien eines Stat92E Response Elements aus dem Socs36E Gen enthält, welche die Expression von GFP regulieren (Bach et al., 2007). Das Fluoreszenzmuster sowie die –intensität der Fluoreszenz des 10xSTAT-GFP-Reporters erlauben eine Beurteilung der Ausdehnung (Lokalisation) und Aktivität des JAK/STAT-Signalweges.

#### 4.8.1 Systemischer *omb*-Verlust und JAK/STAT-Signalisierung

In den Flügelimaginalscheiben wurde die Aktivität des 10xSTAT-GFP Reporters durch direkte Fluoreszenz des GFP und mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung gegen GFP visualisiert (Abb. 53). Die Fluoreszenzmuster waren größtenteils identisch. Die einzige Ausnahme bildete das unterschiedlich stark ausgeprägte Expressionsminimum im Zentrum der dorsalen hinge (weiße Pfeilspitzen in Abb. 53 und zugehörige Beschreibung). Sofern nicht anders angegeben, werden im Folgenden die Ergebnisse anhand der direkten GFP-Fluoreszenz des 10xSTAT-GFP Reporters beschrieben. Die Position der apikalen und basalen Falten in der dorsalen hinge wurden anhand der DAPI Kernfärbung bestimmt und für die Beschreibung der Expression herangezogen.

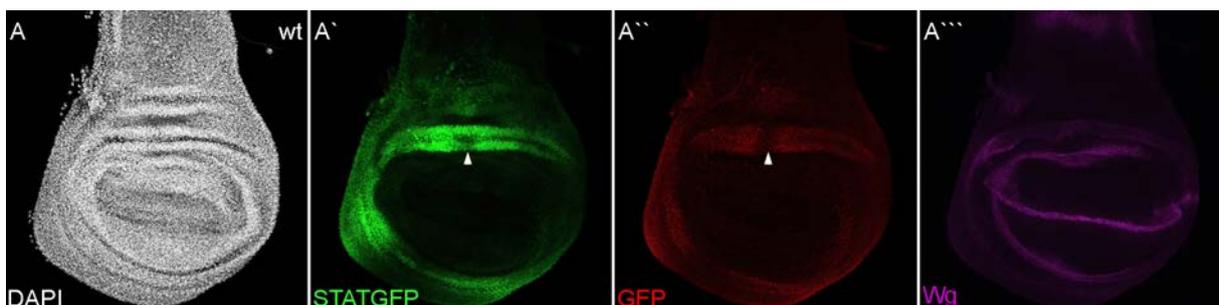


Abbildung 53 10xSTAT-GFP-Expression in *wt* Flügelimscheibe

Wildtypische Flügelimaginalscheibe im mittleren-späten L3 Stadium. DAPI (Weiß; A), 10xSTAT-GFP (Grün; A'), anti-GFP (Rot; A''), anti-Wg (Magenta; A'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Die 10xSTAT-GFP Expressionsdomäne besitzt im Zentrum der dorsalen hinge ein Expressionsminimum (weiße Pfeilspitzen). Bei der direkten GFP-Fluoreszenz (Grün; A') liegt das Expressionsminimum in der distalen Domäne und bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung gegen GFP (Rot; A'') in der distalen und proximalen Domäne. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

In wildtypischen Flügelscheiben des frühen-mittleren L3 Stadiums bildete die Expressionsdomäne des 10xSTAT-GFP Reporters einen geschlossenen Ring, ohne ein deutliches und reproduzierbares Expressionsminimum innerhalb der Hinge (Abb. 54 A). In Flügelscheiben des mittleren-späten L3 Stadiums wurden hingegen Expressionsminima in der dorsalen und anterior-ventralen Hinge beobachtet (Abb. 53). Ferner zeigten späte L3 Flügelscheiben nur eine geringe 10xSTAT-GFP-Expression in der Pleura (Abb. 53). In der dorsalen Hinge war die Expressionsdomäne des 10xSTAT-GFP Reporters durch die H/H-Falte in eine distale Expression (Domäne 3) und eine proximale Expression (Domäne 4) unterteilt. Dabei wurde die distale Expression durch die dbH-Falte begrenzt und die proximale Expression durch die pbH-Falte (Abb. 55 A).

Zusätzlich zur bereits beschriebenen Expressionsdomäne des 10xSTAT-GFP Reporters, in Domäne 3 und 4 der dorsalen Hinge, wurde eine weitere ringförmige Expression in Domäne 2 der dorsalen Hinge beobachtet. In *wt* Flügelscheiben war diese Expression schwach und überlappte teilweise mit der Wg-IR-Domäne (weißer Pfeil in Abb. 55 A; Anhang Abb. 97).

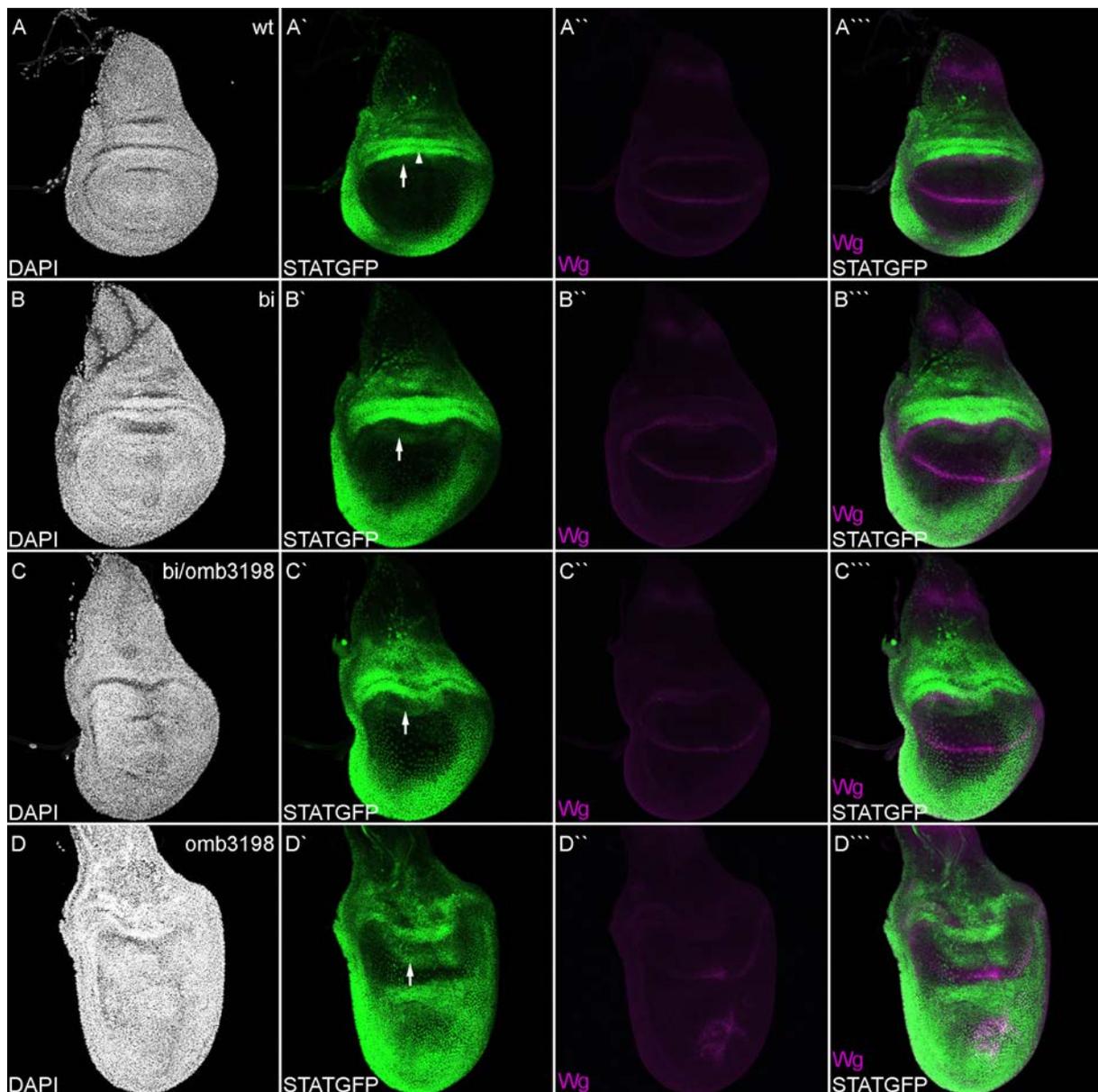


Abbildung 54 10xSTAT-GFP-Expression in *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *wt* (A), *bi* (B), *bi/omb<sup>3198</sup>* (C) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (D) Flügelimaginalscheiben. Die Flügelscheiben entsprechen einem frühen-mittleren L3 Stadium. DAPI (weiß; A-D), 10xSTAT-GFP (Grün; A'-D'), anti-Wg (Magenta; A''-D''), Überlagerung des 10xSTAT-GFP und anti-Wg Signals (Grün, Magenta; A'''-D'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A') In der *wt* Flügelscheibe wurde im Zentrum der dorsalen hinge (weiße Pfeilspitze) kein Minimum der 10xSTAT-GFP-Expression festgestellt. (A'-D') Die weißen Pfeile markieren die 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz in Domäne 2 der dorsalen hinge. (A'''-D''') Die Intensität des anti-Wg Signals wurde mittels Tonwertkorrektur erhöht.

In *bifid* und *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben wurden ähnliche Veränderungen der 10xSTAT-GFP-Expression festgestellt. Im Vergleich zu *wt* schien die Fluoreszenz des 10xSTAT-GFP Reporters in *omb* hypomorphen Flügelscheiben teilweise erweitert und verstärkt (Abb. 54; Abb. 55; Anhang Abb. 98 und Abb. 99). *bifid* Flügelscheiben im frühen-mittleren L3 Stadium wiesen in Domäne 3 und 4 der dorsalen hinge eine etwa gleich hohe Fluoreszenz-Intensität auf (Abb. 54). Im mittleren-späten L3 Stadium war in *bifid* und *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben die 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz in der distalen Expression (Domäne 3) stärker als in *wt* (Abb. 55), in der proximalen Expression (Domäne 4) wies die Fluoreszenz eine gewisse Variabilität auf (Abb. 55) – d.h. die Fluoreszenz variierte von Scheibe zu Scheibe (Anhang Abb. 98 und Abb. 99). In einigen *bifid* und *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben schien die Fluoreszenz in Domäne 4 zumindest bereichsweise reduziert (Anhang Abb. 98 und Abb. 99). Hiervon war vor allem der zentrale und posteriore Bereich der dorsalen hinge betroffen. Dieser Phänotyp war in späteren L3 Flügelscheiben stärker ausgebildet als in jüngeren und in *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben stärker ausgeprägt als in *bifid*. Ein Expressionsminimum des 10xSTAT-GFP Reporters in der dorsalen hinge, wie in *wt* beobachtet, wurde in *bifid* und *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben nicht festgestellt (Abb. 55).

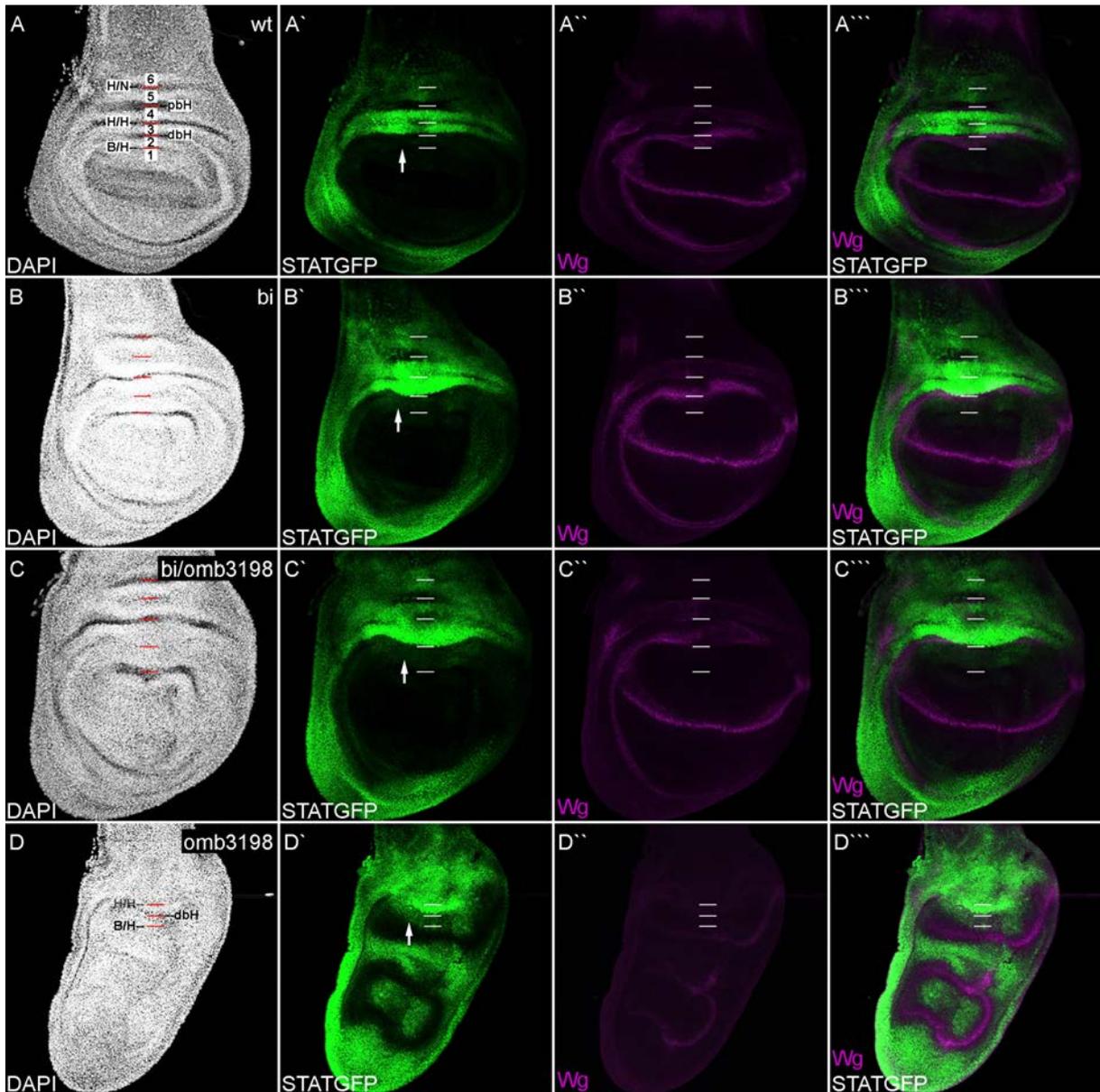


Abbildung 55 10xSTAT-GFP-Expression in *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
 Dargestellt sind *wt* (A), *bi* (B), *bi/omb<sup>3198</sup>* (C) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (D) Flügelimaginalscheiben im mittleren-späten L3 Stadium. DAPI (Weiß; A-D), 10xSTAT-GFP (Grün; A'-D'), anti-Wg (Magenta; A''-D''), Überlagerung des 10xSTAT-GFP und anti-Wg Signals (Grün, Magenta; A'''-D'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Die drei apikalen Falten (B/H, H/H, H/N) und die zwei basalen Falten (dbH, pbH) in der dorsalen hinge sind markiert. (A) In der dorsalen hinge der *wt* Flügelscheibe grenzt die Wg-IR-Expression an die distale (untere) Kante der 10xSTAT-GFP Expressionsdomäne. Die Wg-OR-Expression war in diesem L3 Stadium weniger offensichtlich und überlappte mit der 10xSTAT-GFP Expressionsdomäne in der proximalen hinge. Die starke 10xSTAT-GFP-Expression in Domäne 3 und 4 wurde durch die beiden basalen Falten begrenzt. In Domäne 2 wurde eine sehr schwache 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz detektiert (Pfeil). (B, C) In der dorsalen hinge der *bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheibe überlappt die Wg-IR-Expression weitgehend (B) bzw. vollständig (C) mit der 10xSTAT-GFP Expressionsdomäne. In der dorsalen hinge war die Fluoreszenz-Intensität (FI) von 10xSTAT-GFP zum Teil stark erhöht; in *bi* (B) distal und proximal der H/H-Falte (in Domäne 2 (Pfeil) und Domäne 3 sowie teilweise in Domäne 4), in *bi/omb<sup>3198</sup>* (C) distal der H/H-Falte ((in Domäne 2 (Pfeil) und Domäne 3). (D) In der *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten L3 Flügelimaginalscheibe war die FI von 10xSTAT-GFP generell stark erhöht. Die 10xSTAT-GFP-Expression in Domäne 2 (Pfeil) reichte bis fast an die Wg-Expression an der D/V-Grenze heran. (D''') Die Intensität des anti-Wg Signals wurde mittels Tonwertkorrektur erhöht. (D'

und D''') apikale Einzelbilder wurden entfernt um die 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz im Hauptepithel der Imaginalscheibe zu verdeutlichen.

In *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben kam es zu einer deutlichen Umgestaltung des Fluoreszenzmusters des 10xSTAT-GFP Reporters, im Vergleich zu *wt* (Abb. 55). In der dorsalen und ventralen Hinge (Pleura) als auch in der Peripodialmembran wurde eine stärkere beziehungsweise ektopische 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz festgestellt (Abb. 55 D; Abb. 56; Anhang Abb. 100). Aufgrund der starken peripodalen Färbung war die 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz des Hauptepithels in normalen Fluoreszenzaufnahmen (d.h. in Maximalprojektionen des gesamten Z-Bildstapels) nur schwer zu erkennen (Abb. 56 A'-F'). Die Fluoreszenzbilder in Abb. 56 (A''-F'') sind Maximalprojektionen von Z-Bildstapeln, bei denen apikale Einzelbilder entfernt wurden, um die 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz im Hauptepithel der Imaginalscheibe zu verdeutlichen und eine Überlagerung durch die peripodiale Fluoreszenz zu beseitigen (Abb. 56 und zugehörige Beschreibung).

Die Analyse der 10xSTAT-GFP Reporteraktivität in der dorsalen Hinge von *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben ist schwierig. Aufgrund der zuweilen starken morphologischen Veränderungen (z.B. der Ausbildung ektopischer Falten), sowie der veränderten Wg-Expression in der dorsalen Hinge, konnten weder die endogenen Falten noch die Wg-Expression für die Beschreibung der 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz in diesem Bereich herangezogen werden.

In der dorsalen Hinge von *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben fand sich eine streifenförmige Fluoreszenzfärbung mit einer hohen Fluoreszenz-Intensität (blaue Pfeile in Abb. 56). Aufgrund der Positionierung entsprach diese Fluoreszenz sehr wahrscheinlich der wildtypischen distalen Expression in Domäne 3 (siehe Abb. 55). Proximal dieser Expression war hingegen keine streifen- oder ringförmige Fluoreszenz erkennbar, zwischen den einzelnen Flügelscheiben unterschied sich das Fluoreszenzmuster als auch die Intensität in diesem Bereich häufig (Abb. 56). Die meisten *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben zeigten im Bereich der dorsalen pouch/Hinge eine distale Verschiebung der 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz – welche in *wt* nur in Domäne 2 der dorsalen Hinge schwach detektiert wurde – sodass die Fluoreszenz fast bis an die Wg-DV-Expression heran reichte (weiße Pfeile in Abb. 55 und Abb. 56). In *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben zeigte sich ein stark verändertes Fluoreszenzmuster des 10xSTAT-GFP Reporters im V-Kompartiment, mit ektopischen Domänen in der distalen Flügelscheibe (Abb. 55; Abb. 56). Die ektopischen Domänen waren größtenteils komplementär zur ektopischen Wg-Expression in der distalen Flügelscheibe (Abb. 55 D'''; Abb. 56 A'''-F'').

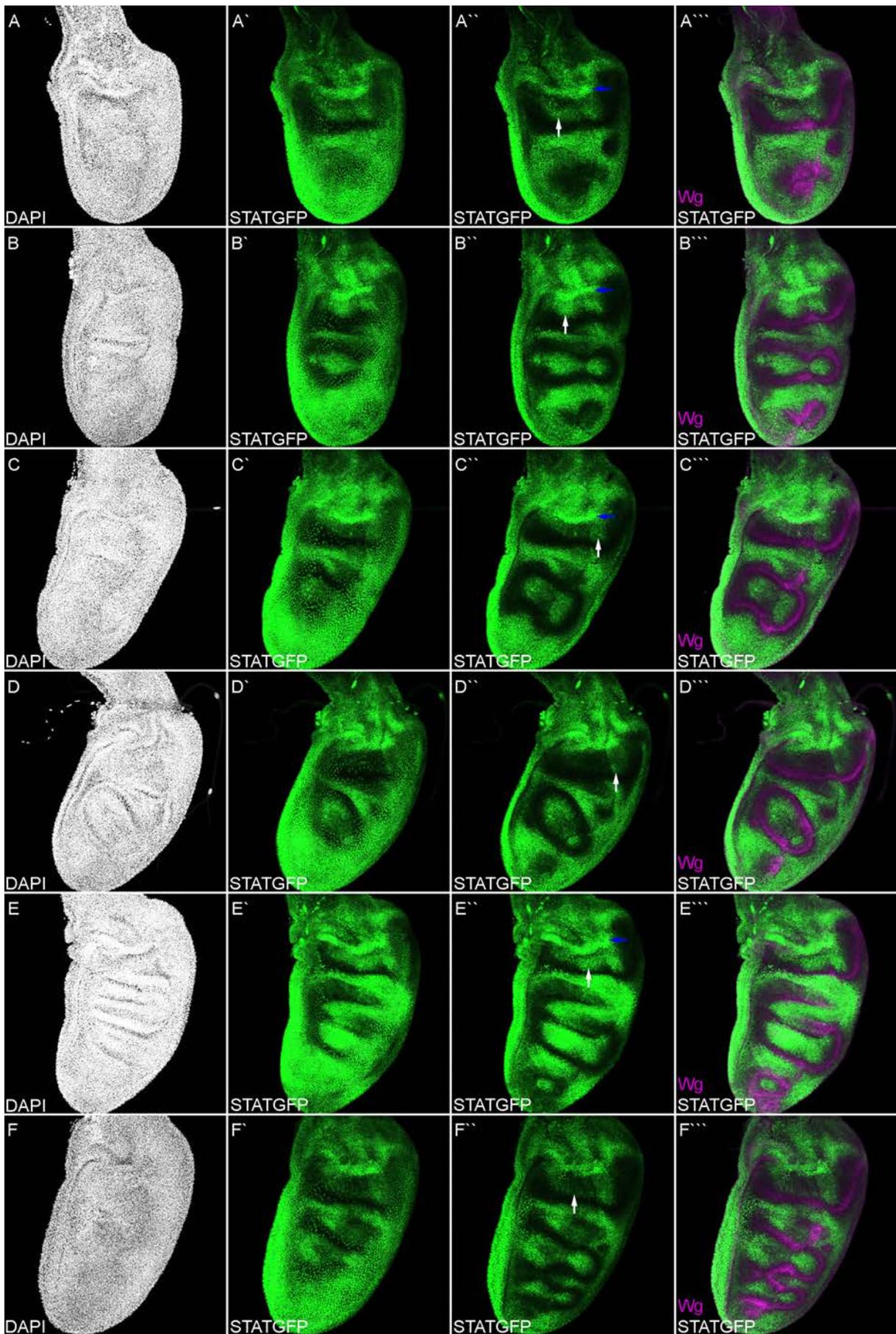


Abbildung 56 10xSTAT-GFP-Expression in *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben



Dargestellt sind *wt* (A), *bi* (B), *bi/omb*<sup>3198</sup> (C) und *I(1)omb*<sup>3198</sup> (D) L3 Flügelimaginalscheiben. (A-D) Überlagerung des 10xSTAT-GFP (Grün) und anti-Wg (Magenta) Signals.. (A'-D') Die drei apikalen Falten (B/H, H/H, H/N) und die zwei basalen Falten (dbH, pbH) in der dorsalen hinge sind markiert. In den Bildern (A-D) ist anterior links und dorsal oben, in den XZ-Bilder (A'-D') ist apikal links und basal rechts. Weiße Linien in A-D markieren die Positionen der XZ-Schnitte in A'-D'.

Die drei apikalen Falten (B/H, H/H, H/N) und die beiden basalen Falten (dbH, pbH) der dorsalen hinge von L3 Flügelscheiben können als Ergebnis einer ziehharmonikaartigen Anordnung des Hauptepithels in diesem Bereich betrachtet werden. In *wt* L3 Flügelscheiben wiesen alle Falten der dorsalen hinge eine vergleichbare Tiefe auf. Anhand der XZ-Bilder wurde festgestellt, dass in *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben die Morphologie der Falten in der dorsalen hinge häufig gestört war.

In *omb* hypomorphen Flügelscheiben des mittleren-späten L3 Stadiums waren die Falten – apikalen wie auch basalen Falten, der dorsalen hinge – häufig am Scheitel erweitert (Abb. 57 B, C; Abb. 58 G-L; Abb. 59) – d.h. apikale Falten waren basal und basale Falten apikal verbreitert. Der Begriff Scheitel ist der Geologie entlehnt und bezeichnet hier den tiefsten Punkt einer Falte. In *bi* Flügelscheiben wurde meist eine Erweiterung in der H/H- und dbH-Falte festgestellt und in geringerem Ausmaß auch in der B/H-Falte (Abb. 58 G-L). In *bi/omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben wurde ebenfalls meist eine Erweiterung in der H/H- und dbH-Falte festgestellt, aber in vergleichbarem Ausmaß auch in der B/H-Falte und in geringerem Ausmaß in der pbH-Falte (Abb. 59). Der Phänotyp war also hinsichtlich der proximo-distalen Ausdehnung innerhalb der dorsalen hinge in *bi/omb*<sup>3198</sup> stärker ausgeprägt als in *bi*. Demzufolge kam es bei Abnahme des *Omb* Niveaus zu einer Verstärkung des Faltenphänotyps – auch bezüglich dessen Ausdehnung in der dorsalen hinge. Es ist wahrscheinlich, dass in der freien, ungequetschten Imaginalscheibe breite Falten als tiefe Falten vorliegen. Der Faltenphänotyp in der dorsalen hinge schien im medialen Bereich stärker ausgeprägt als im lateralen Bereich. Die Ausprägung wurde auch mit dem Alter der Flügelscheiben stärker (Abb. 58 G-L; Abb. 59). Die Erweiterung der Falten am Scheitel resultierte in einigen Flügelscheiben in einer teilweisen Überlagerung des Hauptepithels in der dorsalen hinge (siehe beispielsweise Abb. 58 J'; Abb. 59 E). Aufgrund der Nähe der 10xSTAT-GFP-Expression (in *wt* in Domäne 3 und 4) zur Wg-IR-Expression (in *wt* in Domäne 2) (Abb. 55 A; Abb. 57 A'), ist es wahrscheinlich, dass eine Überlagerung des Hauptepithels für die Überlappung beider Expressionsdomänen, in den Maximalprojektionen von *omb* hypomorphen Flügelscheiben, zumindest mitverantwortlich ist (Abb. 55 B, C; Abb. 57 B', C'). In einigen wenigen Fällen war die Breite der Falte nicht am Scheitel (der tiefste Punkt einer Falte) sondern auf der gegenüberliegenden Seite erweitert, sodass der Öffnungswinkel der Falte größer war, im Vergleich zu *wt* (siehe beispielsweise Abb. 58 L' (H/N-Falte); Abb. 59 E' (H/N- und pbH-Falte)).

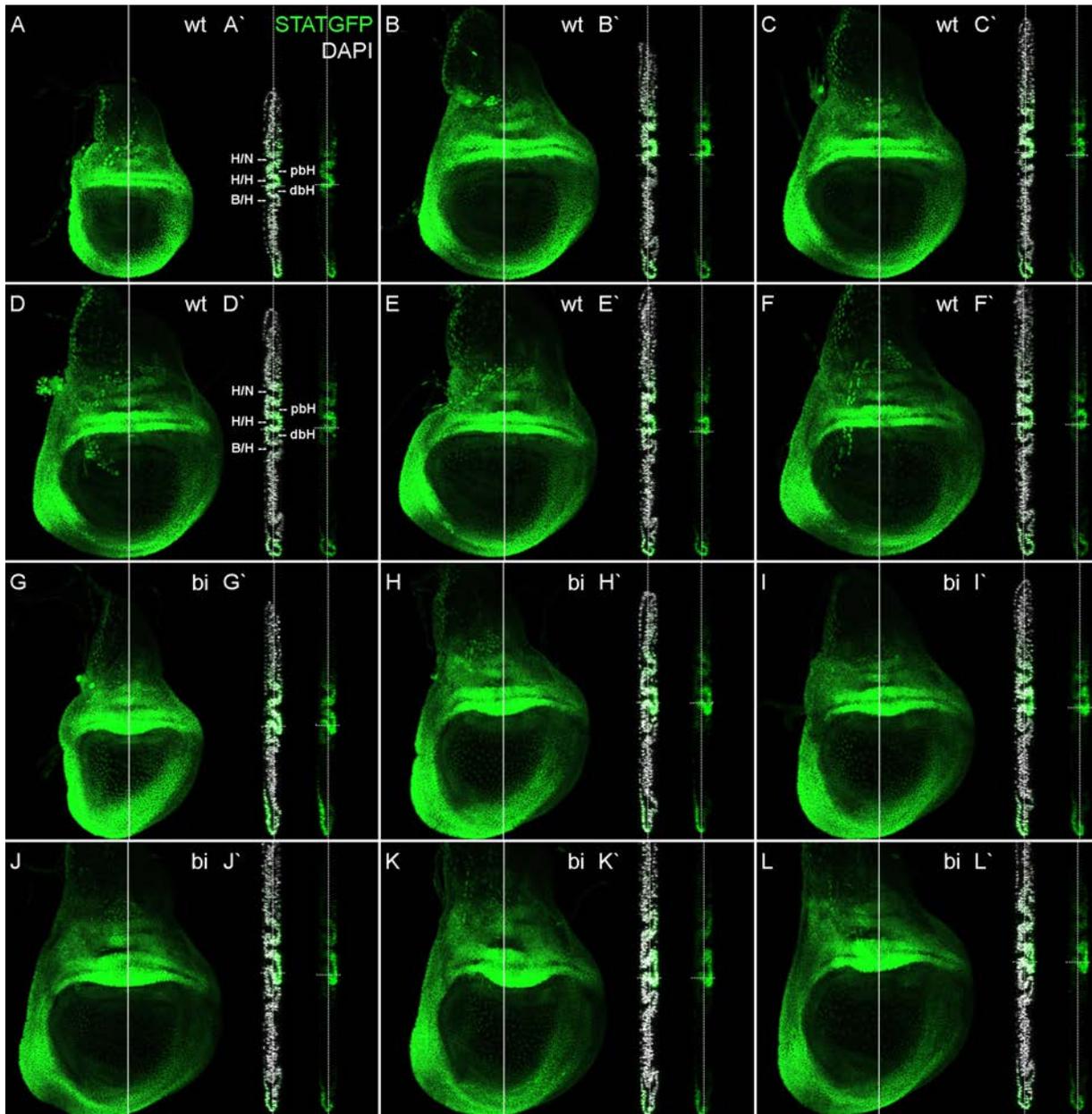


Abbildung 58 10xSTAT-GFP-Expression in XZ-Bildern von *wt* und *bi* Flügelscheiben

Dargestellt sind *wt* (A-F) und *bi* (G-L) L3 Flügelimaginalscheiben. (A-L') 10xSTAT-GFP (Grün), DAPI (Weiß; A'-L'). (A', D') Die drei apikalen Falten (B/H, H/H, H/N) und die zwei basalen Falten (dbH, pbH) in der dorsalen Hinge sind markiert. In den Maximalprojektionen von Z-Bildstapeln (A-L) ist anterior links und dorsal oben, in den XZ-Bildern (A'-L') ist apikal links und basal rechts. Weiße Linien in A-L markieren die Positionen der XZ-Schnitte in A'-L'.

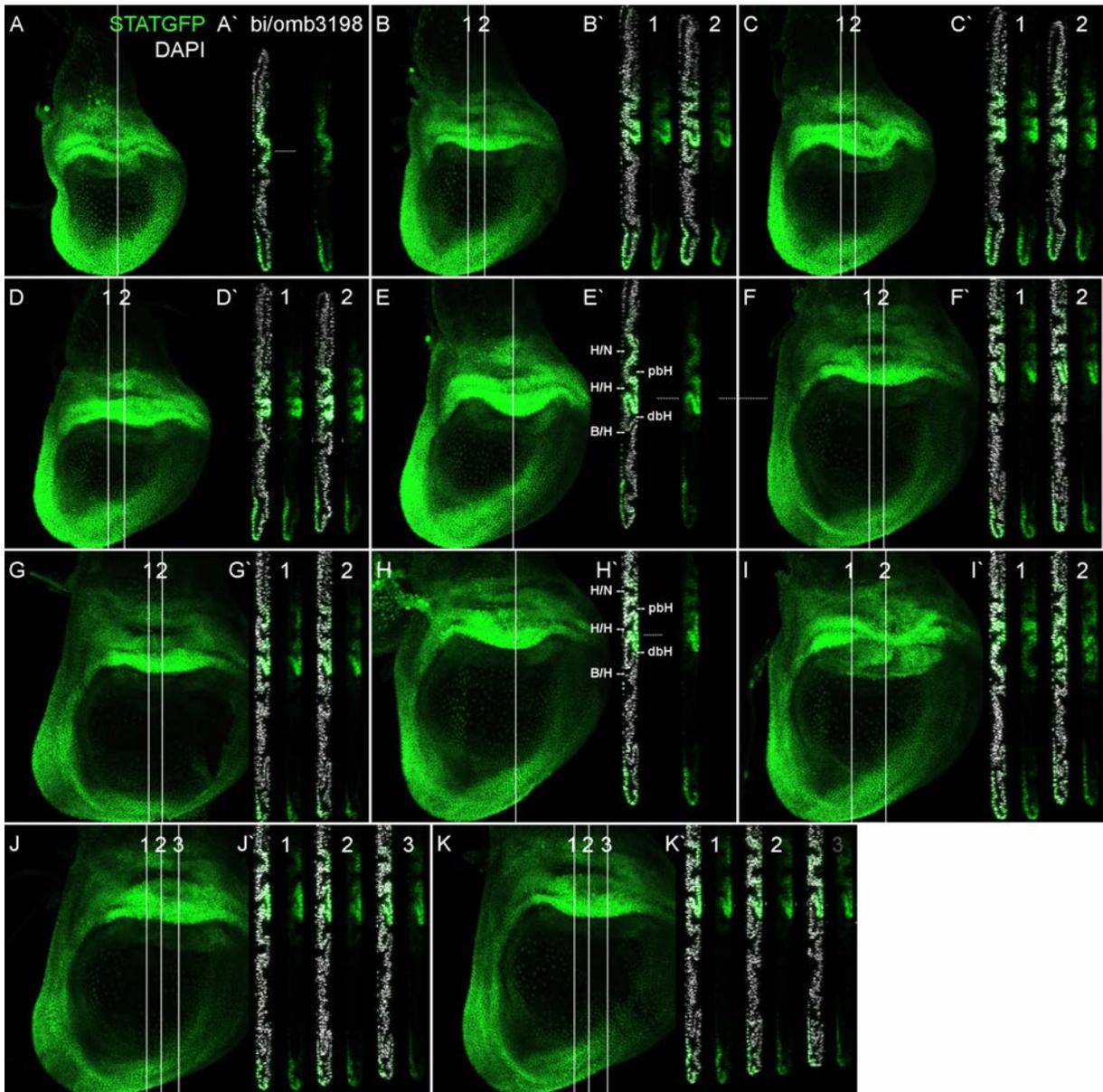


Abbildung 59 10xSTAT-GFP-Expression in XZ-Bildern von *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
 Dargestellt sind *bi/omb<sup>3198</sup>* (A-K) L3 Flügelimaginalscheiben. (A-K') 10xSTAT-GFP (Grün), DAPI (Weiß; A'-L'). (E', H') Die drei apikalen Falten (B/H, H/H, H/N) und die zwei basalen Falten (dbH, pbH) in der dorsalen Hinge sind markiert. In den Maximalprojektionen von Z-Bildstapeln (A-K) ist anterior links und dorsal oben, in den XZ-Bildern (A'-K') ist apikal links und basal rechts. Weiße Linien in A-K markieren die Positionen der XZ-Schnitte in A'-K'.

In der dorsalen Hinge von *wt* L3 Flügelscheiben ist die 10xSTAT-GFP Reporteraktivität in den basalen Zellen der Falten am höchsten, mit einer höheren Gesamtaktivität in der H/H- als in der H/N-Falte (Johnstone et al., 2013). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung der 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz innerhalb der dorsalen Hinge in L3 Flügelscheiben der Serie *wt*, *bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>* untersucht. In Übereinstimmung mit den Literaturergebnissen wurde in *wt* L3 Flügelscheiben eine höhere Aktivität des 10xSTAT-GFP Reporters in den basalen Zellen der Falten der dorsalen Hinge beobachtet (Abb. 58 A-F). In *bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben war ebenfalls eine lokalisierte 10xSTAT-GFP Reporteraktivität in den Falten der dorsalen Hinge detektierbar (Abb. 58 G-L; Abb. 59 A-K). In *omb* hypomorphen Flügelscheiben schien die Reporteraktivität stärker polarisiert als in *wt* –

d.h. in apikalen Zellen schwächer und in basalen Zellen stärker (Abb. 58; Abb. 59).

Die untersuchten *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben zeigten einen variablen Faltungsphänotyp – d.h. der Faltungsphänotyp variierte von Scheibe zu Scheibe (siehe DAPI Kernfärbung Anhang Abb. 100) – in der dorsalen hinge als auch in der distalen Flügelscheibe (Abb. 57 D). Zumeist schloss der Faltungsphänotyp eine ektopische Faltenbildung (d.h. Auffaltung des Hauptepithels) in der distalen Flügelscheibe in Kombination mit einer stärkeren Auffaltung des Hauptepithels in der dorsalen hinge oder aber einer Verbreiterung der Falten – bei gleichzeitiger Erweiterung am Scheitel und auf der gegenüberliegenden Seite – in der dorsalen hinge ein. In einigen wenigen L3 Flügelscheiben wurde aber auch eine verminderte Faltenbildung (also eine reduzierte Auffaltung) in der dorsalen hinge beobachtet (nicht gezeigt).

#### 4.8.2 Systemischer *omb*-Verlust und *STAT92E-lacZ*-Expression

*STAT92E* ist das einzige *STAT*-Gen in *Drosophila*. Die Enhancer-Trap-Linie *STAT92E-lacZ* zeigte, nach X-Gal Färbung, in *wt* L3 Flügelscheiben eine schwache ringförmige Färbung um die pouch und eine deutlich stärkere Färbung in der dorsalen hinge und im Notum (Abb. 60 A, B). In *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben wurde eine ektopische Färbung in der Pleura beobachtet, die starke Färbung in der dorsalen hinge war auf das Zentrum beschränkt und die ringförmige Färbung um die pouch war nicht erkennbar (Abb. 60 C, D). Die Expression von *STAT92E* wird durch die Aktivität des JAK/STAT-Signalweges reprimiert (Zeidler et al., 1999; Tsai et al., 2015). Dies erklärt das annähernd komplementäre Verhalten von *STAT92E-lacZ* und 10xSTAT-GFP.



Abbildung 60 Expressionsmuster von *STAT92E-lacZ* in *wt* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
Dargestellt sind *wt* (A-B) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (C-D) L3 Flügelimaginalscheiben. Die *STAT92E-lacZ*-Expression wurde mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben.

#### 4.8.3 Diskussion: JAK/STAT

In der *wt* L3 Flügelscheibe war die am weitesten distal gelegene Aktivität des JAK/STAT-Signalwegs in der Domäne 2 der dorsalen hinge nachweisbar (Abb. 55 A). Jedoch wurde in diesem Bereich nur eine sehr schwache Signalaktivität detektiert. Mit abnehmendem *Omb* Niveau nahm die Aktivität des JAK/STAT-Signalwegs – die anhand der Intensität der 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz untersucht wurde – in Domäne 2 der dorsalen hinge zu (Abb. 55). *omb* Nullmutante L3 Flügelscheiben zeigten zusätzlich zu einem deutlichen Aktivitätsanstieg eine distale Verlagerung der JAK/STAT-Signalaktivität im Bereich der dorsalen pouch/hinge, sodass der Abstand zur D/V-Grenze verringert war (Abb. 55 D;

Abb. 56). Diese Verlagerung resultierte aus einer veränderten Ausdehnung und Lokalisation der Signalaktivität – entlang der P-D Achse. In der vorliegenden Arbeit wurde bei mehreren untersuchten Genen, ein verändertes Expressionsmuster im Bereich der dorsalen pouch/hinge in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben beobachtet (z.B. Wg-IR). Im Unterschied zur Aktivitätssteigerung des JAK/STAT-Signalwegs, wurde bei den meisten hinge-spezifischen Genexpressionen eine reduzierte Expressionsstärke – vorwiegend im medialen Bereich der dorsalen pouch/hinge – beobachtet. So kam es dort zu einer Reduktion oder Unterbrechung (Verlust) der Expression von: *trn-lacZ* (Abb. 29), *caps-lacZ* (Abb. 30), *hth-lacZ* (Abb. 49, Abb. 50), *tsh-lacZ* (Abb. 52) und *Zfh2* (Abb. 46). Dahingegen wurde bei *kek1-lacZ* – in der medialen Flügelscheibe – eine Expansion der Expression von der dorsalen hinge in die distale Flügelscheibe (pouch) festgestellt (Abb. 33). Die Immunfluoreszenz gegen Wg, in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben, zeigte häufig eine starke Reduktion oder Unterbrechung in der Wg-IR-Expression wie auch eine Verlagerung der hinge spezifischen Expression von proximal – der dorsalen hinge – nach distal (siehe beispielsweise Abb. 37). Ferner war auch das pouch-spezifische Expressionsmuster von Nab, in einigen *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben, in der dorsalen pouch reduziert (Anhang Abb. 95 und Abb. 96).

Eine veränderte Lokalisation (d.h. distale Verlagerung) der JAK/STAT-Signalaktivität sowie der hinge-spezifischen Expression von Wg deutet darauf hin, dass die normale Spezifizierung und Differenzierung der Zellen in der dorsalen Hälfte der pouch sowie der dorsalen hinge bei *omb* Nullmutanten gestört sein könnte.

Es wurde berichtet, dass eine verminderte Wg-Signalisierung die Aktivität des JAK/STAT-Signalwegs in der hinge hemmt, während eine ektopische Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs die Wg-Expression in der hinge nicht beeinträchtigt (Ayala-Camargo et al., 2013). In der *wt* L3 Flügelscheibe überlappt die 10xSTAT-GFP-Expression die Wg- und Hth-Expression in der hinge, während des L3 Stadiums. Es wurde vorgeschlagen, dass in der hinge Wg und Hth in der genetischen Hierarchie oberhalb (upstream) der Stat92E-Aktivität stehen. So zeigen in der proximalen pouch lokalisierte Hth-exprimierende Klone, häufig eine erhöhte JAK/STAT-Signalaktivität, während in der hinge lokalisierte *hth* mutante Klone zum Verlust der 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz führen (Ayala-Camargo et al., 2013). Klone mit einer reduzierten Wg-Signalisierung, aufgrund der Überexpression einer dominant-negativen Form von TCF (TCFDN), zeigen eine zellautonome Reduktion der 10xSTAT-GFP-Expression, in der dorsalen hinge (Ayala-Camargo et al., 2013). Entgegen der Erwartung wurde in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben – im medialen Bereich der der dorsalen pouch/hinge – eine Reduktion der Wg-IR- und Hth-Expression (Abb. 50 D) festgestellt, jedoch eine höhere Aktivität von Stat92E (Abb. 55). In den entsprechenden Domänen der dorsalen hinge – vorwiegend in Domäne 2 und 3 – fand sich eine Signalverstärkung des JAK/STAT-Signalwegs (Abb. 55 D; Abb. 56), im Vergleich zu *wt* L3 Flügelscheiben (Abb. 55 A; Abb. 53).

#### JAK/STAT-Signalisierung in der distalen Flügelscheibe

Eine ektopische Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs in der distalen Flügelscheibe, z.B. durch eine ektopische Expression von *upd* in der pouch, führt zu kleinen, verkümmerten Flügelblättern (Ayala-Camargo et al., 2013). Dies verdeutlicht, dass eine distale Erweiterung der JAK/STAT-Signalaktivität

die Flügelblattentwicklung beeinträchtigt und dass der Aktivitätsbereich auf die hinge beschränkt werden muss, damit eine korrekte Flügelentwicklung stattfinden kann. Dies steht im Einklang mit der Veränderung des Aktivitätsmusters des 10xSTAT-GFP Reporters in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben – also einer starken ektopischen STAT92E-Aktivität, in großen Bereichen der distalen Flügelscheibe – sowie mit dem Flügelphänotyp von von pharat-adulten *omb* Nullmutanten (Abb. 3 D).

Der distale Faktor Nub inhibiert die Expression von *upd* wie auch die Aktivität von Stat92E in der Flügelimaginalscheibe (Ayala-Camargo et al., 2013). So zeigen Klone, die ektopisch Nub exprimieren, einen zellautonomen Verlust der JAK/STAT-Signalwegaktivität in der hinge, wohingegen in *nub* mutanten Klonen, die in der (proximalen) pouch lokalisiert sind, der JAK/STAT-Signalweg ektopisch aktiviert wird (Ayala-Camargo et al., 2013). Umgekehrt bewirkt eine ektopische JAK/STAT-Signalisierung nur eine moderate Repression von Nub in der pouch (Ayala-Camargo et al., 2013). Die Begrenzung der JAK/STAT-Signalisierung auf die hinge, wird vermutlich durch mehrere distale Faktoren vermittelt. Ayala-Camargo und Kollegen formulierten ein Model, in dem mehrere distale Faktoren die JAK/STAT-Signalisierung auf die hinge beschränken, um eine korrekte Flügelentwicklung zu ermöglichen (Ayala-Camargo et al., 2013). Dementsprechend führt auch eine Fehlexpression von Rn in der dorsalen hinge zu einer Reduktion der 10xSTAT-GFP Reporteraktivität (Ayala-Camargo et al., 2013). Ayala-Camargo und Kollegen interpretierten die Ergebnisse ihrer Studie dahingehend, dass Upd und die Aktivität des TF Stat92E nicht mit der pouch Identität vereinbar ist (Ayala-Camargo et al., 2013). Diese Interpretation passt zu der Situation in der distalen Flügelscheibe von *omb* Nullmutanten – insbesondere im Bereich der dorsalen pouch/hinge. Der Aktivitätsanstieg sowie die distale Verlagerung der JAK/STAT-Signalaktivität, im Bereich der dorsalen pouch/hinge in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben, könnte möglicherweise auf eine gestörte Rekrutierung von pouch Zellen, während der Flügelscheibenentwicklung, hindeuten (vgl. Wu und Cohen, 2002; Zecca und Struhl, 2007b, 2010).

#### JAK/STAT-Signalisierung und Faltenbildung in der dorsalen hinge

In *w<sup>t</sup>* L3 Flügelscheiben weisen die Falten der dorsalen hinge eine vergleichbare Tiefe auf. In *os<sup>0</sup>* mutanten Flügelscheiben ist die Morphologie der H/N-Falte hingegen häufig gestört (Johnstone et al., 2013). *os* (*outstretched*), basierend auf genetischen Komplementationstests und phänotypischer Ähnlichkeit, ist ein Allel von *upd*. So haben beispielsweise *upd3* Mutanten einen mit *os<sup>0</sup>* vergleichbaren Phänotyp (Wang et al., 2014). In *os<sup>0</sup>* Flügelscheiben ist die Expression von *upd* im Bereich der dorsalen H/N Falte eliminiert. Die Expression von *upd2* und *upd3* wurde nicht untersucht; allerdings reicht der nachgewiesene Verlust der *upd*-Expression, um 10xSTAT-GFP im Bereich der H/N Falte zu eliminieren (Johnstone et al., 2013). *upd* und *upd3* haben in vielen Geweben ein überlappendes Expressionsmuster. In Flügelimaginalscheiben konnte *upd3*-Expression durch *in situ* Hybridisierung nicht nachgewiesen werden (Wang et al., 2014). In *os<sup>0</sup>* Flügelimaginalscheiben ist die Tiefe der H/N Falte mit variabler Expressivität reduziert; im Extremfall fehlt die Falte. Eine leichte Reduktion der Faltentiefe kann mit einer apikalen Verbreiterung der Falte einhergehen (Johnstone et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des JAK/STAT-Signalwegs im Bereich der H/N-Falte für die normale H/N-Faltenentwicklung notwendig ist, und dass eine Reduktion der

JAK/STAT-Signalisierung in der HN-Falte ausreichend ist um einen *os* Flügelgelenkphänotyp zu kopieren (Johnstone et al., 2013).

Im Vergleich zu *wt* war in *omb* mutanten L3 Flügelscheiben sowohl eine Beeinträchtigung der Faltenmorphologie als auch der JAK/STAT-Signalaktivität feststellbar. In der dorsalen hinge von *omb* hypomorphen (*bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup>) L3 Flügelscheiben wurde ein Anstieg der JAK/STAT-Signalaktivität vor allem im Bereich der H/H-Falte beobachtet, während im Bereich der H/N-Falte die 10xSTAT-GFP-Fluoreszenz großteils unregelmäßig erschien. In einigen *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben kam es zu einer teilweisen Reduktion der Reporteraktivität in der H/N-Falte. Die Morphologie der Falten – in der dorsalen hinge – war in *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup> mutanten L3 Flügelscheiben dahingehend verändert, dass die Falte an ihrer Basis erweitert war. Eine entsprechende Erweiterung wurde häufig in der medialen Falte (H/H; in *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup>) und in den beiden distalen Falten (B/H, dbH; in *bi/omb*<sup>3198</sup>) aber nur selten in den beiden proximalen Falten (H/N, pbH) der dorsalen hinge beobachtet. Während in der H/H-Falte eine starke Fluoreszenz des 10xSTAT-GFP Reporters detektierbar war, konnte in der B/H- und dbH-Falte hingegen keine deutliche Fluoreszenz festgestellt werden; vielmehr kam es im zwischenliegenden Bereich, in Domäne 2 der dorsalen hinge, zu einer Zunahme der Fluoreszenz – was nur in der Maximalprojektion (von Z-Bildstapeln) der Flügelscheibe erkennbar war.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Abnahme des *Omb* Niveaus (in der Serie *wt*, *bi*, *bi/omb*<sup>3198</sup>) eine tendenzielle Zunahme der JAK/STAT-Signalaktivität in den Domänen 2-4 wie auch eine Verstärkung des Faltenphänotyps (Erweiterung der Falte am Scheitel) in der H/H-, B/H- und dbH-Falte bewirkte. Demzufolge zeigten jene Falten, in der dorsalen hinge von *omb* hypomorphen L3 Flügelscheiben, häufig eine veränderte Faltenmorphologie, die in einem Bereich mit einer verstärkten JAK/STAT-Signalaktivität positioniert waren. Dies legt eine mögliche Korrelation der Aktivität des JAK/STAT-Signalwegs und der Faltenmorphologie in *omb* mutanten Flügelscheiben nahe. Auch steht diese Annahme im Einklang mit der Funktion des JAK/STAT-Signalwegs bei der Bildung der H/N-Falte und einer reduzierten Faltentiefe bei verminderter JAK/STAT-Signalisierung (wie in der H/N-Falte beobachtet) (siehe Johnstone et al., 2013).

Aufgrund der Ergebnisse sollte eine Beeinträchtigung der JAK/STAT-Signalisierung – in der dorsalen hinge – als mögliche Ursache für den Gelenkphänotyp von *bifid* Mutanten in Betracht gezogen werden.

Hinsichtlich der Fluoreszenzfärbung des 10xSTAT-GFP Reporters in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben ist zu bemerken, dass der Eindruck dominierte, dass die veränderte Faltenmorphologie, in der dorsalen hinge, das Fluoreszenzmuster zu beeinträchtigen schien. Dies war insbesondere im proximalen Bereich der dorsalen hinge der Fall. Ferner besteht die Möglichkeit, dass die veränderte JAK/STAT-Signalaktivität für die morphologischen Veränderungen in *omb* mutanten Flügelscheiben mitverantwortlich sein könnte.

#### 4.9 Proliferation und Apoptose

Die Proliferation in der Flügelimaginalscheibe wird durch mehrere Signalwege gesteuert. Im Allgemeinen werden die EGFR, Wnt/Wg, Notch und TGF- $\beta$ /Dpp Signalwege als wachstumsfördernd und der Hippo Signalweg als wachstumshemmend angesehen (Molnar et al., 2011b; Brummel et al.,

1999). Jedoch unterscheiden sich ihre Wirkungen je nach Region, Entwicklungsstadium und Grad der Aktivität des Signalweges. Dementsprechend wirken in der pouch der Flügelscheibe mittlere Niveaus von Wg als permissives Signal für die Zellproliferation, während ein hohes Wg Niveau die Zelldifferenzierung induziert (Baena-Lopez et al., 2009). In der hinge fördert Wg die Proliferation auch bei hohen Konzentrationen (Dichtel-Danjoy et al., 2009). Die Wg-Signalisierung scheint daher in der pouch und in den weiter proximal gelegenen Regionen der Flügelimaginalscheibe (hinge und Notum) unterschiedliche mitogene Reaktionen hervorzurufen (Whitworth und Russell, 2003). So führt die ektopische Expression von Wg in den proximalen Regionen der Flügelscheibe (hinge und Notum) zu einem Überwachsen des Gewebes, eine Überexpression in der pouch hat hingegen keinen vergleichbaren Effekt (Neumann und Cohen, 1996a; Russell, 2000; Whitworth und Russell, 2003). Die Expression von Wg in der wg-IR- und wg-OR-Domäne ist für die lokale Zellproliferation in der hinge erforderlich (Neumann und Cohen, 1996a; Perea et al., 2009). Infolge der Zellproliferation verschieben sich die wg exprimierenden Zellen des inneren und äußeren Rings nach proximal und entfernen sich damit von den vg exprimierenden Zellen der distalen Flügelscheibe (del Alamo Rodriguez et al., 2002; Terriente et al., 2008). Die lokale Proliferation in der hinge liegt auch dem Wachstum der gap-Domäne zugrunde, wodurch sich die wg-IR- und wg-OR-Domänen voneinander entfernen. Die JAK/STAT Signalisierung ist für die Proliferation in der hinge essentiell (Mukherjee et al., 2005). Dpp hemmt die Proliferation in der medialen Flügelscheibe und fördert die Proliferation in den lateralen Bereichen der pouch (Zhang et al., 2013). Im *wt* ist die Proliferation in der Flügelimaginalscheibe weitgehend gleichmäßig. Omb trägt zu einem gleichmäßigen Wachstum in der Flügelscheibe bei, da der Dpp-Signalweg über *omb* die Proliferation regionspezifisch kontrolliert (Zhang et al., 2013). Als Zielgen von Dpp vermittelt *omb* die regionale Proliferation in der Flügelimaginalscheibe über die Transkriptionskontrolle des microRNA Gens *bantam* (*ban*), indem Omb die Expression von *ban* in medialen Regionen reprimiert und in lateralen Regionen fördert (Zhang et al., 2013). Das Gen *ban* kodiert eine microRNA (miRNA), die in *Drosophila* als wachstumsfördernder Faktor gilt, da *ban* die Zellproliferation fördert und gleichzeitig die Apoptose hemmt (Brennecke et al., 2003). Der Fat-Hippo Signalweg reguliert ebenfalls die Expression von *ban* um das Wachstum zu kontrollieren (Nolo et al., 2006; Thompson und Cohen, 2006). Für den Dpp-Signalweg wurde eine synergistische Interaktion mit dem Fat-Hippo Signalweg beschrieben (Oh und Irvine, 2011). Dabei wirken Dpp über den Transkriptionsfaktor Mad und der Fat-Hippo Signalweg über den Transkriptionsfaktor Yorkie um die Transkription von *ban* zu regulieren und das Wachstum zu fördern (Oh und Irvine, 2011).

#### 4.9.1 Systemischer *omb*-Verlust und Proliferation

Die Untersuchung der Zellproliferation erfolgte unter Verwendung des Proliferationsmarkers EdU in Imaginalscheiben der Serie *wt*, *bi*, *bi/omb*<sup>3198</sup> und *l(1)omb*<sup>3198</sup> (Abb. 61; Abb. 62). Die EdU Färbung ergab eine gleichmäßige Proliferation in *wt* L3 Flügelscheiben (Abb. 61 A). In späten L3 Flügelscheiben war die Zone nicht-prolierender Zellen (zone of non-proliferating cells, ZNC, O'Brochta und Bryant, 1985) erkennbar (Abb. 61 A). In Übereinstimmung mit der DAPI Kernfärbung waren in der EdU Färbung die Falten in der hinge, insbesondere die apikalen Falten der dorsalen

hinge, sichtbar. Im XZ-Schnitt – entlang der D-V Achse – erschien die EdU- wie auch die DAPI Färbung in den Falten gleichmäßig verteilt (nicht gezeigt).

In *bifid* L3 Flügelscheiben wurde ein Anstieg der Zellproliferation in der *omb* Expressionsdomäne festgestellt (dorsale hinge, anterior-ventrale hinge (Pleura), pouch; Abb. 61 B). Hiervon betroffen, war besonders die Pleura sowie ein zentraler Bereich in der dorsalen hinge – zwischen den basalen Falten (in Domäne 3 und 4). Innerhalb der pouch zeigte sich in unmittelbarer Nähe zur ektopischen Falte (welche entlang der A/P-Grenze verlief) eine erhöhte EdU Färbung (Abb. 61 B). Im XZ-Schnitt – entlang der D/V-Grenze – war die EdU Färbung im A- und P-Kompartiment der pouch etwa gleich stark ausgeprägt (nicht gezeigt).

Im Vergleich zu *wt* wurde in *bi/omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben ebenfalls eine Zunahme der Zellproliferation in der normalen *omb* Expressionsdomäne festgestellt (Abb. 61 C, D). Der Einfluss der ektopischen Falte (entlang der A/P-Grenze) auf die EdU Färbung in der pouch war in *bi/omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben weniger stark als in *bi* oder nicht erkennbar. In *bi/omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben wurde, in einem anterior-dorsal lokalisierten Bereich, eine niedrigere Zellproliferation beobachtet sowohl im Vergleich zu *wt* wie zu den umliegenden Bereichen.

In *I(1)omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben kam es ebenfalls – wie in *bi* und *bi/omb*<sup>3198</sup> – zu einem Anstieg der Zellproliferation in der normalen *omb* Expressionsdomäne. Hierbei wurde vor allem in der pouch und in der anterior-ventralen hinge (Pleura) eine starke Überproliferation festgestellt (Abb. 61 E, F; Abb. 62). Im Vergleich dazu war in der dorsalen hinge die Überproliferation häufig weniger stark ausgeprägt (Abb. 62). Im Vergleich zu *wt* wurde in *I(1)omb*<sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben häufig eine verminderte Zellproliferation außerhalb oder am Rand der normalen *omb* Expressionsdomäne detektiert (Abb. 62). In späten L3 Flügelscheiben war dies besonders gut ersichtlich (Abb. 62 D).

Die Ergebnisse stehen in Einklang mit den Folgerungen von Zhang und Kollegen (Zhang et al., 2013), die die *omb*-Expression durch regionale Knockdowns oder Überexpression manipuliert hatten. Danach unterdrückt Omb medial (d.h. in der Nähe der A/P-Grenze) die Proliferation, während Omb lateral die Proliferation stimuliert (Zhang et al., 2013).

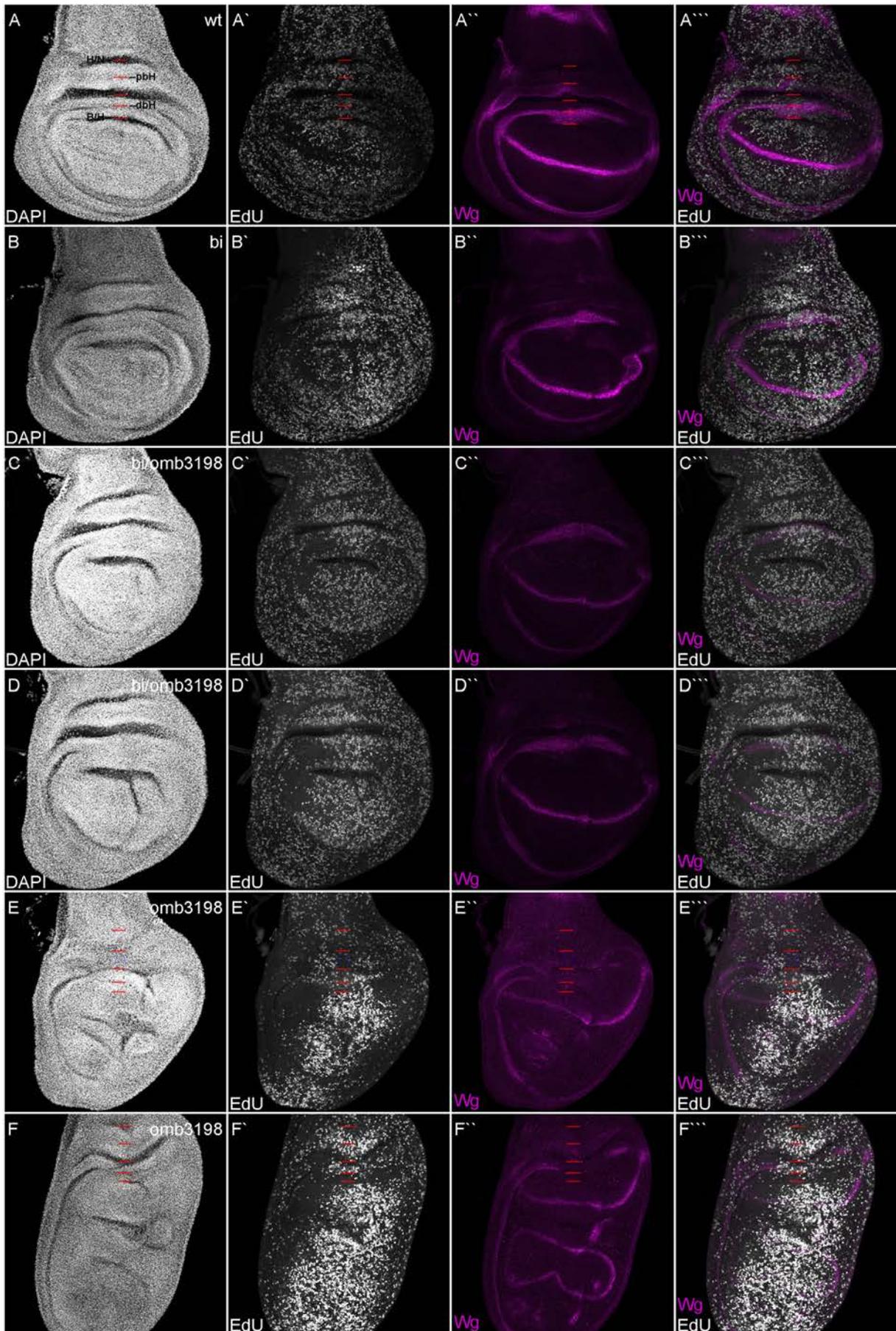


Abbildung 61 EdU Färbung und Wg-Expression in *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *wt* (A), *bi* (B), *bi/omb<sup>3198</sup>* (C, D) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (E, F) L3 Flügelimaginalscheiben. Die Flügelscheiben wurden mit einem Antikörper gegen Wg (A''-F'', Magenta) gefärbt, für DNA (A-F, DAPI) und inkorporiertes EdU (A'-F') das Zellen in der S-Phase anzeigt. (A'''-F''') Überlagerung des EdU (Weiß) und anti-Wg (Magenta) Signals. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A, E, F) Die drei apikalen Falten (B/H, H/H, H/N) und die zwei basalen Falten (dbH, pbH) in der dorsalen Hinge sind markiert. (A''-F''') Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

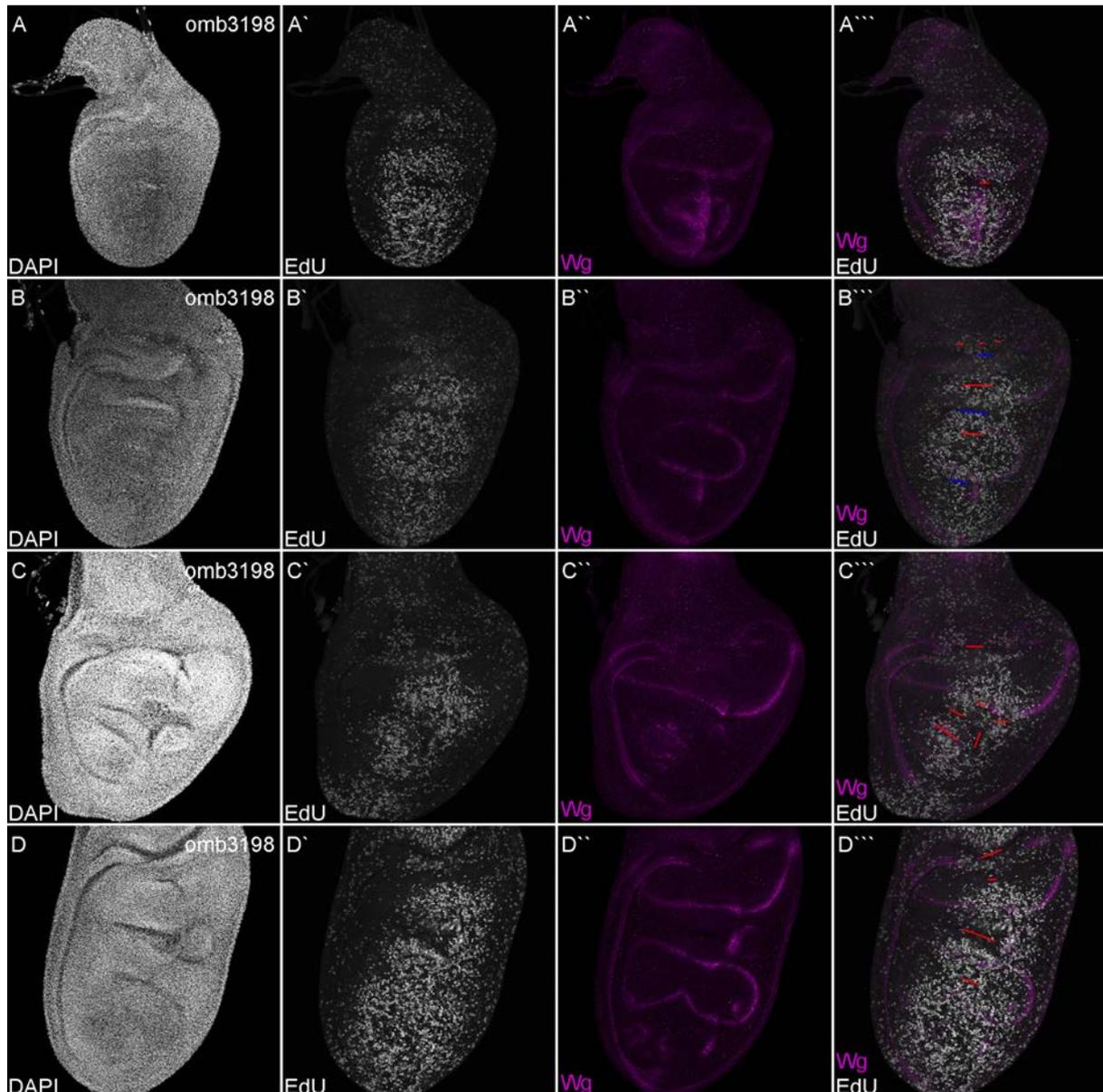


Abbildung 62 EdU Färbung und Wg-Expression *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *l(1)omb<sup>3198</sup>* (A-D) L3 Flügelimaginalscheiben. Die Flügelscheiben wurden mit einem Antikörper gegen Wg (A''-D''', Magenta) gefärbt, für DNA (A-D, DAPI) und inkorporiertes EdU (A'-D', A'''-D''') das Zellen in der S-Phase anzeigt. (A'''-D''') Überlagerung des EdU (Weiß) und anti-Wg (Magenta) Signals. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Apikale Falten (Auswahl) sind mit roten Balken markiert; basale Falten (Auswahl) sind mit blauen Balken markiert. (A''-F''') Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

Im Folgenden wird der räumliche Zusammenhang zwischen Proliferation (d.h. dem EdU Färbemuster) und der ektopischen Faltenbildung in der Flügelscheibe beschrieben. Sowohl die endogenen Falten in der dorsalen hinge als auch die ektopischen Falten innerhalb der pouch von L3 Flügelscheiben wurden anhand der Zellkernfärbung (DAPI) festgestellt (Abb. 62 und zugehörige Beschreibung). In der dorsalen hinge von wildtypischen als auch *omb* mutanten L3 Flügelscheiben wurde eine Beeinflussung des EdU Färbemusters durch endogene Falten, in Maximalprojektionen von Z-Bildstapeln, beobachtet (Abb. 61). Hierbei zeigten besonders die apikalen Falten einen prominenten Effekt auf die Verteilung des Proliferationsmarkers EdU. Aufgrund dessen wurden in Abb. 62 die Positionen einiger apikalen Falten von exemplarischen *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben markiert. Wie auch in Abb. 62 zu sehen, war der Einfluss der ektopischen Falten auf das EdU Färbemuster nur gering (im Vergleich zur Immunfluoreszenzfärbung von cDcp1 (cleaved Caspase Dcp-1); siehe 4.9.2). Außerdem ist die geringe Anzahl EdU-positiver Zellen, in unmittelbarer Nähe der Falten, wahrscheinlich auf eine niedrige Anzahl an Zellkernen im Bereich der Falten zurückzuführen (Abb. 62).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es sowohl in *omb* hypomorphen als auch in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben zu einem Anstieg der Zellproliferation innerhalb der normalen *omb* Expressionsdomäne kommt.

#### 4.9.2 Systemischer *omb*-Verlust und Apoptose

In folgendem Experiment wurde Apoptose durch Immunfluoreszenz gegen gesplattene Caspase Dcp-1 (cDcp-1) detektiert, in Imaginalscheiben der Serie *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (Abb. 63; Abb. 64). In wildtypischen L3 Flügelscheiben wurde nur in wenigen Zellen des Hauptepithels, die vorwiegend in der pouch lokalisiert waren, Apoptose nachgewiesen (Abb. 63 A, B). Auffällig war eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen in der Trachee (Tracheenast der Tr2) und in dem Luftsack Primordium (ASP, air sac primordium) in Übereinstimmung mit Guha und Kornberg (Guha und Kornberg, 2005). Sowohl Trachee, ASP und Myoblasten (Zellen die später die Flugmuskelzellen bilden) sind an der basalen Seite der Imaginalscheibe angelagert.

In *bifid* L3 Flügelscheiben wurde in der pouch und in der dorsalen hinge eine höhere Anzahl apoptotischer Zellen detektiert (Abb. 63 C, D). In der pouch war das cDcp-1 Signal häufig mit der ektopischen Falte (entlang der A/P-Grenze) assoziiert. Dieser Phänotyp konnte sowohl in *bifid* als auch in *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben beobachtet werden (Abb. 63 D-F). In *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben war sowohl in der pouch als auch in der dorsalen hinge ein genereller Anstieg an apoptotischen Zellen zu beobachten (Abb. 63 E, F). In der Mehrzahl dieser Flügelscheiben (8 von 12) war der Großteil der apoptotischen Zellen in der anterioren Hälfte der dorsalen hinge lokalisiert, entweder in Höhe der H/H-Falte oder distal der H/H-Falte.

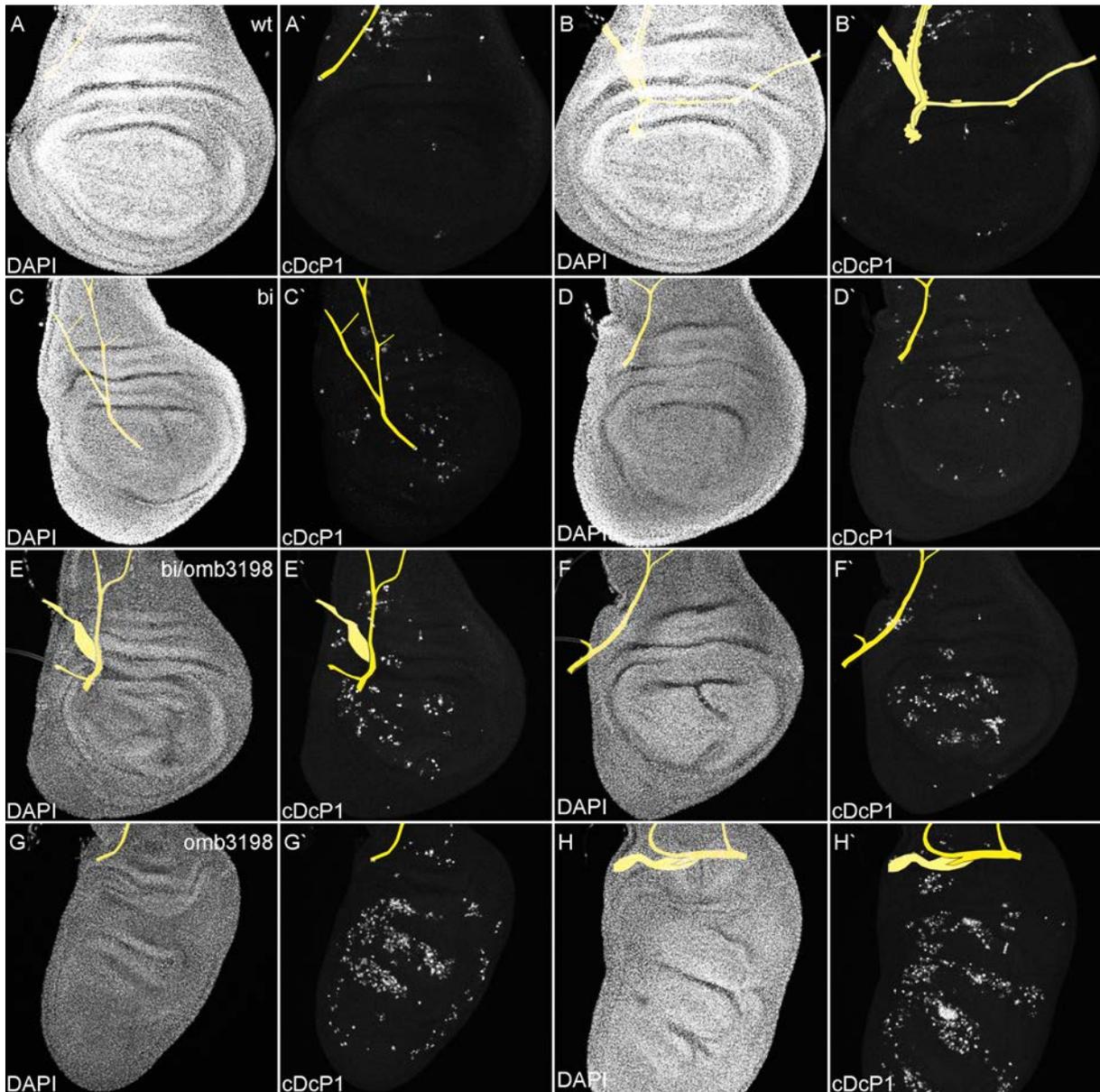


Abbildung 63 Apoptose in *wt*, *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben  
 Dargestellt sind *wt* (A, B), *bi* (C, D), *bi/omb<sup>3198</sup>* (E, F) und *l(1)omb<sup>3198</sup>* (G, H) L3 Flügelimaginalscheiben. Die Flügelscheiben wurden mit einem Antikörper gegen gesplante Caspase DcP1 (A'-H') und DNA (A-H) gefärbt. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur. Tracheen sind gelb markiert.

Die Anzahl von Zellen die eine Apoptose durchlaufen, war in *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben sehr hoch (Abb. 63 G, H; Abb. 64). Ungeachtet der morphologischen Defekte war in einigen Flügelscheiben ein Muster erkennbar. Hierbei wurde jeweils eine hohe Zahl cDcp-1 positiver Zellen in folgenden Bereichen der Flügelscheibe beobachtet: in der lateralen Flügelscheibe parallel der D-V Achse (stärker ausgeprägt im A- als im P-Kompartiment) (Abb. 63 G, H; gelbe Pfeile in Abb. 64) und innerhalb der pouch in Verbindung mit ektopischen Falten, welche entlang der A-P Achse verliefen (gelbe Pfeilspitzen in Abb. 64). In Flügelscheiben mit dem hier beschriebenen Muster wurden entweder keine oder nur vereinzelt apoptotische Zellen im medialen Bereich der dorsalen hinge detektiert (Abb. 64). Dahingegen zeigten *l(1)omb<sup>3198</sup>* L3 Flügelscheiben, die aufgrund ihrer Größe und

den damit einhergehenden drastischen morphologischen Defekten einem sehr späten L3 Stadium zugeordnet wurden, in allen Regionen Apoptose, einschließlich der hinge (nicht gezeigt).

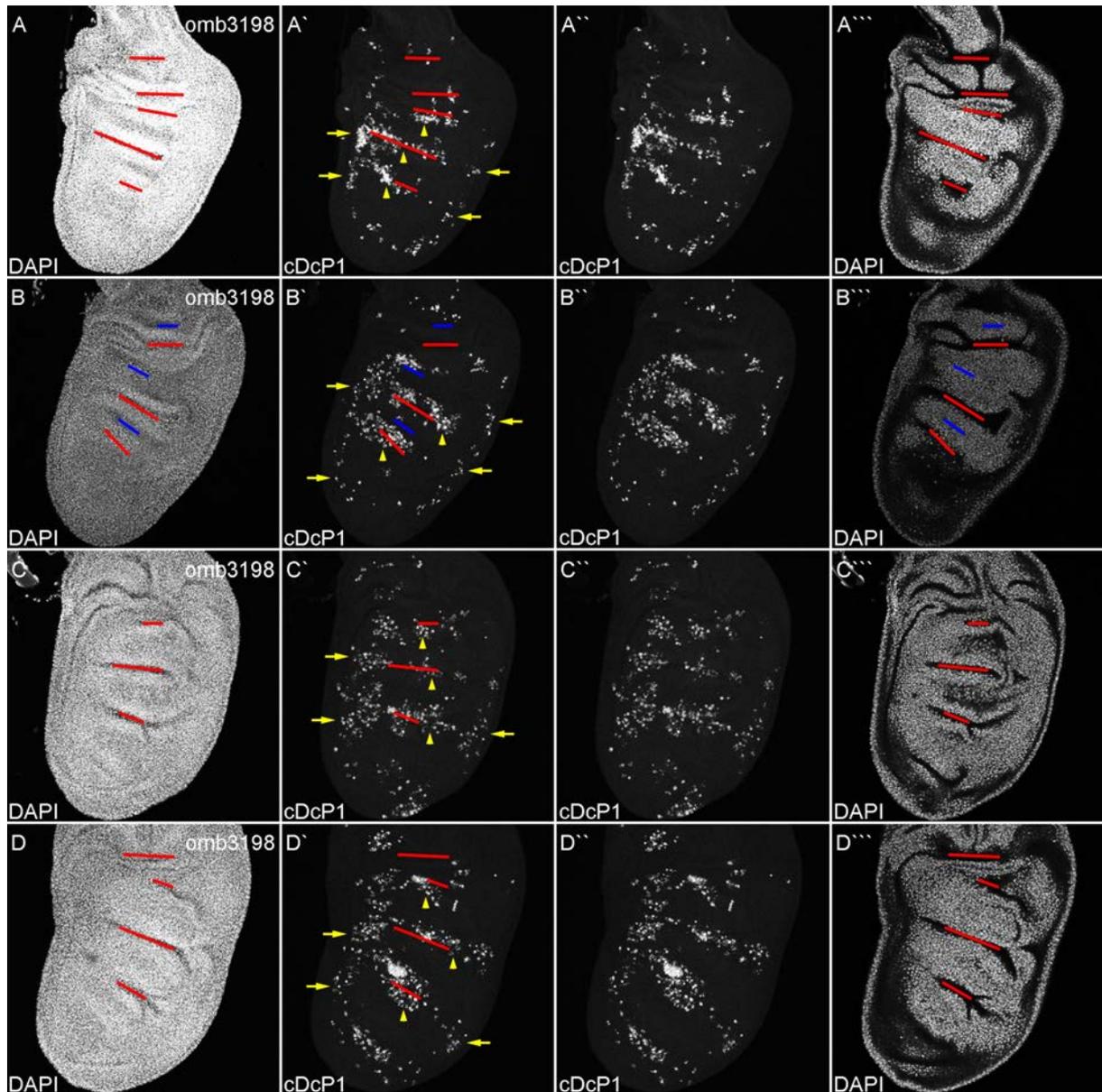


Abbildung 64 Apoptose in *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *I(1)omb<sup>3198</sup>* (A-D) L3 Flügelimaginalseiben. Die Flügelscheiben wurden mit einem Antikörper gegen gesplante Caspase DcP1 (A'-D'') und DNA (A-D, A'''-D''') gefärbt. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Apikale Falten (Auswahl) sind mit roten Balken markiert; basale Falten (Auswahl) sind mit blauen Balken markiert. Gelbe Pfeile markieren cDcp-1 positive Zellen in der lateralen Flügelscheibe. Gelbe Pfeilspitzen markieren cDcp-1 positive Zellen in der medialen Flügelscheibe. (A-D'') Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A'''-D''') Mediale Einzelbilder von Z-Bildstapeln, zur Veranschaulichung der apikalen Falten. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in *omb* hypomorphen und in *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben ein Anstieg an apoptotischen Zellen, in der distalen Flügelscheibe, festgestellt wurde. Dieser Anstieg war zum Großteil mit ektopischen apikalen Falten innerhalb der pouch assoziiert.

### 4.9.3 Diskussion: Proliferation und Apoptose

Der Venenfusionsphänotyp von *bifid* wird auf einen Gewebeverlust zwischen den Longitudinalvenen (L1-L5) zurückgeführt (Grimm und Pflugfelder, 1996; Pflugfelder, 2009), was auf eine verminderte Zellproliferation und/oder einen erhöhten Zelltod im betreffenden Bereich schließen lässt. Überraschenderweise wurde in *bifid* L3 Flügelscheiben ein Anstieg der Apoptose bei gleichzeitigem Anstieg der Proliferation in der dorsalen und ventralen hinge nachgewiesen (Abb. 63 C, D; Abb. 61 B). Dies wurde bislang nur für die ventrale hinge und Pleura beschrieben (Umemori et al., 2007).

*omb* Nullmutante Flügelscheiben zeigen ein starkes Überwachsen des ventralen Kompartimentes. Das dieses ventrale Überwachsen durch die Expression des JNK-Signalweg-Antagonisten *puckered* (*puc*) unterdrückt werden kann, deutet darauf hin, dass die Hyperproliferation, in der ventralen Flügelscheibe, von der JNK-Signalweg vermittelten Apoptose abhängig ist (del Alamo Rodriguez et al., 2004). Es ist bekannt, dass durch Apoptose eine kompensatorische Proliferation ausgelöst werden kann (Huh et al., 2004; Ryoo et al., 2004; Pérez-Garijo et al., 2009; Morata et al., 2011). Allerdings konnte gezeigt werden, dass in *bifid* Flügelscheiben eine Abschwächung der Apoptose, durch die Expression von DIAP1 (Death-associated inhibitor of apoptosis 1), zu keiner Verringerung des Überwachens der Pleura führt (Umemori et al., 2007). Auch führt die Expression von DIAP1 in der Flügelgelenkregion zu keiner Abschwächung des *bifid* Phänotyps (G.O. Pflugfelder, persönliche Mitteilung).

Es ist bekannt, dass *Wg* die Proliferation in der hinge fördert (siehe 4.9). Zwischen den analysierten Genotypen *bi*, *bi/omb<sup>3198</sup>* und *l(1)omb<sup>3198</sup>* konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen der veränderten *Wg*-Expression und der Beeinträchtigung der Zellproliferation in der hinge festgestellt werden (Abb. 62).

Das veränderte Aktivitätsmuster des JAK/STAT-Signalwegs in der hinge von *omb* hypomorphen Mutanten wie auch innerhalb der distalen Flügelscheibe von *omb* Nullmutanten (Abb. 55) legt eine Beteiligung des Signalweges an der Überproliferation in *omb* mutanten L3 Flügelscheiben nahe. Es konnte gezeigt werden, dass der JAK/STAT-Signalweg eine Rolle bei der zellulären Proliferation der Flügelimaginalscheibe spielt, ohne die Zellgröße oder Apoptose zu verändern (Mukherjee et al., 2005). In der hinge ist die JAK/STAT-Signalisierung für die Proliferation essentiell, aber eine späte nicht-kanonische Aktivierung von STAT92E hemmt die Proliferation in der Flügelscheibe (Mukherjee et al., 2005).

#### JAK/STAT-Signalisierung und Apoptose in der distalen Flügelscheibe

In *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben zeigte sich ein stark verändertes Aktivitätsmuster des JAK/STAT-Signalweges, mit ektopischen Domänen in der distalen Flügelscheibe und einem zum Teil unregelmäßigen Muster in der dorsalen hinge (Abb. 55 D; Abb. 56). Bemerkenswert ist die große Ähnlichkeit zwischen dem von apoptotischen Zellen dargestellten Muster und dem Expressionsmuster des 10xSTAT-GFP Reporters im Hauptepithel der distalen Flügelscheibe von *omb* Nullmutanten L3 Flügelscheiben (Abb. 64; Abb. 56). Interessanterweise war in der distalen Flügelscheibe die überwiegende Anzahl der apoptotischen Zellen wie auch eine hohe JAK/STAT-Signalaktivität in unmittelbarer Nähe zu ektopischen apikalen Falten lokalisiert. Allerdings ist eine Bestimmung der

genauen Position der ektopischen Falten, aufgrund der Faltenmorphologie sowie des Überwachens des ventralen Kompartiments, in *omb* Nullmutanten Flügelscheiben schwierig.

Worley und Kollegen (Worley et al., 2018) berichten, dass die Expression von hohen Dosen *UAS-upd1*, in der Flügelscheibe, ein beträchtliches Niveau an Apoptose erzeugt. Dies deutet darauf hin, dass eine starke ektopische JAK/STAT-Signalisierung, in der Flügelscheibe, Apoptose bewirken kann. Dies könnte auch das hohe Niveau an Apoptose, innerhalb der distalen Flügelscheibe von *omb* Nullmutanten (Abb. 64) erklären – wie auch die Korrelation mit der ektopischen JAK/STAT-Signalaktivität (Abb. 56).

#### 4.10 *four-jointed (fj)* und *dachsous (ds)*

Während der Flügelentwicklung wird Vg in einem proximo-distalen Gradienten exprimiert, unter der Kontrolle der Signalwege von Dpp, Wg und Notch (Couso et al., 1995; Kim et al., 1996, 1997; Zecca und Struhl, 2007a). Diese Signalwege (Dpp, Wg und Notch) regulieren auch die Expression von *dachsous (ds)* und *four-jointed (fj)* (Rogulja et al., 2008; Zecca und Struhl, 2010), was in der Flügelscheibe weitgehend durch den TF Vg vermittelt wird. Vg fördert die Expression von *fj* und hemmt gleichzeitig die Expression von *ds* (Cho und Irvine, 2004; Zecca und Struhl, 2010). In vielen sich entwickelnden Geweben werden Fj und Ds in entgegengesetzte Gradienten exprimiert, u.a. in der Augen- und Flügelimaginalscheibe. In der Flügelscheibe, im Hinblick auf die pouch und hinge Region, ist die abgestufte Expression von Fj distal hoch und proximal niedrig, die von Ds proximal hoch und distal niedrig.

Die Expressions-Gradienten von Ds und Fj spielen eine Rolle bei der Regulierung der planaren Zellpolarität (PCP) in mehreren Geweben (Matis und Axelrod, 2013). Die PCP regelt die Polarität über die Ebene eines Gewebes. In *Drosophila* sind zwei Systeme (d.h. molekulare Netzwerke) bekannt, die die PCP kontrollieren; Frizzled/Flamingo (Fz/Fmi) und Fat/Dachsous (Ft/Ds) (zusammengefasst in Simons und Mlodzik, 2008). Ds und Ft, beide atypische Cadherine, bilden interzelluläre Heterodimere (Cho und Irvine, 2004; Matakatsu und Blair, 2004). Fj, eine Golgi ständige Kinase, moduliert die Ft-Ds-Wechselwirkung indem sie die Cadherin-Domänen von Ds und Ft phosphoryliert (Ishikawa et al., 2008; Simon et al., 2010). Ferner wurde vorgeschlagen, dass Fj sezerniert wird und folglich als Morphogen fungieren könnte um die Ft/Ds-Phosphorylierung zu regulieren (zusammengefasst in Tagliabracchi et al., 2013). Ds und Fj regulieren die Aktivität von Fat. Es wurde gezeigt, dass das Ft/Ds-PCP-System den Hippo-Signalweg in *Drosophila* reguliert (Matis und Axelrod, 2013). Der Hippo-Signalweg ist eine evolutionär konservierte Signalkaskade, die mittels Regulierung von Zellproliferation und Apoptose das Organwachstum bzw. die Größe von Organen kontrolliert. Der Hippo-Signalweg wird durch eine Vielzahl von Signalwegen reguliert (zur Übersicht siehe: Grusche et al., 2010; Staley und Irvine, 2012). Kern des Hippo-Signalwegs ist eine Kinasekaskade, diese umfasst die zwei Serin/Threonin-Proteinkinasen Hippo (Hpo) und Warts (Wts), und ihre jeweiligen Adapterproteine Salvador (Sav) und Mob as tumor suppressor (Mats) (zur Übersicht siehe: Staley und Irvine, 2012; Meng et al., 2016). Die Hpo-Kinase (im Komplex mit Sav) phosphoryliert und aktiviert die im Komplex mit Mats vorliegende Wts-Kinase (Wu et al., 2003; Lai et al., 2005). Anschließend transloziert der aktivierte Wts/Mats-Komplex in den Nukleus und phosphoryliert und inhibiert den Transkriptionskoaktivator Yorkie (Yki) (Oh und Irvine, 2009) – wodurch Yki im Zytoplasma sequestriert

wird. Yki ist ein wichtiger nachgeschalteter Effektor des Hippo-Signalwegs. Im dephosphorylierten Zustand bindet Yki an den TF Scalloped (Sd) um die Expression von Zielgenen zu regulieren die für das Zellwachstum, die Proliferation sowie das Zellüberleben in *Drosophila* verantwortlich sind. Dabei fördert Yki die Zellproliferation und hemmt die Apoptose. Die Hpo-Wts-Signalisierung reguliert hingegen das Wachstum negativ, indem sie Yki phosphoryliert und inaktiviert (zusammengefasst in Richardson und Portela, 2017).

Die Ds-Ft-Signalisierung induziert den Hippo-Signalweg durch Hemmung der Aktivität des atypischen Myosins Dachs (D), das die Aktivität von Wts durch Blockierung einer Mats-vermittelten Konformationsänderung von Wts hemmt. Ds hingegen bindet und reguliert Mnb (Minibrain), eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die im Komplex mit Riq vorliegt, und wiederum Wts phosphoryliert und inaktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass die Rolle von Ft in der Hippo-Signalisierung von seiner Rolle in der PCP getrennt werden kann. Darüber hinaus bestehen Wechselwirkungen zwischen PCP und Hippo, da PCP-Defekte in *ft* Mutanten durch Modulation der Hippo-Signalsisierung gerettet werden können, möglicherweise durch das Yki-Zielgen *Fj* (zusammengefasst in Richardson und Portela, 2017).

#### 4.10.1 Systemischer *omb*-Verlust und *fj-lacZ*-Expression

In dieser Arbeit wurde eine *fj-lacZ* Enhancer-Trap-Linie verwendet, um die Expression von *fj* zu untersuchen. Mittels Antikörperfärbung gegen das Protein *Fj* wurde bereits von Strutt und Kollegen (Strutt et al., 2004) die Verteilung in der wildtypischen Flügelimaginalscheibe analysiert. Die *Fj*-Expression in der pouch wurde hierbei als abgestuft beschrieben, mit einem niedrigen Expressionsniveau in der Peripherie und der stärksten Expression im Zentrum der pouch (Strutt et al., 2004). Ferner wird die *Fj*-Expression entlang der D/V-Grenze und entlang der A/P-Grenze herunterreguliert (Strutt et al., 2004).

In wildtypischen L3 Flügelscheiben wies die *fj-lacZ* Linie (nach X-Gal Färbung) eine starke Färbung in der pouch und in den lateralen Bereichen des Notums auf (Abb. 65 A). Zusätzlich zeigte sich im D-Kompartiment eine deutliche peripodiale Färbung. Eine verminderte Expression entlang einer der beiden Kompartimentsgrenzen der Flügelscheibe wurde nicht beobachtet. In jüngeren L3 *l(1)omb<sup>ΔP6</sup>* Flügelscheiben war eine Ausweitung der *fj-lacZ* Färbung in die hinge, vorwiegend im posterior-ventralen Bereich, zu beobachten (Abb. 65 B, C). In diesem Bereich der hinge wurde auch in späten L3 *l(1)omb<sup>ΔP6</sup>* Flügelscheiben eine bisweilen starke ektopische *fj-lacZ* Färbung festgestellt (Abb. 65 E-H). Die verbleibende Färbung im Zentrum von späten L3 *l(1)omb<sup>ΔP6</sup>* Flügelscheiben (Abb. 65 E-H) unterschied sich von der wildtypischen *fj-lacZ* Färbung (Abb. 65 A) in ihrer Ausdehnung, was besonders in den lateralen Bereichen zu erkennen war. Im Vergleich zu *wt* war diese zentrale *fj-lacZ* Färbedomäne auch deutlich kleiner, im Verhältnis zur Gesamtfläche der Scheibe.

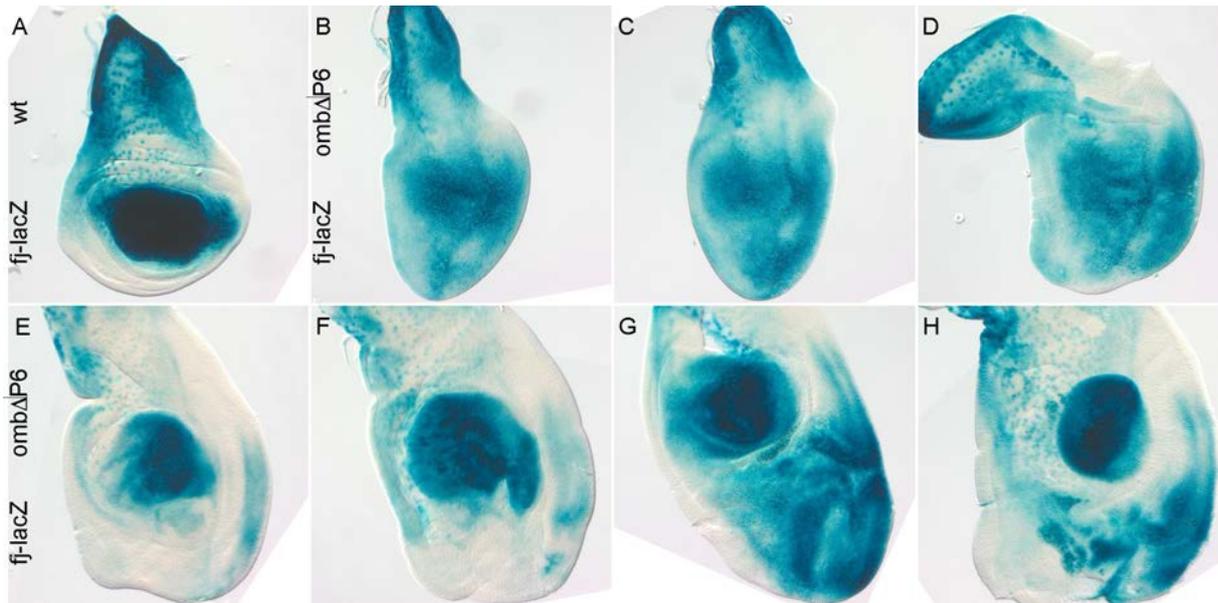


Abbildung 65 Expressionsmuster von *fj-lacZ* in *wt* und *l(1)omb<sup>ΔP6</sup>* Flügelscheiben  
 Dargestellt sind *wt* (Kontrolle; A) und *l(1)omb<sup>ΔP6</sup>* (B-H) L3 Flügelimaginalscheiben. Die *fj-lacZ*-Expression wurde mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. (B-D) In jüngeren L3 *l(1)omb<sup>ΔP6</sup>* Flügelscheiben war die Färbung in der distalen Flügelscheibe in die Hinge erweitert. (E-H) In späten L3 *l(1)omb<sup>ΔP6</sup>* Flügelscheiben befand sich eine starke Färbung im Zentrum der Scheibe und eine ektopische Färbung in der posterior-ventralen Hinge.

#### 4.10.2 Klonaler *omb*-Verlust und *fj-lacZ*-Expression

Die klonale Analyse von *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutanten Klonen (*omb* l-o-f Klone) in L3 Flügelscheiben ergab in der Pouch eine teilweise Reduktion der *fj-lacZ*-Expression sowie eine Verstärkung der Immunfluoreszenz von *fj-lacZ* am distal gelegenen Rand der Klone (Abb. 66). Klone, welche in der dorsalen oder ventralen Hinge positioniert waren zeigten keine ektopische Expression von *fj-lacZ* (Abb. 66 B).

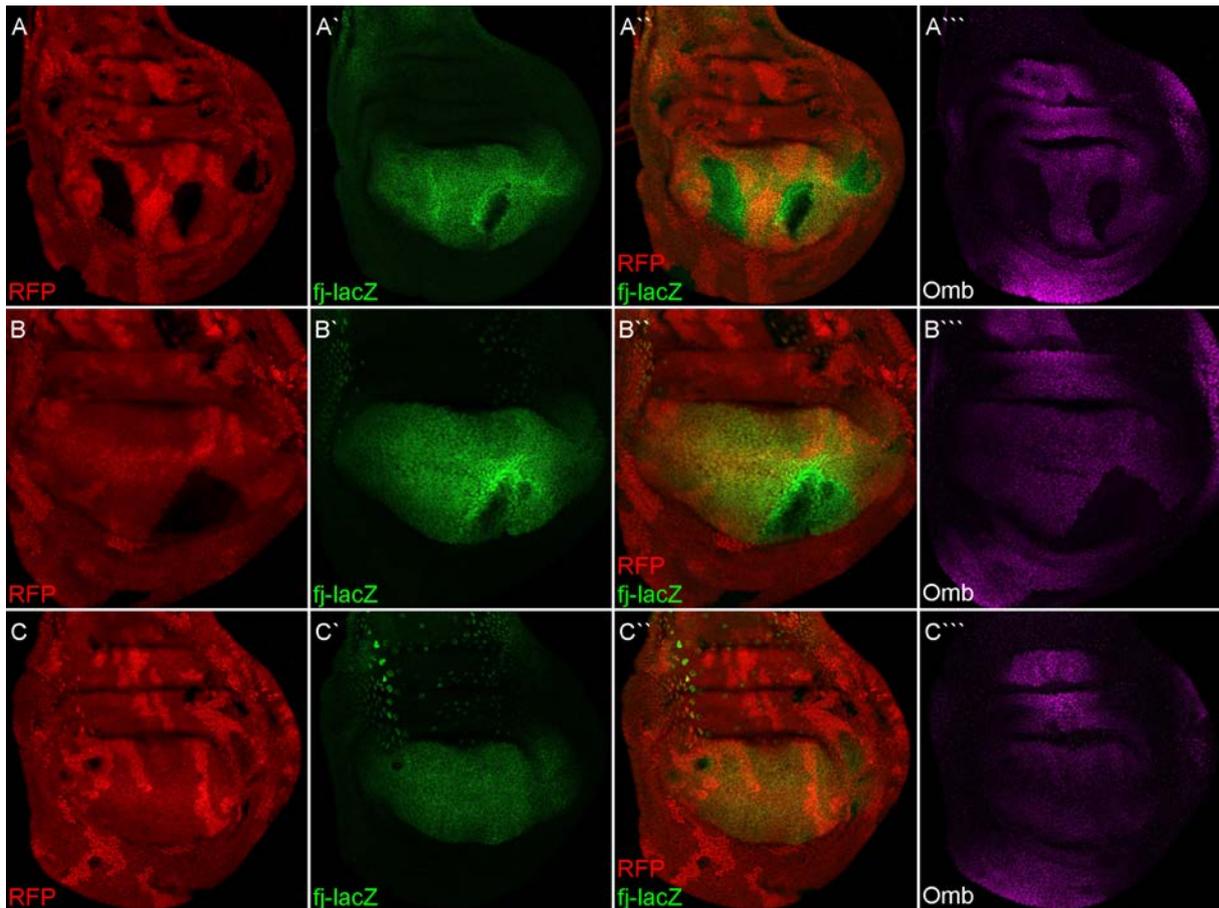


Abbildung 66 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *fj-lacZ*-Expression

Gezeigt sind  $l(1)omb^{\Delta 4}$  mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben. mRFP (Rot; A-C), *fj-lacZ* (Grün; A'-C'), anti-Omb (Magenta; A'''-C'''), Überlagerung des *fj-lacZ* und RFP Signals (Grün, Rot; A''-D''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; (A-B) apikale Einzelbilder wurden entfernt aufgrund des RFP Signals der Peripodialmembran. (A-C)  $l(1)omb^{\Delta 4}$  mutante Klone in der pouch zeigten eine teilweise Reduktion der *fj-lacZ* Färbung sowie eine stärkere Färbung am distalen Rand des Klons. (B)  $l(1)omb^{\Delta 4}$  mutante Klone in der dorsalen und ventralen hinge zeigten keine ektopische *fj-lacZ*-Expression. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 4.10.3 *omb*-Überexpression und *fj-lacZ*-Expression

Die Überexpression von Omb in der *dpp*-Domäne führte zu einer Reduktion der *fj-lacZ*-Expression innerhalb der pouch von L3 Flügelscheiben (Abb. 67). Hierbei war zu beobachten, dass die Reduktion im anterioren Rand der ektopischen Omb Expressionsdomäne nur unvollständig war. Dahingegen wurde an der posterioren Grenze eine teilweise verstärkte Immunfluoreszenz von *fj-lacZ* beobachtet, die wahrscheinlich nicht-zellautonom induziert war.

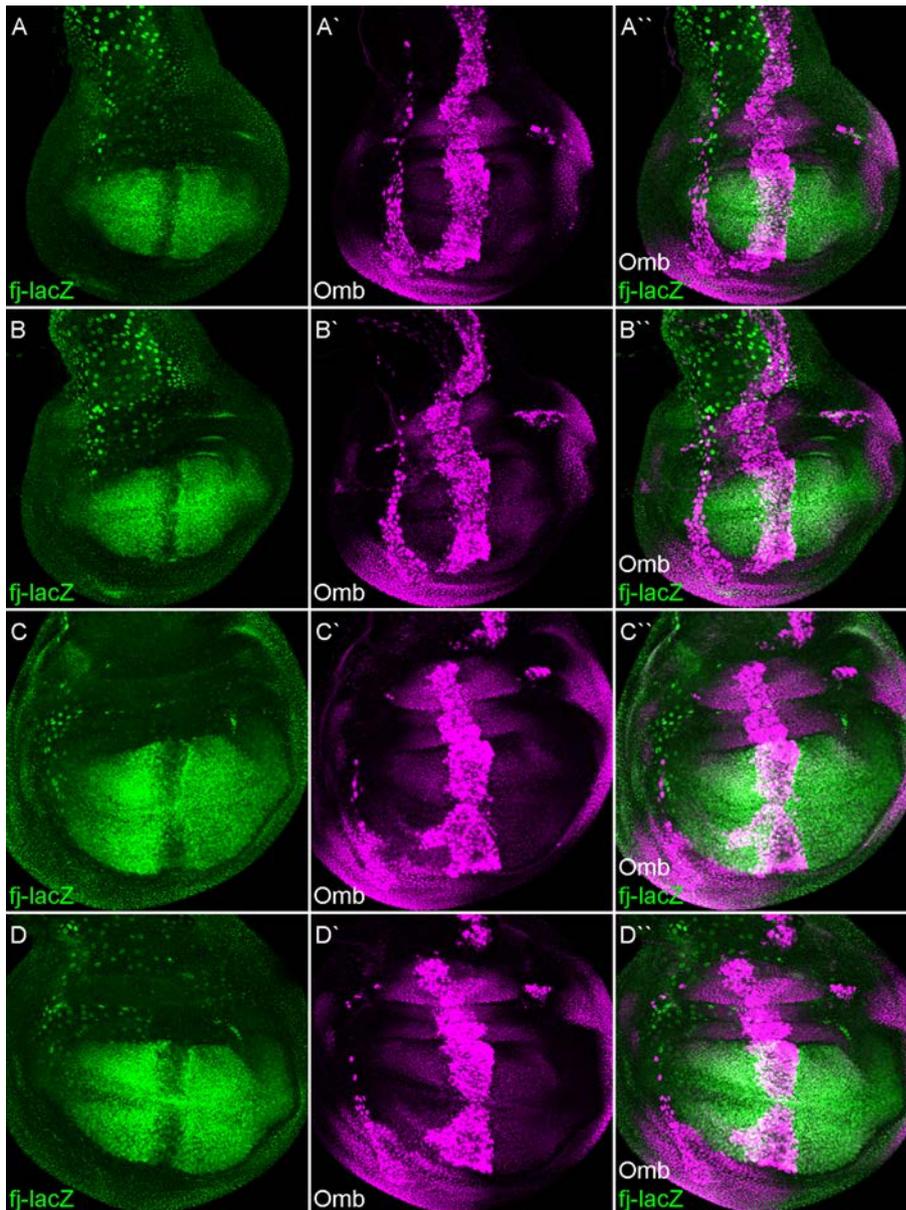


Abbildung 67 Effekte der Überexpression von Omb auf die *fj-lacZ*-Expression

L3 Flügelimaginalscheiben des Genotyps *w; tub-Gal80ts/fj-lacZ; dpp-Gal4/UAS-omb* wurden nach 72h auf 29°C fixiert und gefärbt. *fj-lacZ* (Grün; A-D), anti-Omb (Magenta; A'-D'), Überlagerung des *fj-lacZ* und anti-Omb Signals (Grün, Magenta; A''-D''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A-D) Die ectopische Expression von Omb entlang der A/P-Kompartimentsgrenze führte zu einer Reduktion der *fj-lacZ*-Expression in der pouch. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 4.10.4 Klonale *omb*-Überexpression und *fj-lacZ*-Expression

Bei der klonalen Überexpression von Omb (*omb* g-o-f Klone) wurden verschiedene Effekte auf die *fj-lacZ*-Expression beobachtet. So kam es in Abhängigkeit von der Position des Klons zu einer Reduktion und/oder Aktivierung der *fj-lacZ*-Expression (Abb. 68). Im Notum wurde eine zellautonome Reduktion der *fj-lacZ*-Expression detektiert, wenn der Klon in einem Bereich mit einer hohen *fj-lacZ*-Expression lokalisiert war (Abb. 68). In Bereichen mit einer schwachen *fj-lacZ*-Expression wurde dagegen eine nicht-zellautonome Aktivierung von *fj-lacZ* beobachtet (Abb. 68). Interessanterweise schien in einigen der letztgenannten Fälle die Immunfluoreszenz von *fj-lacZ* (d.h. Zellen mit einer

ektopischen *fj-lacZ*-Expression) nicht vollständig komplementär zur Immunfluoreszenz von Omb (d.h. Zellen der Expressionsklone) (siehe beispielsweise Abb. 68 A).

In der hinge sowie in der pouch wurde kein einheitlicher Effekt festgestellt (Abb. 68). Allerdings wurden innerhalb der pouch keine größeren Klone gefunden. In der pouch wiesen *omb* g-o-f Einzelzellklone nur vereinzelt einen Verlust der *fj-lacZ*-Expression auf. In der distalen hinge, auf Höhe der D/V-Grenze, zeigten zwei *omb* g-o-f Klone eine deutliche Immunfluoreszenz für *fj-lacZ* (Abb. 68 B, D), während weitere Klone in diesem Bereich keinen Effekt zu haben schienen.

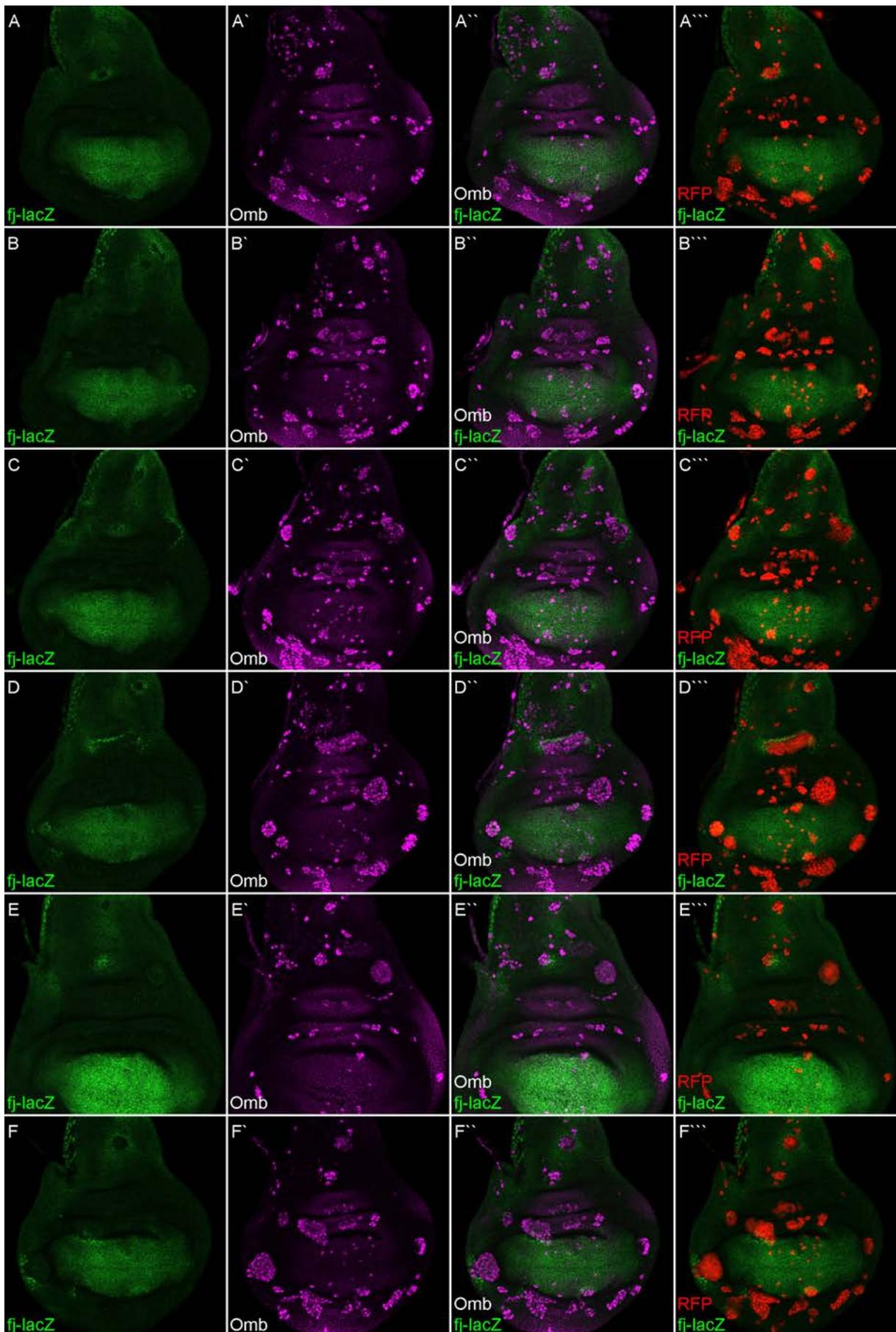


Abbildung 68 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *fj-lacZ*-Expression

*fj-lacZ* (Grün; A-F), anti-Omb (Magenta; A'-F'), Überlagerung des *fj-lacZ* (Grün) und anti-Omb (Magenta) Signals (A''-F''), Überlagerung des *fj-lacZ* (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A'''-F'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Dargestellt sind L3 Flügelimaginalscheiben, in denen UAS-omb überexprimierende Klone im ersten Larvenstadium induziert wurden. Der Nachweis der Expression von UAS-omb in Zellklonen erfolgte durch Immunfluoreszenz gegen Omb und durch Coexpression von UAS-mRFP. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 4.10.5 *ds-lacZ*-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster von *ds* mit Hilfe einer *ds-lacZ* Enhancer-Trap-Linie untersucht. Nach X-Gal Färbung der *ds-lacZ* Linie zeigte sich eine starke Färbung in der gesamten hinge und im Großteil des Notums von L3 Flügelimaginalscheiben (Abb. 69). Die Immunfluoreszenzfärbung gegen  $\beta$ -Galaktosidase ergab ein genaueres Bild der *ds-lacZ*-Expression in der dorsalen hinge, mit einer starken Expression zwischen der H/H- und pbH-Falte (Domäne 4) und einer schwächeren Expression jeweils distal (Domäne 2 und 3) und proximal (Domäne 5 und 6) (Abb. 70). Die *ds-lacZ*-Expression spiegelt daher weitgehend das Muster der anti-Ds Immunfärbung (siehe Rodriguez, 2004).

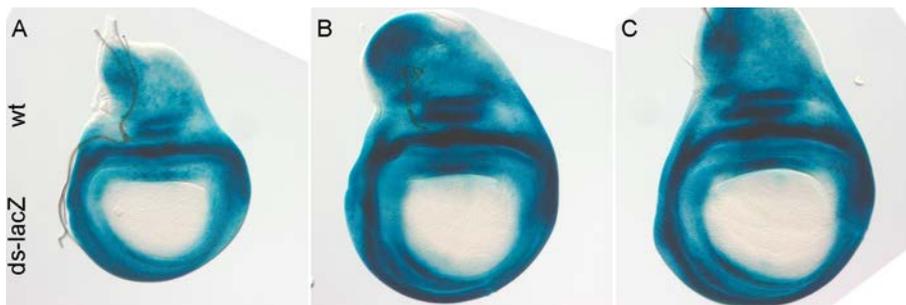


Abbildung 69 Expressionsmuster von *ds-lacZ* in *wt* Flügelscheiben

(A-C) Die *ds-lacZ*-Expression in *wt* L3 Flügelimaginalscheiben wurde mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die *ds-lacZ*-Expression auch in *omb* Nullmutanten Imaginalscheiben untersucht werden, jedoch misslangen mehrere Versuche zur Einkreuzung des *ds-lacZ* Konstruktes in einen *omb* Nullmutanten Hintergrund. Eine durchgeführte Zellklonanalyse, sowohl *omb* I-o-f als auch *omb* g-o-f Klone, ermöglichte es die Auswirkung eines Omb Verlusts bzw. der Überexpression von Omb auf die *ds-lacZ* Aktivität zu untersuchen.

#### 4.10.6 Klonaler *omb*-Verlust und *ds-lacZ*-Expression

In L3 Flügelscheiben zeigte sich in *omb* I-o-f Klonen weder eine ektopische Aktivierung von *ds-lacZ* in der pouch (Abb. 70 A-C) noch eine Änderung dessen Aktivität in der ventralen hinge (Abb. 70 B). Große *omb* I-o-f Klone wurden in der dorsalen hinge nicht gefunden, jedoch konnte in einem relativ kleinen Klon, der proximal der B/H-Falte lokalisiert war (Domäne 2), eine verminderte *ds-lacZ*-Expression festgestellt werden (Abb. 70 C).

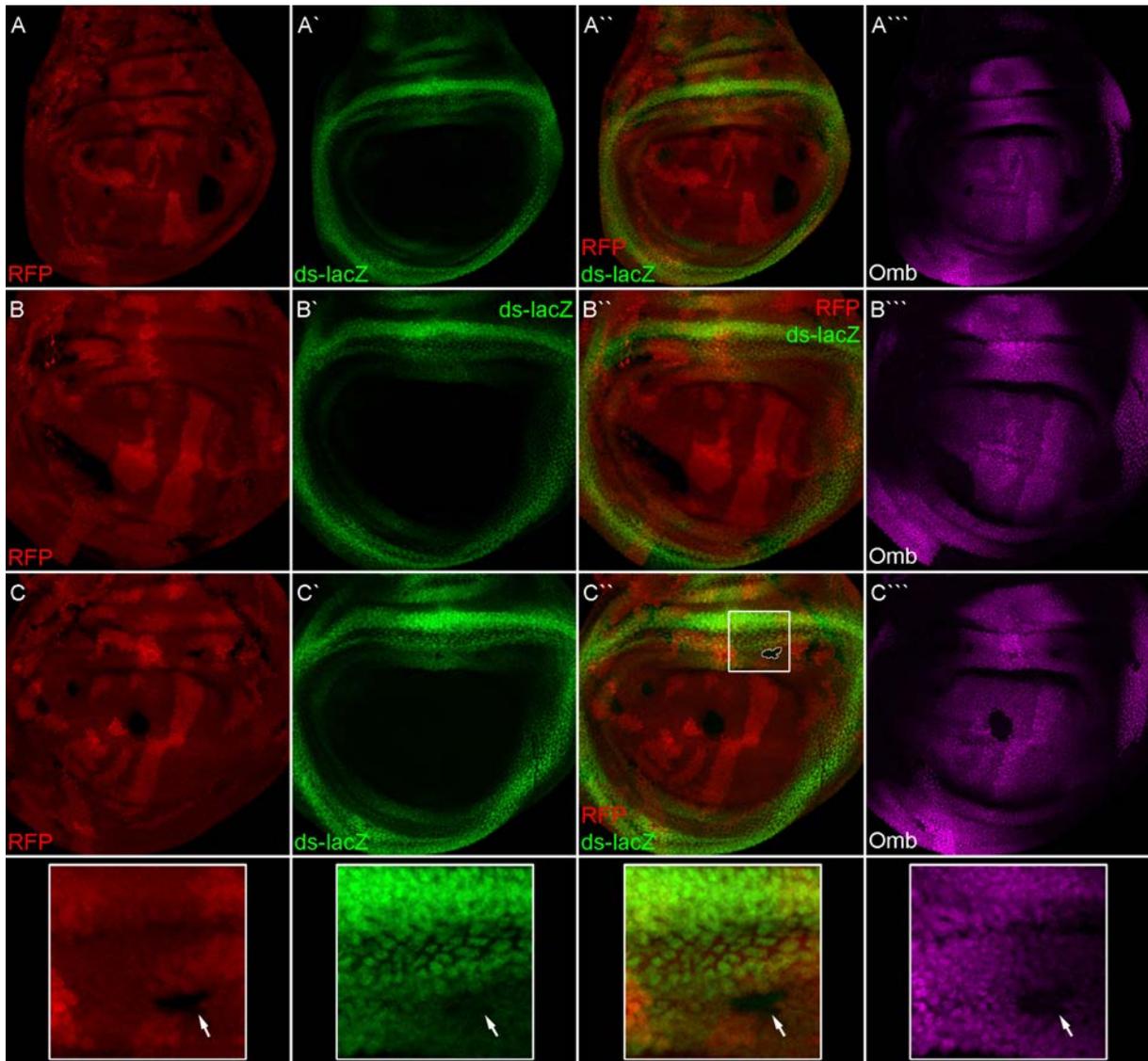


Abbildung 70 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *ds-lacZ*-Expression

Gezeigt sind *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in L3 Flügelimaginalscheiben. mRFP (Rot; A-C), *ds-lacZ* (Grün; A'-C'), anti-Omb (Magenta; A'''-C'''), Überlagerung des *ds-lacZ* und RFP Signals (Grün, Rot; A''-C''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; (A-C) apikale Einzelbilder wurden entfernt aufgrund des RFP Signals der Peripodialmembran. (A-C) *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone zeigten in der pouch keine ektopische *ds-lacZ*-Expression. (B) *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutante Klone in der ventralen hinge (Pleura) zeigten keine Modulation der *ds-lacZ*-Expression. (C) Ein kleiner *l(1)omb<sup>Δ4</sup>* mutanter Klon (gekennzeichnet in C'') in der dorsalen hinge zeigte eine reduzierte Immunfluoreszenz von *ds-lacZ*. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

#### 4.10.7 Klonale *omb*-Überexpression und *ds-lacZ*-Expression

In L3 Flügelscheiben zeigten *omb* g-o-f Klone einen aktivierenden Effekt auf *ds-lacZ*. In den proximalen Regionen der Flügelscheibe (Notum, dorsale und ventrale hinge) wie auch in der proximalen pouch führte die klonale Überexpression von *omb* zu einer ektopischen bzw. verstärkten Aktivierung von *ds-lacZ* (Abb. 71; Abb. 72). Dieser Effekt war zellautonom und in großen Klone deutlich erkennbar. Die distale Flügelscheibe (pouch) enthielt überwiegend kleine Zellklone. Im proximalen Bereich der pouch wurde auch in kleinen *omb* g-o-f Klone eine schwache ektopische *ds-*

*lacZ*-Expression festgestellt, wohingegen im Zentrum der pouch kein deutlicher Effekt zu beobachten war (Abb. 71 C, D; Abb. 72 C, D).

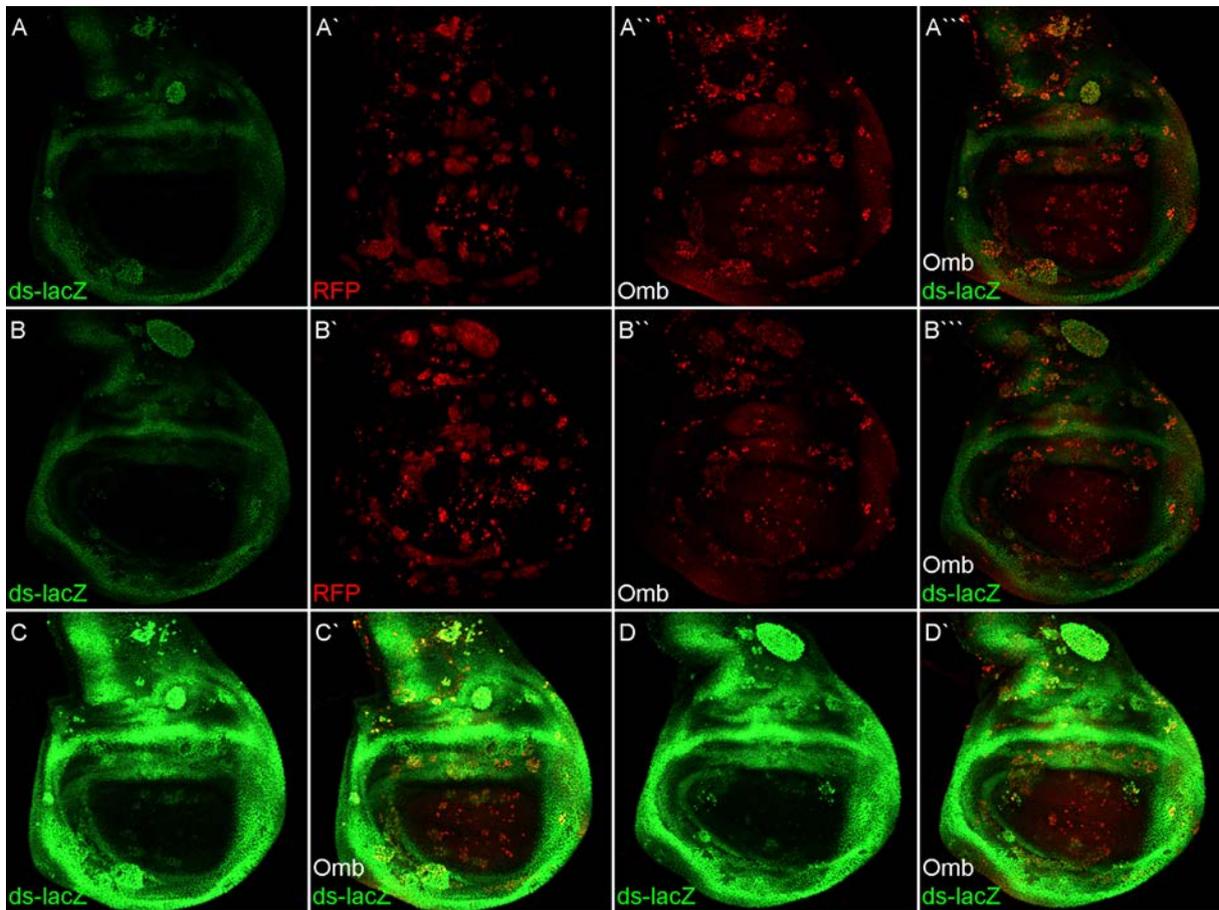


Abbildung 71 Effekte der klonalen *omb* Überexpression auf die *ds-lacZ*-Expression

Dargestellt sind L3 Flügelimagnalscheiben, in denen UAS-*omb* überexprimierende Klone im ersten Larvenstadium induziert wurden. Der Nachweis der Expression von UAS-*omb* in Zellklonen erfolgte durch Immunfluoreszenz gegen Omb und durch Coexpression von UAS-mRFP. *ds-lacZ* (Grün; A-D), mRFP (Rot; A'-B'), anti-Omb (Rot; A''-B''), Überlagerung des *ds-lacZ* und anti-Omb Signals (Grün, Rot; A'''-B''', C'-D'). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (C) und (D) zeigen die Flügelscheiben die in (A) bzw. (B) dargestellt sind; die Helligkeit und der Kontrast der Fluoreszenzbilder in (C-D) wurde erhöht um das *ds-lacZ* Signal innerhalb der pouch hervorzuheben. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

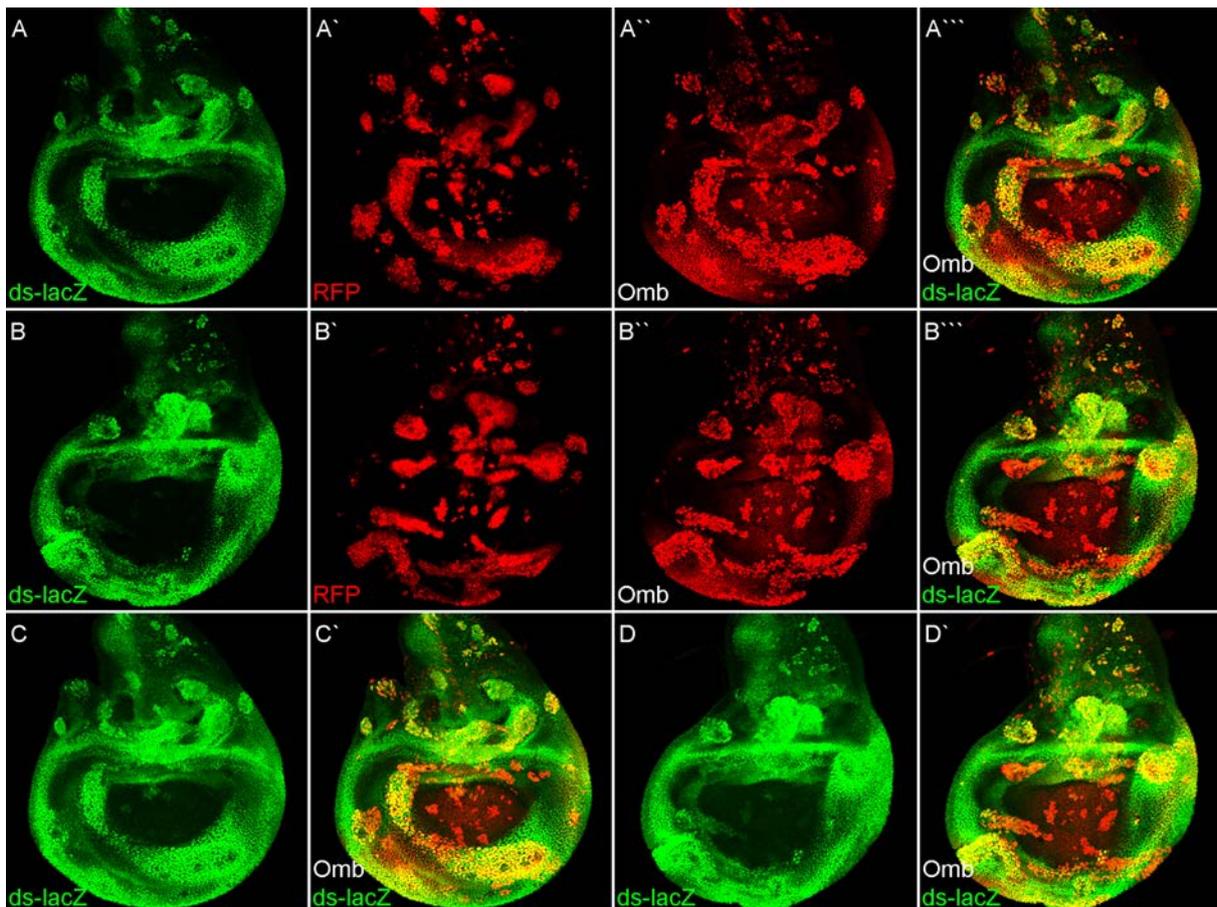


Abbildung 72 Effekte der klonalen *omb* Überexpression auf die *ds-lacZ*-Expression  
 Abbildungsbeschreibung siehe Abb. 71.

#### 4.10.8 Diskussion: *four-jointed* und *dachsous*

Die abgestuften Expressionsmuster von *ds* und *fj* scheinen für die Fat-Aktivität entscheidend zu sein (Rogulja et al., 2008; Willecke et al., 2008; Zecca und Struhl, 2010). So legen die Literaturergebnisse nahe, dass die Fat-Hippo-Signalisierung empfindlich auf die Steilheit des Gradienten von *Ds* und *Fj* reagiert. Während eine gleichförmige *Ds*- oder *Fj*-Expression die Zellproliferation verringern kann, können starke Unterschiede in der *Fj*- oder *Ds*-Expression zwischen benachbarten Zellen, die durch I-o-f oder g-o-f Klone erzeugt werden, eine starke *Yki* Aktivierung und folglich Zellproliferation bewirken (Rogulja et al., 2008; Willecke et al., 2008). Die verwendete *fj-lacZ* Linie zeigte nach X-Gal Färbung eine starke und reproduzierbare Expression in der pouch von *wt* L3 Flügelscheiben (Abb. 65 A). Diese Expression ließ keinen Gradienten erkennen, weshalb eine Analyse des Gradienten im *omb* Nullmutanten Hintergrund nicht möglich war.

Interessanterweise bewirkte sowohl die Überexpression von *Omb* in der *dpp*-Domäne (Abb. 67) als auch der klonale Verlust von *Omb* in der pouch (Abb. 66) eine teilweise Reduktion der *fj-lacZ*-Expression. Ein reprimierender Einfluss wurde gleichfalls bei *omb* I-o-f und bei *omb* g-o-f Experimenten auf die *Wg*-IR-Expression beobachtet. Dahingegen führten *omb* I-o-f und *omb* g-o-f zu einer Aktivierung von *caps-lacZ* in der Flügelscheibe.

Für Vertreter der T-Box-Genfamilie wurden Ähnlichkeiten zwischen g-o-f und l-o-f Phänotypen bereits beschrieben. Defekte im Thoraxverschluss wurden bei Überexpression von Doc3 wie auch bei verminderter Doc-Expression beobachtet (Lu et al. unveröffentlicht). Solche Übereinstimmungen wurden auch beschrieben für Tbx1 (Baldini 2005; Gao et al., 2015) und Tbx2 (Radio et al., 2010). Dies ist für Transkriptionsfaktoren, die im Komplex mit anderen Proteinen wirken nicht ungewöhnlich (z.B. Ap, Milan und Cohen, 1999).

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Puffer und Lösungen

PBS (10X)	1,3 M NaCl
	0,07 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,03 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Glycerol	50% Glycerol in PBS (1X)
	70% Glycerol in PBS (1X)

Fixierlösung (für X-Gal Färbung)	0,1 M NaCacodylat (pH 7,3)
	0,75 % Glutaraldehyd
	0,03 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Färbelösung (für X-Gal Färbung)	1,5 ml 50 mM K <sub>4</sub> (FeII(CN) <sub>6</sub> )
	1,5 ml 50 mM K <sub>3</sub> (FeIII(CN) <sub>6</sub> )
	5 ml PBS (10X)
	50 µl 1M MgCl <sub>2</sub>
	42ml ddH <sub>2</sub> O
	1/30 Vol. X-Gal-DMF Lösung (8%ig)

PBT	PBS (1X)
	0,3 % TritonX-100
	0,02 % NaAz
	2,5 % bzw. 1 % BSA

Fixierlösung (für Immunohistochemie)	4% Paraformaldehyd
--------------------------------------	--------------------

#### 5.1.2 Antikörper

Antikörper gegen	Herkunft	AK-Nr.	Verdünnung	Bezugsquelle
Ap	Kaninchen		1:1000	Pflugfelder
β-Galactosidase	Kaninchen	55976	1:1000	Cappel
β-Galactosidase	Huhn	9361	1:1000	Abcam
β-Galactosidase	Maus	Z378B	1:750	Promega
DcP1	Kaninchen		1:200	Rogulja-Ortmann
dLMO (Bx)	Ratte		1:500	Pflugfelder
Nab	Kaninchen		1:1000	Diaz-Benjumea
Omb	Kaninchen	(Xanthippe)	1:1000	Pflugfelder

Sal	Kaninchen		1:500	Pflugfelder
Vg	Kaninchen		1:600	Pflugfelder
Wg	Maus		1:100	Pflugfelder
Zfh2	Ratte		1:2000	Technau

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Antikörper gegen	Herkunft	gekoppelt mit	AK-Nr.	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen	Esel	DyLight 405	711-475-152	1:250	Dianova
Kaninchen	Esel	Alexa488	A21206	1:500	Invitrogen
Kaninchen	Esel	Alexa546	A10040	1:500	Invitrogen
Kaninchen	Esel	Alexa568	A10042	1:500	Invitrogen
Kaninchen	Esel	Alexa647	A31573	1:500	Life Technologies
Huhn	Esel	FITC	703-096-155	1:250	Dianova
Huhn	Esel	Cy3	703-166-155	1:250	Dianova
Huhn	Esel	Cy5	703-175-155	1:250	Dianova
Maus	Esel	Alexa488	715-545-151	1:250	Dianova
Maus	Esel	Alexa568	A10037	1:500	Life Technologies
Maus	Esel	Alexa647	A31571	1:500	Invitrogen
Ratte	Esel	Alexa633	A21094	1:500	Invitrogen

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

### 5.1.3 Präabsorption des Omb Antikörpers

Der primäre Antikörper Omb (Xanthippe) wurde in einer Verdünnung von 1:50-1:100 präabsorbiert. Hierfür wurden zunächst 25-50 weibliche Drittstadien Larven der Linie *l(1)omb<sup>3198</sup>* (GOP 965) präpariert (siehe 5.2.1), dann für 40min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler fixiert, gespült (PBT mit 2,5% BSA) und gewaschen (PBT mit 2,5% BSA). Die Präabsorption erfolgte für 2h bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf einem Schüttler.

### 5.1.4 Fliegenstämme

Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme. Die Sortierung der Fliegenstämme ist alphabetisch nach dem Namen des untersuchten Gens bzw. der Defizienz. Homozygote Allele sind nur einmal angegeben, heterozygote Allele sind durch einen Schrägstrich („/“) getrennt.

Stock-Nr.	Bezeichnung	Genotyp	Herkunft *
5374	<i>ap-lacZ</i>	P{ry[+t7.2]=PZ}ap[rK568]/CyO	Bloomington
665	<i>arr-lacZ</i>	y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}arr[k08131]/CyO	Bloomington
11579	<i>caps-lacZ</i>	P{ry[+t7.2]=PZ}caps[02937] ry[506]/TM3, red[*] Ser[1]	Bloomington
11394	<i>ds-lacZ</i>	P{ry[+t7.2]=PZ}ds[05142] cn[1]/CyO; ry[506]	Bloomington

6370	<i>fj-lacZ</i>	w[1118];P{w[+mC]=lacW}fj[9-II]/CyO, P{ry[+t7.2]=sevRas1.V12}FK1	Bloomington
12109	<i>fng-lacZ</i>	P{ry[+t7.2]=PZ}fng[rG554] ry[506]/TM3, Sb[1]	Bloomington
11670 /101	<i>hth-lacZ</i>	P{ry[+t7.2]=PZ}hth[05745] ry[506]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]	Bloomington/ GOP
11053	<i>kek1-lacZ</i>	l(2)gl <sup>01433</sup> P{PZ}kek1 <sup>01433</sup> l(2)36Ba <sup>01433</sup> cn <sup>1</sup> /CyO; ry <sup>506</sup>	Bloomington
	nub-Gal4; mCD8GFP- UAS/TM6B		Manuel Calleja
7406	<i>rn-lacZ</i>	rn[89] ry[506]/TM3, Sb[1]	Bloomington
10344	<i>sda-lacZ</i>	ry[506]P{ry[+t7.2]=PZ}sda[03884], l(3)03884[03884]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]	Bloomington
11681	<i>Stat92E-lacZ</i>	ry[506]P{ry[+t7.2]=PZ}Stat92E[06346]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]	Bloomington
4550	<i>trn-lacZ</i>	y <sup>1</sup> w <sup>67623</sup> ; P{lacW}trn <sup>S064117</sup> /TM3, Sb <sup>1</sup> Ser <sup>1</sup>	Bloomington
1018	<i>tsh-lacZ</i>	C(1)M3,y[1]/Dp(1;Y)y[+]; P{ry[+t7.2]=A92}tsh[i71]; ca[1] awd[K]	Bloomington
	<i>wg-lacZ</i>		GOP
82	<i>ombP1</i>		GOP
	<i>10xSTAT-GFP</i>		Bach et al., 2007
	<i>w</i>	w[1118]	O. Vef
965	<i>l(1)omb<sup>3198</sup></i>		GOP
127	<i>l(1)omb<sup>D4</sup></i>		GOP
758	<i>l(1)omb<sup>282</sup></i>		GOP
1042	<i>l(1)omb<sup>15</sup></i>		GOP
304	<i>omb<sup>DI</sup></i>		GOP
317	Df(1)rb <sup>13B</sup> , w; DpA1125/SM6a		GOP
255	UAS-omb 4-15	w <sup>1118</sup> ; P[w <sup>+</sup> UAS-omb] 4-15 (II)	GOP
	w; UAS-omb 4-15; TM6b*, Sb, Tb/CxD		diese Arbeit
256	UAS-omb 2-17	w <sup>1118</sup> ; II; P[w <sup>+</sup> UAS-omb] 2-17 (III)	GOP
	w; CyO*/Pm; UAS-omb 2-17		diese Arbeit
501	hsGFP,hsFLP,FRT19; CyO*/Sco	y w hs-GFP hs-FLP FRT19; CyO*/Sco * = Dfd-EYFP	GOP
30558/ 505	w; <i>act&gt;CD2&gt;Gal4</i> , UAS- <i>mRFP/TM3</i> , Sb	w[1118];P{w[+mC]=GAL4-Act5C(FRT.CD2).P}S, P{w[+mC]=UAS-RFP.W}3/TM3, Sb[1]	Bloomington/ GOP
	w;UAS-omb; <i>act&gt;CD2&gt;Gal4</i> , UAS- <i>mRFP/TM6b*</i>		diese Arbeit
551	mRFP,hsFLP, FRT19A; CyO*/Sco		GOP
552	mRFP,hsFLP, FRT19A; TM*/D		GOP
554	hsGFP,hsFLP,FRT19A; mRFP/TM6, Tb	ywH <sub>2</sub> Av-GFPFLPFRT19A; H <sub>2</sub> Av-mRFP/TM6, Tb	GOP
625	w;tub-Gal80ts; dpp- Gal4/TM6, Tb		GOP
737	hsGFP,hsFLP, FRT19;		GOP

	CyO*/Sco		
742	mRFP,hsFLP, FRT19; TM*/D		GOP
1007	UAS-omb-pal-C4		GOP
	w; CyO*/Pm; UAS-omb- pal-C4		diese Arbeit
1372	ombD4, FRT19A/FM6		GOP
	ombD4, FRT19A/FMGFP		diese Arbeit
	w; CyO*/Pm; TM6b*,Sb, Tb/CxD		O. Vef
1130	en-Gal4 UAS- stinger/CyO*		O. Vef
296	UAS:lacZ		GOP
297	UAS:lacZ		GOP
360	UAS:lacZ		GOP
680	ombDP6/FMGFP;; UAS:lacZ		GOP
6341	hs-FLP; arm-Z FRT80B	P{ry[+t7.2]=hsFLP}22, y[1] w[*]; P{w[+mC]=arm- lacZ.V}70C P{ry[+t7.2]=neoFRT}80B	Bloomington
63126	kto FRT80B/TM6,Tb	w[*]; kto[T241] P{ry[+t7.2]=neoFRT}80B/TM6B, Tb[1]	Bloomington

Tabelle 3: Fliegenstämme

\* Alle Fliegenstämme aus der Stammsammlung von G.O. Pflugfelder sind mit GOP gekennzeichnet. Alle Fliegenstämme mit der Herkunftsbezeichnung Bloomington wurden vom Bloomington Drosophila Stock Center bezogen.

### 5.1.5 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wie Handschuhe, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc. wurden von den Firmen Sarstedt, Eppendorf und Hartenstein bezogen. Kleine Laborgeräte wie Waagen, Vortexer, Horizontalwippschüttler, Glaswaren, etc. wurden von der Firma Hartenstein bezogen. Die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Roth, Sigma-Aldrich und Vector Laboratories bezogen.

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Präparation von Drittstadien Larven

Zur Untersuchung von Imaginalscheiben wurden wandernde Larven des dritten Larvenstadiums verwendet. Dazu wurden Larven mit einer Pinzette in ein Blockschälchen mit eiskaltem PBS transferiert. Falls erforderlich wurden weibliche und männliche Larven getrennt. Männliche Larven können durch das Vorhandensein von Hodenbläschen identifiziert werden. Diese sind im posterioren Drittel der Larve lokalisiert und als runde, transparente und paarige Strukturen zu identifizieren. Für die Präparation werden die Larven mit Hilfe von zwei Pinzetten in zwei Hälften geteilt. Die anteriore Hälfte wird invertiert (mit Ausnahme der Genitalscheiben, befinden sich alle übrigen Imaginalscheiben in der anterioren Hälfte der Larve). Hierzu wird eine Pipettenspitze zwischen den Mundwerkzeugen eingeführt und mit Hilfe einer zweiten Pinzette über die Pinzettenspitze gestülpt. Falls nicht anders

angegeben, wurde Gewebe das für die Untersuchung nicht von Interesse ist entfernt (Fettkörper, Darm und Speicheldrüse). Die invertierten Larven wurden in 1,5 ml Eppendorfgläser mit eiskaltem PBS überführt und auf Eis gelagert. Die Präparation der Imaginalscheiben erfolgte nach Fixierung und anschließender Färbung (siehe 5.2.2).

### 5.2.2 Präparation von Imaginalscheiben

Nach Fixierung und anschließender Färbung (siehe 5.2.3 und 5.2.4) wurden die Larvenpräparate mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf einen Objektträger transferiert. Die Imaginalscheibenpräparation erfolgte unter einem Stereomikroskop und unter Verwendung von Präpariernadeln. Die vereinzelt Imaginalscheiben wurden mit einer Pipette auf einen Objektträger überführt, mit einem Deckglas abgedeckt und dieses mit Nagellack fixiert.

Die Präparation und die Einbettung erfolgte bei X-Gal Färbung in 70% Glycerol und bei Antikörperfärbung in Vectashield mit 70% Glycerol (im Verhältnis 1:1). Bei Antikörperfärbung wurde als Eindeckmedium entweder Vectashield (VECTASHIELD® Mounting Medium Catalog No. H-1000, Vector Laboratories) oder Vectashield mit DAPI (VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI Catalog No. H-1200, Vector Laboratories) mit 70% Glycerol (im Verhältnis 1:1) verwendet.

### 5.2.3 X-Gal Färbung von L3 Imaginalscheiben

Für die X-Gal Färbung wurden die Larvenpräparate zunächst für 15 Min. mit der entsprechenden Fixierlösung (siehe 5.1.1) fixiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Nach der Fixierung wurden die Präparate einmal mit PBS gespült und dreimal für jeweils 5 Min. mit PBS gewaschen. Für die X-Gal Färbung wurde das PBS durch die frisch angesetzte Färbelösung ausgetauscht. Die Färbereaktion erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Falls nicht anders angegeben wurde über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate erneut einmal mit PBS gespült und dreimal für jeweils 5 Min. mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS durch 50% Glycerol ersetzt und für mindestens 1 Std. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Bis zur Präparation der Imaginalscheiben (siehe 5.2.2) wurden die Larvenpräparate in 70% Glycerol bei 4°C aufbewahrt.

### 5.2.4 Immunfluoreszenzfärbung von L3 Imaginalscheiben (Antikörperfärbung)

Für die Antikörperfärbung wurden die Larvenpräparate zunächst für 20 Min. bis 40 Min. mit 4%igem PFA fixiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf einem Schüttler. Nach der Fixierung wurden die Präparate drei- bis viermal mit PBT (mit 1% BSA) gespült und dreimal 20 Min. in PBT (mit 2,5% BSA) gewaschen und geblockt. Die Präparate wurden über Nacht mit dem primären Antikörper in PBT (mit 2,5% BSA) bei 4°C lichtgeschützt auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate erneut drei- bis viermal mit PBT (mit 1% BSA) gespült und dreimal 20 Min. in PBT (mit 2,5% BSA) gewaschen. Falls nicht anders angegeben wurden die Präparate mit dem sekundären Antikörper in PBT (mit 2,5% BSA) für 2 Std. lichtgeschützt auf einem Schüttler inkubiert. Nach drei Spülschritten mit PBT (mit 1% BSA) folgten drei, jeweils mindestens 20 Min umfassende

Waschschritte in PBT (mit 1% BSA). Bis zur Präparation der Imaginalscheiben wurden die Larvenpräparate in Vectashield mit 70% Glycerol (im Verhältnis 1:1) bei 4°C aufbewahrt.

### 5.2.5 Detektion proliferierender Zellen in Imaginalscheiben

Um Zellproliferation in Imaginalscheiben nachweisen zu können wurde das EdU-Click 647 Kit (Baseclick GmbH, Tutzing, Deutschland) verwendet. Dabei werden lebende Zellen in Zellkulturmedium inkubiert dem das Thymidinanalogon EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) zugesetzt wurde. Während der Replikation bauen dann Zellen in der S-Phase EdU statt Thymidin in ihre DNA ein. Das in die DNA inkorporierte EdU kann anschließend in fixierten Zellen in einer Kupfer (Cu(I))-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition mit einem Eterneon-Red 645 gekoppeltem Azid detektiert werden.

Zu Beginn wurde eine EdU-Lösung hergestellt. Hierfür wurde 1µl 10 mM EdU (Endkonzentration: 10 µM) in 1000µl Schneider's Insect Medium (Sigma Aldrich) gelöst. Die Larvenpräparate wurden für 20 Min. bei 25°C in 330µl der zuvor hergestellten EdU-Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Präparate für 20 Min. mit 4%igem PFA fixiert. Die Fixierung erfolgte bei Rt auf einem Schüttler. Nach der Fixierung wurden drei Waschschritte durchgeführt, in folgender Reihenfolge: für 20 Min. in PBS (mit 3% BSA), für 20 Min. in PBS (mit 0,5% TritonX-100) und für 20 Min. in PBT (mit 3% BSA). Anschließend erfolgte eine Click-IT Reaktion gegen EdU mit einem Reaktionsansatz der kurz vor der Verwendung, nach Herstellervorgaben, angesetzt wurde. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Präparate wurden für 30 min bei RT mit dem Reaktionsansatz inkubiert und dann für 20 Min. in PBS (mit 3% BSA) gewaschen. Im Anschluß wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (siehe 5.2.4).

### 5.2.6 Fliegenhaltung

Alle *Drosophila* Fliegenlinien wurden auf Standardfuttermedium in Plastikröhrchen gehalten, die mit luftdurchlässigen Schaumstoffstopfen verschlossen waren. Die Haltung der Fliegenlinien erfolgte bei 18°C. Falls nicht anders angegeben wurden die Fliegen zur Vermehrung und bei Kreuzungen auf 25°C überführt. Eine Erhöhung der Temperatur hat eine Steigerung der Vermehrungsrate zur Folge. So beträgt die Generationszeit von Fliegen bei 25°C etwa 11 Tage und bei 18°C etwa 21 Tage. Das Umsetzen der Fliegen in neue Plastikröhrchen mit frischem Futtermedium erfolgte bei einer Haltung bei 18°C nach 4 bis 5 Wochen und bei 25°C nach 2 bis 3 Wochen.

### 5.2.7 Fliegenkreuzung

Für genetische Kreuzungen müssen jungfräuliche Fliegen gesammelt werden. Hierfür wurden alle adulten Fliegen des entsprechenden Stammes aus dem Plastikröhrchen entfernt und dieses mit den verbleibenden Puppen und Larven bei 25°C gehalten. Die frisch geschlüpften jungfräulichen Weibchen wurden abgesammelt und gesondert bei 18°C, bis zur Verkreuzung, aufbewahrt. Die Unterscheidung von weiblichen und männlichen Fliegen erfolgte anhand folgender Merkmale: Im Vergleich zu weiblichen Fliegen besitzen männliche Fliegen einen auffälligen Geschlechtsapparat sowie Geschlechtskämme an den basalen Tarsen des ersten Beinpaars. Jungfräuliche Fliegen sind

allgemein heller als ältere Fliegen, und besitzen einen dunklen Fleck auf der ventralen Seite des Abdomens. Dieser stammt vom Meconium, dem Restdarm der Larve. Für eine gezielte genetische Kreuzung wurden zwischen 8 und 20 jungfräuliche weibliche Fliegen mit 4 bis 8 männlichen Fliegen, unterschiedlichen Alters, in einem Plastikröhrchen bei 25°C gehalten.

## 5.2.8 Untersuchung von *enhancer-trap* bzw. *reproter* Linien im *omb* mutanten

### Hintergrund

Zur Untersuchung von *enhancer-reporter* Linien im *omb* Nullmutanten Hintergrund wurden folgende *omb* mutante Allele verwendet: *I(1)omb<sup>3198</sup>*, *I(1)omb<sup>D4</sup>* und *I(1)omb<sup>15</sup>* (im Folgenden bezeichnet als *I(1)omb*). *I(1)omb/FM-GFP* Jungfrauen wurden mit männlichen Fliegen der zu untersuchenden Linie gekreuzt und die Nachkommen im dritten Larvenstadium untersucht. Männliche *omb* mutante Larven wurden aufgrund der fehlenden grünen Fluoreszenz identifiziert. Grün fluoreszierende männliche Larven dienten als Kontrolle. Zur Untersuchung von *enhancer-GAL4* Linien wurde zunächst ein UAS-lacZ Transgen in die zu untersuchende Linie eingebracht und anschließend mit *I(1)omb/FM-GFP* Jungfrauen gekreuzt. Zur Untersuchung von *enhancer-reporter* Linien im *bifid* mutanten Hintergrund wurden *omb<sup>bi</sup>* Jungfrauen mit männlichen Fliegen der zu untersuchenden Linie gekreuzt und die Nachkommen im dritten Larvenstadium untersucht. Mutante und Kontroll Larven wurden Anhand der Fluoreszenzmarker identifiziert, wie auch bei *I(1)omb* (siehe oben).

Zur Untersuchung von *enhancer-reporter* Linien im *bi/omb<sup>3198</sup>* mutanten Hintergrund waren zwei Kreuzungen notwendig. In der ersten Kreuzung wurden *bilbi*; Bal. (Bal., Balancerchromosom) Jungfrauen mit Männchen der entsprechenden Linie (GenX-lacZ) gekreuzt. Anschließend wurden *I(1)omb/FM-GFP* Jungfrauen mit Männchen des Genotyps *bi/Y*; GenX-lacZ/Bal. aus der F1 Generation gekreuzt. Die aus der zweiten Kreuzung resultierten Tiere des Genotyps *I(1)omb/bi*; GenX-lacZ wurden dann im dritten Larvenstadium untersucht.

## 5.2.9 Das GAL4/UAS System

Das GAL4/UAS System ermöglicht eine zeitlich und räumlich gerichtete Expression eines beliebigen Transgens in *Drosophila melanogaster* (Brand und Perrimon, 1993). Das System stammt aus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und kommt natürlicherweise nicht in *Drosophila* vor. Das System basiert auf zwei Komponenten: dem transkriptionellen Aktivator GAL4 und einem beliebigen Transgen unter der Kontrolle der GAL4 Erkennungssequenz, der sogenannten *upstream activation sequence* (UAS). Das GAL4-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der in *Saccharomyces* als Aktivator für die Gene des Galaktose Metabolismus fungiert. Das GAL4 Protein bindet als Dimer an die UAS. Anwendung findet dieses binäre System meist durch die Verwendung von zwei transgenen Linien: einer GAL4-Treiberlinie (Aktivatorlinie) und einer UAS-Linie (Effektorlinie). Die GAL4-Treiberlinie exprimiert den Transkriptionsfaktor GAL4 unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors und die UAS-Linie enthält ein UAS abhängiges Transgen. Durch Kreuzung dieser Linien, werden beide Komponenten des Systems in der Folgegeneration zusammengebracht und das GAL4 Protein kann an die UAS binden und die Transkription des UAS kontrollierten Transgens induzieren. Das GAL4/UAS System ermöglicht eine durch den GAL4 kontrollierenden Promotor spezifizierte

Expression eines beliebigen Transgens *in vivo*. Die hinter die UAS klonierte Sequenz kann z.B. für ein Protein oder auch eine dsRNA (für RNAi) kodieren. Ein Großteil der zur Verfügung stehenden Treiberlinien enthalten das pGawB Konstrukt, bei dem die GAL4-Expression unter der Kontrolle eines schwachen (P-Transposase) Promotors steht. Die zeitliche und räumliche Kontrolle der GAL4-Expression beruht auf endogene Enhancer in der Umgebung des pGawB Konstrukts.

### 5.2.10 Die TARGET Technik

Eine Erweiterung des GAL4/UAS Systems stellt die Verwendung des GAL4 Repressors GAL80 dar. Dieser reprimiert die GAL4 Aktivität durch eine physikalische Wechselwirkung. Dabei bindet GAL80 an die Transaktivator Domäne von GAL4, wodurch eine Bindung an die UAS und folglich eine Aktivierung des UAS kontrollierten Transgens verhindert wird. Über die TARGET (temporal and regional gene expression targeting) Technik wird zudem eine zeitliche Kontrolle des GAL4/UAS Systems erreicht, indem eine temperatursensitive Variante von GAL80 (GAL80<sup>ts</sup>) eingesetzt wird (McGuire et al., 2003). Bei permissiver Temperatur (18°C bzw. 25°C) wird der Repressor exprimiert und verhindert eine GAL4 vermittelte Transkription. Bei restriktiver Temperatur (29°C bzw. 29,8°C) wird die Repression durch GAL80<sup>ts</sup> aufgehoben. GAL80<sup>ts</sup> steht entweder unter der Kontrolle des tubulin 1 $\alpha$  oder des Actin Promotors und wird folglich ubiquitär exprimiert. Durch Änderung der Umgebungstemperatur wird also die reprimierende Wirkung von GAL80<sup>ts</sup> auf GAL4 weitestgehend aufgehoben und eine genaue Kontrolle des Expressionsstarts ermöglicht.

### 5.2.11 Kreuzungsexperimente mit der TARGET Technik

Für die gleichzeitige räumliche und zeitliche Kontrolle bei Überexpressions- bzw. Knockdown Experimenten wurde das GAL4/UAS/GAL80ts System verwendet. Die Expression eines UAS-omb bzw. UAS-ombRNAI Transgens stand unter der Kontrolle eines dpp-GAL4 Konstrukts, welches eine Expression innerhalb der Expressionsdomäne von *dpp* ermöglicht. Die zeitliche Kontrolle wurde über die Verwendung der Temperatursensitiven Variante des Repressors GAL80 (GAL80<sup>ts</sup>) ermöglicht. Der Temperaturwechsel von 18°C auf 29°C, zur Aufhebung der Repressoraktivität von GAL80<sup>ts</sup>, fand drei bis vier Tage vor der Präparation der Larven statt.

Zur Untersuchung des Effekts einer *omb* Überexpression wurden sowohl zweitchromosomale als auch drittchromosomale *enhancer-trap* bzw. *reporter* Linie verwendet. Für die Untersuchung einer zweitchromosomalen *enhancer-trap* bzw. *reporter* Linie wurde diese zunächst mit *w/w*; *CyO*\*/*Pm*; UAS-omb Jungfrauen gekreuzt um anschließend Männchen des Genotyps *w/Y*; *CyO*\*/*GenX-lacZ*; UAS-omb/III (aus der F1 Generation) mit Jungfrauen der Linie *w/w*; *tub-Gal80ts*; *dpp-Gal4/TM6*, *Tb* zu kreuzen. Nach Selektion gegen die Marker *Tb* und *CyO*\* wurden Larven folgender Genotypen mittels Antikörperfärbung gegen *Omb* identifiziert und unterschieden: *w*; *tub-Gal80ts/GenX-lacZ*; *dpp-Gal4/UAS-omb* und *w*; *tub-Gal80ts/GenX-lacZ*; *dpp-Gal4/III*. Tiere ohne UAS-omb Transgen dienten als Kontrolle. Bei drittchromosomalen *enhancer-trap* bzw. *reporter* Linien wurden in der ersten Kreuzung Männchen des Genotyps *w*; UAS-omb; *TM6b\**, *Sb*, *Tb/CxD* verwendet und die Larven der F1 Generation nach der zweiten Kreuzung gegen den Marker *Tb* selektiert.

Kreuzungen von zweitchromosomalen *enhancer-reporter* Linien (*omb* Überexpression):

Kreuzung 1)		
w/w; CyO*/Pm; UAS-omb	x	w/Y; GenX-lacZ/II
w; CyO*/GenX-lacZ; UAS-omb/III		

Kreuzung 2)		
w; tub-Gal80ts; dpp-Gal4/TM6, Tb	x	w/Y; CyO*/GenX-lacZ; UAS-omb/III
w; tub-Gal80ts/GenX-lacZ; dpp-Gal4/UAS-omb		
w; tub-Gal80ts/GenX-lacZ; dpp-Gal4/III		

Kreuzungen von drittchromosomalen *enhancer-reporter* Linien (*omb* Überexpression):

Kreuzung 1)		
w/w; UAS-omb; TM6b*, Sb, Tb/CxD	x	w/Y; GenX-lacZ/III
w; UAS-omb/II; TM6b*, Sb, Tb/GenX-lacZ		

Kreuzung 2)		
w; tub-Gal80ts; dpp-Gal4/TM6, Tb	x	w/Y; UAS-omb/II; TM6b*, Sb, Tb/GenX-lacZ
w; tub-Gal80ts/UAS-omb; dpp-Gal4/GenX-lacZ		
w; tub-Gal80ts/II; dpp-Gal4/GenX-lacZ		

Für *Knockdown* Experimente wurden Fliegen des Genotyps w; CyO\*/Pm; UAS-ombRNAi eingesetzt und ausschließlich zweitchromosomale *enhancer-reporter* Linien untersucht. Beide notwendigen Kreuzungen wurden nach dem gleichen Prinzip wie bei der Überexpression von *omb* (siehe oben) durchgeführt.

Kreuzungen von zweitchromosomalen *enhancer-reporter* Linien (*omb Knockdown*):

Kreuzung 1)		
w/w; CyO*/Pm; UAS-ombRNAi	x	w/Y; GenX-lacZ/II
w; CyO*/GenX-lacZ; UAS-ombRNAi/III		

Kreuzung 2)		
w; tub-Gal80ts; dpp-Gal4/TM6, Tb	x	w/Y; CyO*/GenX-lacZ; UAS-ombRNAi/III
w; tub-Gal80ts/GenX-lacZ; dpp-Gal4/UAS-ombRNAi		
w; tub-Gal80ts/GenX-lacZ; dpp-Gal4/III		

### 5.2.12 RNA-Interferenz

Bei der endogenen RNA-Interferenz (RNAi, auch RNA-Silencing genannt) handelt es sich um einen natürlichen Mechanismus der Zelle zur posttranskriptionellen Genregulation, durch die gezielte Inaktivierung von Genen. Eingeleitet wird dieser Mechanismus durch doppelsträngige RNA (dsRNA), die an komplementäre mRNA binden kann, um sie zu blockieren und den Abbau der komplementären

mRNA Sequenz veranlasst (zusammengefasst in Ameres und Zamore, 2013). Die Kombination der RNAi mit dem GAL4/UAS System (siehe 5.2.9) bietet die Möglichkeit der zeit- und gewebespezifischen Stilllegung einer bestimmten Genaktivität in *Drosophila*. Hierfür werden Gal4-Fliegenlinien, die Gal4 in spezifischen zeitlichen und/oder räumlichen Mustern exprimieren, mit UAS-RNAi-Fliegenlinien gekreuzt. Diese exprimieren jeweils ein einzigartiges Transgen, das für eine dsRNA mit Komplementarität zu einem endogenen Gen kodiert (zusammengefasst in Heigwer et al. 2018). In dieser Arbeit wurde ein UAS-ombRNAi-Transgen in der *dpp* oder *en* Expressionsdomäne, in der Flügelimaginalscheibe, exprimiert. Zur Überprüfung der RNAi-Effizienz wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Omb durchgeführt.

### 5.2.13 Das FLP/FRT System

Das FLP/FRT System erlaubt die Generierung homozygoter Zellklone in ansonsten heterozygoten Tieren mittels mitotischer Rekombination. Dieses System stammt ebenfalls aus *Saccharomyces cerevisiae* und beruht auf der homologen Rekombination während der Mitose. Die Rekombination findet zwischen sogenannten FRT (flipase recombinase target) Sequenzen statt, welche durch die sequenzspezifische Rekombinase FLP (Flipase) erkannt und miteinander rekombiniert werden (Golic und Lindquist, 1989; Golic, 1991; Xu und Rubin, 1993). Befinden sich auf homologen Chromosomenarmen FRT Sequenzen resultiert die FLP vermittelte mitotische Rekombination zum Austausch der distal der FRT Sequenzen gelegenen Chromosomenarmen. Befindet sich außerdem eine heterozygote Mutation distal der FRT Sequenz, führt dies zur Entstehung von zwei Tochterzellen die sich in genetischer Hinsicht voneinander und von der heterozygoten Elternzelle unterscheiden. Nachdem Rekombinations-Ereignis sind beide Tochterzellen homozygot für den distal der FRT Sequenzen gelegenen Teil des Chromosomenarms. Eine der beiden Tochterzellen ist homozygot für die Mutation (distal der FRT Sequenz) und erzeugt über Zellteilung genetisch identische Zellen wodurch ein mutanter Zellklon entsteht. Die andere Tochterzelle ist homozygot für den „wildtypischen“ Chromosomenarm und generiert über Zellteilung einen sogenannten Zwillingsklon (twin-spot) der genetisch wildtypisch ist. Für eine visuelle Unterscheidung der beiden Klone, befindet sich meist auf dem wildtypischen Chromosomenarm ein Markergen (z.B. GFP) unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors (z.B. ubi, ubiquitin). Alle heterozygoten Zellen exprimieren eine Kopie des Markergens, Zellen des Zwillingsklons zwei Kopien und der mutante Zellklon keine Kopie. Häufig können anhand der Expressionsstärke alle drei Genotypen mittels Fluoreszenzmikroskopie unterschieden werden. Die Position der homologen FRT Sequenzen legt die Position der Rekombination fest. Für die klonale Analyse wurde ein für Flipase kodierendes Transgen unter der Kontrolle eines Hitzeschock induzierbaren Promotors (hsp70) verwendet (hsFLP). Dies erlaubt die zeitliche Kontrolle der FLP Induktion.

Exemplarische Kreuzungen einer zweitchromosomalen *enhancer-reporter* Linie (unter Verwendung der Linie 740):

Kreuzung 1)		
mRFP hsFLP FRT19A; CyO*Dfd-GFP/Sco	x	w/Y; GenX-lacZ/II

mRFP hsFLP FRT19A/Y; CyO*/GenX-lacZ		
-------------------------------------	--	--

Kreuzung 2)		
l(1)ombFRT19A/FM-GFP	x	mRFP hsFLP FRT19A/Y; CyO*/GenX-lacZ
mRFP hsFLP FRT19A/l(1)ombFRT19A; GenX-lacZ/II		
mRFP hsFLP FRT19A/FM-GFP; GenX-lacZ/II		

Exemplarische Kreuzungen einer drittchromosomalen *enhancer-reporter* Linie (unter Verwendung der Linie 554):

Kreuzung 1)		
ubi-gfp, hs-flp, FRT19A;; mRFP/TM6,Tb	x	w/Y; GenX-lacZ/III
ubi-gfp, hs-flp, FRT19A/Y; TM6,Tb/GenX-lacZ		
ubi-gfp, hs-flp, FRT19A/Y; mRFP/GenX-lacZ		

Kreuzung 2)		
l(1)ombFRT19A/FM-GFP	x	ubi-gfp, hs-flp, FRT19A/Y; TM6,Tb/GenX-lacZ
ubi-gfp, hs-flp, FRT19A/l(1)ombFRT19A; GenX-lacZ/III		
ubi-gfp, hs-flp, FRT19A/FM-GFP; GenX-lacZ/III		

Kreuzung zur Generierung von *kto* mutanten Klonen

Zur Generierung von *kto* mutanten Klonen wurden hs-FLP; arm-Z FRT80B Jungfrauen mit Männchen des Genotyps w/Y;; *kto* FRT80B/TM6,Tb gekreuzt. Die aus dieser Kreuzung hervorgegangenen Larven wurden im ersten Larvenstadium einem einstündigen Hitzeschock bei 37°C im Wasserbad ausgesetzt. Die Larven wurden vor der Präparation im dritten Larvenstadium gegen den Marker Tb selektiert.

### 5.2.14 Das FLPout-GAL4 System

Das FLPout-GAL4 System kombiniert das FLP/FRT System (Xu und Rubin, 1993) mit dem GAL4/UAS System (Brand und Perrimon, 1993) und ermöglicht die konstitutive Expression eines Transgens in markierten Zellen oder Zellklonen. Eine sogenannte FLPout Kasette (auch FRT Kasette genannt) trennt das für GAL4 kodierende Transgen von einem meist ubiquitär aktiven Promotor (z.B: Act5C oder tub1 $\alpha$ ). Die FLPout Kasette wird an beiden Seiten durch eine FRT Sequenz flankiert und enthält ein Markergen (z.B. CD2) und eine Transkriptions Terminationsstelle (polyA Signal). Die flankierenden FRTs müssen die gleiche Orientierung aufweisen, damit die FLP vermittelte Rekombination (der FRT Elemente) zur Exzision der FRT-flankierten Sequenz führt. Zur Induktion der Rekombinase FLP wird meist der hitzeschock induzierbare Promotor des hsp70 Gens genutzt. Ein Hitzeschock resultiert in der ubiquitären Expression der FLP. Über den Zeitpunkt und die Dauer des Hitzeschocks kann Einfluss auf die FLP Induktion und die Klonbildung genommen werden. Generell resultiert ein früher Hitzeschock (Induktion) in größere Klone und die Dauer des Hitzeschocks beeinflusst die Anzahl der

Zellen in denen ein FLPout-Ereignis stattfindet. Durch Induktion der FLP und anschließender Exzision der Kasette mitsamt der Transkriptions Terminationsstelle, gelangt die für GAL4 kodierende Region unter die Kontrolle des ubiquitären Promotors. Klone die GAL4 exprimieren aktivieren ein vorhandenes UAS Transgen und können über ein zusätzliches UAS Transgen (z.B. UAS-GFP) positiv markiert werden.

#### 5.2.14.1 Generierung von omb Überexpressions Zellklone (g-o-f)

Zur Generierung von markierten Klonen die *omb* überexprimieren wurde das *act>CD2>GAL4* Konstrukt verwendet (im folgenden *act>stop>GAL4* bezeichnet) (Ito et al., 1997). Für klonale Überexpressionsexperimente (gain of function, g-o-f) waren zwei Kreuzungen notwendig.

In der ersten Kreuzung wurden hs-GFP hs-FLP FRT19; CyO\*Dfd-GFP/Sco Jungfrauen mit Männchen der entsprechenden Linie (GenX-lacZ auf dem zweiten Chromosom) gekreuzt. Anschließend wurden w; UAS-omb; *act>CD2>Gal4*, UAS-mRFP/ TM6b\* Jungfrauen mit Männchen des Genotyps hs-GFP hs-FLP FRT19/Y; CyO\*/lacZ aus der F1 Generation gekreuzt. Die aus der zweiten Kreuzung resultierten Tiere des Genotyps w/ hs-GFP hs-FLP FRT19; UAS-omb/lacZ; *act>CD2>Gal4*, UAS-mRFP/III konnten aufgrund der fehlenden grünen Fluoreszenz (CyO\*Dfd-GFP und TM6b\*) identifiziert werden. Bei diesen Larven führte ein Hitzeschock von 40 Min. zu einer hohen Anzahl von *omb* exprimierenden Zellklonen. Ein Hitzeschock von 20 Min. führte zu einer geringeren Anzahl von Klonen. Aufgrund des UAS-mRFP Konstrukts waren die *omb* Überexpressions Zellklone positiv markiert. Der Hitzeschock erfolgte stets drei Tage vor der Präparation der Larven.

Kreuzung 1)		
hsGFP hsFLP FRT19; CyO*Dfd-GFP/Sco	x	w/Y; GenX-lacZ/II
hsGFP hsFLP FRT19/Y; CyO*/GenX-lacZ		

Kreuzung 2)		
w; UAS-omb; <i>act&gt;CD2&gt;Gal4</i> , UAS-mRFP/TM6b*	x	hsGFP hsFLP FRT19/Y; CyO*/GenX-lacZ
w/ hsGFP hsFLP FRT19; UAS-omb/ GenX-lacZ; <i>act&gt;CD2&gt;Gal4</i> , UAS-mRFP/III		

#### 5.2.15 Mikroskopie und Dokumentation der Imaginalscheiben

Die Orientierung der dokumentierten Imaginalscheiben, falls nicht anders angegeben, ist stets: anterior/links, posterior/rechts, dorsal/oben und ventral/unten. Die Abbildungen (Kollagen) wurden mit Adobe Photoshop CS4 oder CS6 (Adobe Systems Incorporated, San Jose/USA) erstellt.

#### 5.2.16 Durchlicht-Mikroskopie (X-Gal Färbung)

Zur Dokumentation der Imaginalscheiben nach X-Gal Färbung wurde als Mikroskop das Axioplan (Fa. Carl Zeiss AG, Göttingen/D) benutzt. Dabei wurde die Software Axio Vision (Release 4.8.2, Carl Zeiss

Vision GmbH) auf einem Standard PC verwendet. Die Bildaufnahme erfolgte bei 10facher Vergrößerung, mit einer Auflösung von 512x512 Pixeln.

### 5.2.17 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (Immufluoreszenzfärbung)

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden mit einem inversen konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert (Leica TCS SP5, Fa. Leica Microsystems, Heidelberg/D). Für die konfokale Bildaufnahme wurde die zugehörige Software (Leica Application Suite (LAS), Fa. Leica Microsystems) verwendet. Diese erfolgte bei 20facher Vergrößerung, mit einer Auflösung von 1024x1024 Pixeln. Bei Mehrfachfärbungen wurden alle Fluoreszenzfarbstoffe einzeln (sequentiell) angeregt und detektiert. Z-Bildstapel von (x, y) Schnittebenen wurden entlang der z-Achse aufgenommen. Anschließend wurden Maximalprojektionen (maximale Überalterungsprojektionen) der z-Reihe generiert. Einzelne z-Schnitte ("Querschnitte") wurden als digitale (x, z) Schnitte durch die Maximalprojektion der Z-Bildstapel erzeugt, unter Verwendung der Software LAS AF Lite (Fa. Leica Microsystems).

Für die Aufnahmen zu einer Serie – *wt*, *bi*, *bi/omb*<sup>3198</sup> und *l(1)omb*<sup>3198</sup> – blieben alle Einstellungen unverändert.

### 5.2.18 Bildbearbeitung

Die konfokale Datenverarbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop CS4 oder Adobe Photoshop CS6, die Abbildungen (Kollagen) wurden mit Adobe Photoshop CS4 erstellt. Für die Abbildungen der konfokalen Bilddaten wurden mit Adobe Photoshop die Bilder einer z-Reihe (Z-Bildstapel) in einer Maximalprojektion zusammengefügt. In einigen Fällen wurden vor der Maximalprojektion apikale und/oder basale Bilder der z-Reihe entfernt, um die Signale in den Imaginalscheiben sichtbar zu machen oder störende Signale zu entfernen. Die anschließende Bildbearbeitung wurde mit Adobe Photoshop mittels Tonwertkorrektur durchgeführt (in der Bildbeschreibung als „Tonwertkorrigiert“ vermerkt).

### 5.2.19 Allgemeine Software

Die vorliegende Arbeit wurde in Microsoft® Word 2011 und Microsoft® Word 2016 (Microsoft Corporation, Redmond/USA) geschrieben. Zur Bildbearbeitung wurde Adobe® Photoshop CS4 oder CS6 (Adobe Systems Incorporated, San Jose/USA) benutzt. Schematische Darstellungen (Zeichnungen) und ähnliche Abbildungen wurden unter Verwendung von Adobe® Illustrator CS4 (Adobe Systems Incorporated, San Jose/USA) generiert und mit Hilfe von Adobe® Photoshop CS4 oder CS6 (Adobe Systems Incorporated, San Jose/USA) bearbeitet.

## 6 Zusammenfassung

In den zwei Teilen dieser Arbeit wurde die Auswirkung des Verlusts von *optomotor-blind (omb)* auf die dorso-ventrale (D/V) Kompartimentsgrenze und auf die Entwicklung der Gelenkregion der Flügelimaginalscheibe untersucht.

Es war bekannt, dass der vollständige Verlust von *omb* zu einer ektopischen Expression des dorsalen Selektorgens *apterous (ap)* im V-Kompartiment der Flügelimaginalscheibe führt. In der Normalentwicklung des Flügels wird an der Grenze zwischen  $Ap^+$  und  $Ap^-$  Zellen durch Aktivierung des Notch (N) Signalweges die D/V-Grenze induziert. Hier wurde nachgewiesen, dass auch an ektopischen  $Ap^+/Ap^-$ -Grenzen in *omb* mutanten Scheiben N aktiviert wird (nachgewiesen durch die Expression des N-Zielgens *wingless (wg)*). Dies bedeutet, dass der Prozess der D/V-Grenzbildung *Omb*-unabhängig ist. Dennoch kann *omb* die Positionierung der D/V-Grenze beeinflussen. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass klonale Fehlexpression von *ap* in der Nähe der D/V-Grenze zu einer vollständigen Fusion des Klons mit dem entsprechenden Kompartiment führt, d.h. ventrale  $Ap^+$ -Klone werden in das D-Kompartiment integriert und umgekehrt. Hier zeigte ich, dass dies nicht gilt, wenn die  $Ap^+$  Klone innerhalb eines *omb* Klons lagen. In einem gängigen Modell wird angenommen, dass sich Kompartimente in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen unterscheiden. Nach diesem Modell könnte der Verlust von *omb* zu einer Aufhebung des Adhäsivitätsunterschiedes zwischen dorsalen ( $Ap^+$ ) und ventralen ( $Ap^-$ ) Zellen führen. Interessanterweise hat *Omb* eine ähnliche Funktion an der anterior-posterioren (A/P) Kompartimentgrenze (Shen und Dahmann, 2005).

Klone, die mutant für *kohtalo (kto)* sind, weisen bezüglich *ap* Ähnlichkeiten mit *omb* Klonen auf (Janody und Treisman, 2003). *Kto* kodiert für das Ortholog des allgemeinen Transkriptionsfaktors Med12. In *kto* Klonen wurde *Omb* allerdings hochreguliert, auch zeigten *kto* Klone *Wg* Expression im und nicht um den Klon. In L2 Flügelscheiben tragen die Zelloberflächenmoleküle *Capricious (Caps)* und *Tartan (Trn)* zur dorsal-spezifischen Zellaffinität bei (Milan et al., 2001). Verlust von *omb* führte zu ektopischer Expression von *caps* und *trn*. Allerdings unterscheidet sich das Verhalten von  $Caps^+$  und  $Trn^+$  Klonen an der D/V-Grenze von *omb* Klonen. Diese Ergebnisse machen unwahrscheinlich, dass *Kto*, *Omb* und *Caps/Trn* in einem Signalweg agieren.

*Omb* ist essentiell für die Entwicklung des Flügelgelenks (*hinge*). Das hypomorphe *omb* Allel *omb<sup>bifid</sup> (bi)* ist nach seinem Flügelphänotyp benannt. Ich untersuchte die Auswirkung von systemischem (in der Serie *wt, bi, I(1)omb/bi, I(1)omb*), regionalem (*Gal4>omb-RNAi*) und klonalem *omb* Verlust sowie von *omb* Überexpression auf die Expression *hinge*-relevanter Gene. In der Flügelimaginalscheibe liegt die Anlage der *hinge* ringförmig um die Anlage des Flügelblatts (*pouch*). *Omb* wird stark in der dorsomedialen und ventromedialen *hinge*-Anlage exprimiert.

Das A-P Musterbildungsgen *decapentaplegic (dpp)*, das für die Expression von *omb* essentiell ist, wurde im *omb* mutanten Hintergrund überexprimiert. *Omb* wirkt daher als feed-back Inhibitor auf *dpp*. *Wg* ist notwendig für die *hinge*-Entwicklung und wird in zwei Ringen in der *hinge*-Anlage exprimiert (innerer und äußerer Ring, *wg-IR*, *wg-OR*). *Omb* war vor allem für die *Wg*-Expression im innerem (distalen) Teil des *wg-IR* notwendig. Dies war überraschend, weil Untersuchungen zur Regulation der *wg-IR* Expression vorher keinen Hinweis auf eine Feinstruktur dieser Expressionsdomäne gegeben

hatten. Viele hinge-relevante Gene oder Signalwege zeigten teils subtile, teils deutliche Veränderungen im *omb* mutanten Hintergrund (*zfh2*, *nab*, *hth*, *tsh*, *Jak/STAT*, *ds*).

Der zunehmende Verlust von *omb* bewirkte eine Verbreiterung der Falten, die in der hinge-Anlage die pouch konzentrisch umgeben. Diese Verbreiterung konnte die anscheinend erweiterte Expression einiger Gene erklären. *Omb* Hypomorphie bedingte eine Zunahme von Apoptose aber auch von (möglicherweise kompensativer) Proliferation in der hinge Region. Der im adulten Flügel manifeste Gewebsverlust erfolgt daher möglicherweise im Pupalstadium.

Bislang ist es nicht gelungen, durch Manipulation der Expression einzelner Gene den *omb* hinge Phänotyp zu retten. Die hier gefundenen Auswirkungen auf viele Gene könnten erklären, warum solche Einzelmanipulationen nicht ausreichend sind. Eine weitere Komplikation ist, dass sich Flügelgelenk und Flügelblatt nicht unabhängig von einander entwickeln. Four-jointed (*Fj*) und Dachous (*Ds*), Regulatoren des Hippo-Signalweges, sind an der Integration der Entwicklungsprozesse beteiligt. Die Expression beider Gene wird in pouch bzw. hinge durch *Omb* beeinflusst.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adachi-Yamada T, Fujimura-Kamada K, Nishida Y, Matsumoto K. Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature*. 1999;400(6740):166-169.
- Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(8):475-488.
- Arbouzova NI, Zeidler MP. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development*. 2006;133(14):2605-2616.
- Ayala-Camargo A, Anderson AM, Amoyel M, Rodrigues AB, Flaherty MS, Bach EA. JAK/STAT signaling is required for hinge growth and patterning in the *Drosophila* wing disc. *Dev Biol*. 2013;382(2):413-426.
- Aza-Blanc P, Ramírez-Weber FA, Laget MP, Schwartz C, Kornberg TB. Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell*. 1997;89(7):1043-1053.
- Azpiazu N, Morata G. Function and regulation of homothorax in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Development*. 2000;127(12):2685-2693.
- Bach EA, Ekas LA, Ayala-Camargo A, et al. GFP reporters detect the activation of the *Drosophila* JAK/STAT pathway in vivo. *Gene Expr Patterns*. 2007;7(3):323-331.
- Baena-Lopez LA, Franch-Marro X, Vincent JP. Wingless promotes proliferative growth in a gradient-independent manner. *Sci Signal*. 2009;2(91):ra60.
- Baldini A. Dissecting contiguous gene defects: TBX1. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(3):279-284.
- Baonza A, Roch F, Martin-Blanco E. DER signaling restricts the boundaries of the wing field during *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(13):7331-7335.
- Bate M, Arias AM. The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development*. 1991;112(3):755-761.
- Bessa J, Carmona L, Casares F. Zinc-finger paralogues tsh and tio are functionally equivalent during imaginal development in *Drosophila* and maintain their expression levels through auto- and cross-negative feedback loops. *Dev Dyn*. 2009;238(1):19-28.
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*. 1996;382(6588):225-230.
- Bhojwani J, Singh A, Misquitta L, Mishra A, Sinha P. Search for *Drosophila* genes based on patterned expression of mini-white reporter gene of a P lacW vector in adult eyes. *Roux Arch Dev Biol*. 1995;205(3-4):114-121.
- Bidet M, Joubert O, Lacombe B, et al. The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport. *PLoS One*. 2011;6(9):e23834.
- Bieli D, Kanca O, Requena D, et al. Establishment of a Developmental Compartment Requires Interactions between Three Synergistic Cis-regulatory Modules. *PLoS Genet*. 2015;11(10):e1005376.
- Bier E, Jan LY, Jan YN. rhomboid, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*. 1990;4(2):190-203.
- Blackman RK, Sanicola M, Rafferty LA, Gillevet T, Gelbart WM. An extensive 3' cis-regulatory region

- directs the imaginal disk expression of decapentaplegic, a member of the TGF-beta family in *Drosophila*. *Development*. 1991;111(3):657-666.
- Blair SS, Brower DL, Thomas JB, Zavortink M. The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development*. 1994;120(7):1805-1815.
- Blair SS, Ralston A. Smoothed-mediated Hedgehog signalling is required for the maintenance of the anterior-posterior lineage restriction in the developing wing of *Drosophila*. *Development*. 1997;124(20):4053-4063.
- Boisclair Lachance JF, Peláez N, Cassidy JJ, Webber JL, Rebay I, Carthew RW. A comparative study of Pointed and Yan expression reveals new complexity to the transcriptional networks downstream of receptor tyrosine kinase signaling. *Dev Biol*. 2014;385(2):263-278.
- Borggreffe T, Yue X. Interactions between subunits of the Mediator complex with gene-specific transcription factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(7):759-768.
- Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993;118(2):401-415.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*. 2003;113(1):25-36.
- Brower DL. Engrailed gene expression in *Drosophila* imaginal discs. *EMBO J*. 1986;5(10):2649-2656.
- Brückner K, Perez L, Clausen H, Cohen S. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature*. 2000;406(6794):411-415.
- Brummel T, Abdollah S, Haerry TE, et al. The *Drosophila* activin receptor baboon signals through dSmad2 and controls cell proliferation but not patterning during larval development. *Genes Dev*. 1999;13(1):98-111.
- Bryant PJ. Pattern formation in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*: fate map, regeneration and duplication. *J Exp Zool*. 1975;193(1):49-77.
- Bryant PJ, Levinson P. Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila*, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. *Dev Biol*. 1985;107(2):355-363.
- Capdevila J, Guerrero I. Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J*. 1994;13(19):4459-4468.
- Carrera I, Janody F, Leeds N, Duvéau F, Treisman JE. Pygopus activates Wingless target gene transcription through the mediator complex subunits Med12 and Med13. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(18):6644-6649.
- Casares F, Mann RS. A dual role for homothorax in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in *Drosophila*. *Development*. 2000;127(7):1499-1508.
- Cavodeassi F, Diez Del Corral R, Campuzano S, Domínguez M. Compartments and organising boundaries in the *Drosophila* eye: the role of the homeodomain Iroquois proteins. *Development*. 1999;126(22):4933-4942.
- Cavodeassi F, Rodríguez I, Modolell J. Dpp signalling is a key effector of the wing-body wall subdivision of the *Drosophila* mesothorax. *Development*. 2002;129(16):3815-3823.
- Certel K, Hudson A, Carroll SB, Johnson WA. Restricted patterning of vestigial expression in

- Drosophila* wing imaginal discs requires synergistic activation by both Mad and the drifter POU domain transcription factor. *Development*. 2000;127(14):3173-3183.
- Chen Y, Struhl G. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell*. 1996;87(3):553-563.
- Cho E, Irvine KD. Action of fat, four-jointed, dachsous and dachs in distal-to-proximal wing signaling. *Development*. 2004;131(18):4489-4500.
- Cifuentes FJ, García-Bellido A. Proximo-distal specification in the wing disc of *Drosophila* by the nubbin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(21):11405-11410.
- Clements M, Duncan D, Milbrandt J. *Drosophila* NAB (dNAB) is an orphan transcriptional co-repressor required for correct CNS and eye development. *Dev Dyn*. 2003;226(1):67-81.
- Cohen B, McGuffin ME, Pfeifle C, Segal D, Cohen SM. *apterous*, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev*. 1992;6(5):715-729.
- Coleman KG, Poole SJ, Weir MP, Soeller WC, Kornberg T. The *invected* gene of *Drosophila*: sequence analysis and expression studies reveal a close kinship to the *engrailed* gene. *Genes Dev*. 1987;1(1):19-28.
- Conaway RC, Conaway JW. Origins and activity of the Mediator complex. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(7):729-734.
- Couso JP, Bate M, Martínez-Arias A. A wingless-dependent polar coordinate system in *Drosophila* imaginal discs. *Science*. 1993;259(5094):484-489.
- Couso JP, Knust E, Martínez Arias A. *Serrate* and *wingless* cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in *Drosophila*. *Curr Biol*. 1995;5(12):1437-1448.
- Culí J, Martín-Blanco E, Modolell J. The EGF receptor and N signalling pathways act antagonistically in *Drosophila* mesothorax bristle patterning. *Development*. 2001;128(2):299-308.
- Dahmann C, Basler K. Opposing transcriptional outputs of Hedgehog signaling and engrailed control compartmental cell sorting at the *Drosophila* A/P boundary. *Cell*. 2000;100(4):411-422.
- de Celis JF, Bray S. Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development*. 1997;124(17):3241-3251.
- de Celis JF, Bray S, Garcia-Bellido A. Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development*. 1997;124(10):1919-1928.
- de Celis JF, Garcia-Bellido A, Bray SJ. Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development*. 1996;122(1):359-369.
- Debenedittis P, Harmelink C, Chen Y, Wang Q, Jiao K. Characterization of the novel interaction between muskellin and TBX20, a critical cardiogenic transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;409(2):338-343.
- del Alamo Rodríguez D, Terriente Felix J, Díaz-Benjumea FJ. The role of the T-box gene *optomotor-blind* in patterning the *Drosophila* wing. *Dev Biol*. 2004;268(2):481-492.
- Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM. Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell*. 1993;75(4):741-752.
- Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM. *Serrate* signals through Notch to establish a *Wingless*-dependent

- organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development*. 1995;121(12):4215-4225.
- Dichtel-Danjoy ML, Caldeira J, Casares F. SoxF is part of a novel negative-feedback loop in the wingless pathway that controls proliferation in the *Drosophila* wing disc. *Development*. 2009;136(5):761-769.
- Diez del Corral R, Aroca P, Gomez-Skarmeta JL, Cavodeassi F, Modolell J. The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev*. 1999;13(13):1754-1761.
- Doherty D, Feger G, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN. Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev*. 1996;10(4):421-434.
- Domínguez M, Brunner M, Hafen E, Basler K. Sending and receiving the hedgehog signal: control by the *Drosophila* Gli protein Cubitus interruptus. *Science*. 1996;272(5268):1621-1625.
- Eaton S, Kornberg TB. Repression of *ci-D* in posterior compartments of *Drosophila* by engrailed. *Genes Dev*. 1990;4(6):1068-1077.
- Fasano L, Röder L, Coré N, et al. The gene *teashirt* is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs. *Cell*. 1991;64(1):63-79.
- Fleming RJ, Gu Y, Hukriede NA. Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene *fringe* in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development*. 1997;124(15):2973-2981.
- Fristrom D, Wilcox M, Fristrom J. The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in *Drosophila* wing development. *Development*. 1993;117(2):509-523.
- Gao S, Moreno M, Eliason S, et al. TBX1 protein interactions and microRNA-96-5p regulation controls cell proliferation during craniofacial and dental development: implications for 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Mol Genet*. 2015;24(8):2330-2348.
- Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G. Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol*. 1973;245(147):251-253.
- Ghiglione C, Amundadottir L, Andresdottir M, et al. Mechanism of inhibition of the *Drosophila* and mammalian EGF receptors by the transmembrane protein Kekkón 1. *Development*. 2003;130(18):4483-4493.
- Ghiglione C, Carraway KL, Amundadottir LT, Boswell RE, Perrimon N, Duffy JB. The transmembrane molecule *kekkon 1* acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the *Drosophila* EGF receptor during oogenesis. *Cell*. 1999;96(6):847-856.
- Giraldez AJ, Cohen SM. Wingless and Notch signaling provide cell survival cues and control cell proliferation during wing development. *Development*. 2003;130(26):6533-6543.
- Golembo M, Raz E, Shilo BZ. The *Drosophila* embryonic midline is the site of Spitz processing, and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm. *Development*. 1996;122(11):3363-3370.
- Golic KG. Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science*. 1991;252(5008):958-961.

- Golic KG, Lindquist S. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell*. 1989;59(3):499-509.
- Grimm S, Pflugfelder GO. Control of the gene *optomotor-blind* in *Drosophila* wing development by *decapentaplegic* and *wingless*. *Science*. 1996;271(5255):1601-1604.
- Grusche FA, Richardson HE, Harvey KF. Upstream regulation of the *hippo* size control pathway. *Curr Biol*. 2010;20(13):R574-582.
- Guha A, Kornberg TB. Tracheal branch repopulation precedes induction of the *Drosophila* dorsal air sac primordium. *Dev Biol*. 2005;287(1):192-200.
- Guichard A, Biehs B, Sturtevant MA, et al. *rhomboid* and *Star* interact synergistically to promote EGFR/MAPK signaling during *Drosophila* wing vein development. *Development*. 1999;126(12):2663-2676.
- Gutiérrez L, Zurita M, Kennison JA, Vázquez M. The *Drosophila* *trithorax* group gene *tonalli* (*tna*) interacts genetically with the *Brahma* remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. *Development*. 2003;130(2):343-354.
- Hadar N, Yaron S, Oren Z, et al. A screen identifying genes responsive to Dpp and Wg signaling in the *Drosophila* developing wing. *Gene*. 2012;494(1):65-72.
- Hamaratoglu F, Affolter M, Pyrowolakis G. Dpp/BMP signaling in flies: from molecules to biology. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;32:128-136.
- Heigwer F, Port F, Boutros M. RNA Interference (RNAi) Screening in. *Genetics*. 2018;208(3):853-874.
- Hidalgo A. Three distinct roles for the *engrailed* gene in *Drosophila* wing development. *Curr Biol*. 1994;4(12):1087-1098.
- Huang S, Hölzel M, Knijnenburg T, et al. MED12 controls the response to multiple cancer drugs through regulation of TGF- $\beta$  receptor signaling. *Cell*. 2012;151(5):937-950.
- Huh JR, Guo M, Hay BA. Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase *Dronc* in a nonapoptotic role. *Curr Biol*. 2004;14(14):1262-1266.
- Huppert SS, Jacobsen TL, Muskavitch MA. Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development*. 1997;124(17):3283-3291.
- Irvine KD, Wieschaus E. *fringe*, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell*. 1994;79(4):595-606.
- Ishikawa HO, Takeuchi H, Haltiwanger RS, Irvine KD. *Four-jointed* is a Golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains. *Science*. 2008;321(5887):401-404.
83. Ito K, Awano W, Suzuki K, Hiromi Y, Yamamoto D. The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development*. 1997;124(4):761-771.
- Jack J, DeLotto Y. Structure and regulation of a complex locus: the *cut* gene of *Drosophila*. *Genetics*. 1995;139(4):1689-1700.
- Janody F, Martirosyan Z, Benlali A, Treisman JE. Two subunits of the *Drosophila* mediator complex act together to control cell affinity. *Development*. 2003;130(16):3691-3701.
- Janody F, Treisman JE. Requirements for mediator complex subunits distinguish three classes of notch target genes at the *Drosophila* wing margin. *Dev Dyn*. 2011;240(9):2051-2059.

- Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell*. 2008;15(6):801-812.
- Johnstone K, Wells RE, Strutt D, Zeidler MP. Localised JAK/STAT pathway activation is required for *Drosophila* wing hinge development. *PLoS One*. 2013;8(5):e65076.
- Kalderon D. Transducing the hedgehog signal. *Cell*. 2000;103(3):371-374.
- Kim J, Irvine KD, Carroll SB. Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing *Drosophila* wing. *Cell*. 1995;82(5):795-802.
- Kim J, Magee J, Carroll SB. Intercompartmental signaling and the regulation of vestigial expression at the dorsoventral boundary of the developing *Drosophila* wing. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1997;62:283-291.
- Kim J, Sebring A, Esch JJ, et al. Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature*. 1996;382(6587):133-138.
- Klämbt C. The *Drosophila* gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development*. 1993;117(1):163-176.
- Klein T, Arias AM. Different spatial and temporal interactions between Notch, wingless, and vestigial specify proximal and distal pattern elements of the wing in *Drosophila*. *Dev Biol*. 1998;194(2):196-212.
- Klein T, Arias AM. Interactions among Delta, Serrate and Fringe modulate Notch activity during *Drosophila* wing development. *Development*. 1998;125(15):2951-2962.
- Koelzer S, Klein T. Regulation of expression of Vg and establishment of the dorsoventral compartment boundary in the wing imaginal disc by Suppressor of Hairless. *Dev Biol*. 2006;289(1):77-90.
- Kolodkin AL, Pickup AT, Lin DM, Goodman CS, Banerjee U. Characterization of Star and its interactions with sevenless and EGF receptor during photoreceptor cell development in *Drosophila*. *Development*. 1994;120(7):1731-1745.
- Kornberg T. Engrailed: a gene controlling compartment and segment formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(2):1095-1099.
- Kornberg T, Sidén I, O'Farrell P, Simon M. The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell*. 1985;40(1):45-53.
- Lai ZC, Wei X, Shimizu T, et al. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell*. 2005;120(5):675-685.
- Lecuit T, Brook WJ, Ng M, Calleja M, Sun H, Cohen SM. Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature*. 1996;381(6581):387-393.
- Liu X, Grammont M, Irvine KD. Roles for scalloped and vestigial in regulating cell affinity and interactions between the wing blade and the wing hinge. *Dev Biol*. 2000;228(2):287-303.
- Lu J, Wang D, Pflugfelder GO, Shen J. The Dpp-Dorsocross pathway promotes *Drosophila* thorax closure by regulating DE-Cadherin expression
- Loncle N, Boube M, Joulia L, et al. Distinct roles for Mediator Cdk8 module subunits in *Drosophila* development. *EMBO J*. 2007;26(4):1045-1054.
- Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*. 2004;304(5678):1755-1759.
- Mandaravally Madhavan M, Schneiderman HA. Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*.

- Wilehm Roux Arch Dev Biol. 1977;183(4):269-305.
- Mao F, Yang X, Fu L, et al. The Kto-Skd complex can regulate ptc expression by interacting with Cubitus interruptus (Ci) in the Hedgehog signaling pathway. J Biol Chem. 2014;289(32):22333-22341.
- Martín FA, Herrera SC, Morata G. Cell competition, growth and size control in the Drosophila wing imaginal disc. Development. 2009;136(22):3747-3756.
- Matakatsu H, Blair SS. Interactions between Fat and Dachshous and the regulation of planar cell polarity in the Drosophila wing. Development. 2004;131(15):3785-3794.
- Matis M, Axelrod JD. Regulation of PCP by the Fat signaling pathway. Genes Dev. 2013;27(20):2207-2220.
- McDonald JA, Pinheiro EM, Kadlec L, Schubach T, Montell DJ. Multiple EGFR ligands participate in guiding migrating border cells. Dev Biol. 2006;296(1):94-103.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in Drosophila. Science. 2003;302(5651):1765-1768.
- Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. Genes Dev. 2016;30(1):1-17.
- Méthot N, Basler K. Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of Cubitus interruptus. Cell. 1999;96(6):819-831.
- Micchelli CA, Blair SS. Dorsoventral lineage restriction in wing imaginal discs requires Notch. Nature. 1999;401(6752):473-476.
- Micchelli CA, Rulifson EJ, Blair SS. The function and regulation of cut expression on the wing margin of Drosophila: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. Development. 1997;124(8):1485-1495.
- Milán M, Cohen SM. Notch signaling is not sufficient to define the affinity boundary between dorsal and ventral compartments. Mol Cell. 1999;4(6):1073-1078.
- Milán M, Cohen SM. Temporal regulation of apterous activity during development of the Drosophila wing. Development. 2000;127(14):3069-3078.
- Milán M, Cohen SM. A re-evaluation of the contributions of Apterous and Notch to the dorsoventral lineage restriction boundary in the Drosophila wing. Development. 2003;130(3):553-562.
- Milán M, Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM. Beadex encodes an LMO protein that regulates Apterous LIM-homeodomain activity in Drosophila wing development: a model for LMO oncogene function. Genes Dev. 1998;12(18):2912-2920.
- Milán M, Pérez L, Cohen SM. Short-range cell interactions and cell survival in the Drosophila wing. Dev Cell. 2002;2(6):797-805.
- Milán M, Pérez L, Cohen SM. Boundary formation in the Drosophila wing: functional dissection of Capricious and Tartan. Dev Dyn. 2005;233(3):804-810.
- Milán M, Pham TT, Cohen SM. Osa modulates the expression of Apterous target genes in the Drosophila wing. Mech Dev. 2004;121(5):491-497.
- Milán M, Weihe U, Pérez L, Cohen SM. The LRR proteins capricious and Tartan mediate cell interactions during DV boundary formation in the Drosophila wing. Cell. 2001;106(6):785-794.
- Molnar C, Ruiz-Gómez A, Martín M, Rojo-Berciano S, Mayor F, de Celis JF. Role of the Drosophila

- non-visual  $\beta$ -arrestin kurtz in hedgehog signalling. *PLoS Genet.* 2011;7(3):e1001335.
- Molnar C, Resnik-Docampo M, Organista MF, Martín M, Hevia CF, de Celis JF (October 3rd 2011). Signalling Pathways in Development and Human Disease: A Drosophila Wing Perspective, Human Genetic Diseases Dijana Plaseska-Karanfilska, IntechOpen, DOI: 10.5772/23858.
- Morata G, Lawrence PA. Control of compartment development by the engrailed gene in Drosophila. *Nature.* 1975;255(5510):614-617.
- Morata G, Lawrence PA. The development of wingless, a homeotic mutation of Drosophila. *Dev Biol.* 1977;56(2):227-240.
- Morata G, Shlevkov E, Pérez-Garijo A. Mitogenic signaling from apoptotic cells in Drosophila. *Dev Growth Differ.* 2011;53(2):168-176.
- Mukherjee T, Hombría JC, Zeidler MP. Opposing roles for Drosophila JAK/STAT signalling during cellular proliferation. *Oncogene.* 2005;24(15):2503-2511.
- Mumm JS, Kopan R. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol.* 2000;228(2):151-165.
- Musacchio M, Perrimon N. The Drosophila kekkon genes: novel members of both the leucine-rich repeat and immunoglobulin superfamilies expressed in the CNS. *Dev Biol.* 1996;178(1):63-76.
- Nellen D, Burke R, Struhl G, Basler K. Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell.* 1996;85(3):357-368.
- Neuman-Silberberg FS, Schüpbach T. The Drosophila dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell.* 1993;75(1):165-174.
- Neumann CJ, Cohen SM. A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the Drosophila wing. *Development.* 1996;122(11):3477-3485.
- Neumann CJ, Cohen SM. Distinct mitogenic and cell fate specification functions of wingless in different regions of the wing. *Development.* 1996;122(6):1781-1789.
- Neumann CJ, Cohen SM. Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the Drosophila wing. *Development.* 1997;124(4):871-880.
- Ng M, Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM. Nubbin encodes a POU-domain protein required for proximal-distal patterning in the Drosophila wing. *Development.* 1995;121(2):589-599.
- Nolo R, Abbott LA, Bellen HJ. Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in Drosophila. *Cell.* 2000;102(3):349-362.
- Nolo R, Morrison CM, Tao C, Zhang X, Halder G. The bantam microRNA is a target of the hippo tumor-suppressor pathway. *Curr Biol.* 2006;16(19):1895-1904.
- O'Brochta DA, Bryant PJ. A zone of non-proliferating cells at a lineage restriction boundary in Drosophila. *Nature.* 1985;313(5998):138-141.
- Oh H, Irvine KD. In vivo analysis of Yorkie phosphorylation sites. *Oncogene.* 2009;28(17):1916-1927.
- Oh H, Irvine KD. Cooperative regulation of growth by Yorkie and Mad through bantam. *Dev Cell.* 2011;20(1):109-122.
- Oktaba K, Gutiérrez L, Gagneur J, et al. Dynamic regulation by polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in Drosophila. *Dev Cell.* 2008;15(6):877-889.
- Padgett RW, St Johnston RD, Gelbart WM. A transcript from a Drosophila pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature.* 1987;325(6099):81-84.
- Pai CY, Kuo TS, Jaw TJ, et al. The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of

- another homeoprotein, extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1998;12(3):435-446.
- Pallavi SK, Shashidhara LS. Egfr/Ras pathway mediates interactions between peripodial and disc proper cells in *Drosophila* wing discs. *Development.* 2003;130(20):4931-4941.
- Panin VM, Papayannopoulos V, Wilson R, Irvine KD. Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature.* 1997;387(6636):908-912.
- Paul L, Wang SH, Manivannan SN, et al. Dpp-induced Egfr signaling triggers postembryonic wing development in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(13):5058-5063.
- Perea D, Molohon K, Edwards K, Díaz-Benjumea FJ. Multiple roles of the gene zinc finger homeodomain-2 in the development of the *Drosophila* wing. *Mech Dev.* 2013;130(9-10):467-481.
- Perea D, Terriente J, Díaz-Benjumea FJ. Temporal and spatial windows delimit activation of the outer ring of wingless in the *Drosophila* wing. *Dev Biol.* 2009;328(2):445-455.
- Pérez-Garijo A, Shlevkov E, Morata G. The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc. *Development.* 2009;136(7):1169-1177.
- Pflugfelder GO. omb and circumstance. *J Neurogenet.* 2009;23(1-2):15-33.
- Pflugfelder GO, Eichinger F, Shen J. T-Box Genes in *Drosophila* Limb Development. *Curr Top Dev Biol.* 2017;122:313-354.
- Pflugfelder GO, Roth H, Poeck B, et al. The lethal(1)optomotor-blind gene of *Drosophila melanogaster* is a major organizer of optic lobe development: isolation and characterization of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(4):1199-1203.
- Phillips RG, Whittle JR. wingless expression mediates determination of peripheral nervous system elements in late stages of *Drosophila* wing disc development. *Development.* 1993;118(2):427-438.
- Radio FC, Bernardini L, Loddo S, et al. TBX2 gene duplication associated with complex heart defect and skeletal malformations. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(8):2061-2066.
- Rauskolb C, Correia T, Irvine KD. Fringe-dependent separation of dorsal and ventral cells in the *Drosophila* wing. *Nature.* 1999;401(6752):476-480.
- Redmond KL, Crawford NT, Farmer H, et al. T-box 2 represses NDRG1 through an EGR1-dependent mechanism to drive the proliferation of breast cancer cells. *Oncogene.* 2010;29(22):3252-3262.
- Richardson HE, Portela M. Tissue growth and tumorigenesis in *Drosophila*: cell polarity and the Hippo pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;48:1-9.
- Rieckhof GE, Casares F, Ryoo HD, Abu-Shaar M, Mann RS. Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell.* 1997;91(2):171-183.
- Rodrigues AB, Zoranovic T, Ayala-Camargo A, et al. Activated STAT regulates growth and induces competitive interactions independently of Myc, Yorkie, Wingless and ribosome biogenesis. *Development.* 2012;139(21):4051-4061.
- Rodríguez Dd DeA, Terriente J, Galindo MI, Couso JP, Díaz-Benjumea FJ. Different mechanisms initiate and maintain wingless expression in the *Drosophila* wing hinge. *Development.* 2002;129(17):3995-4004.
- Rodríguez I. The dachsous gene, a member of the cadherin family, is required for Wg-dependent

- pattern formation in the *Drosophila* wing disc. *Development*. 2004;131(13):3195-3206.
- Rodriguez I, Basler K. Control of compartmental affinity boundaries by hedgehog. *Nature*. 1997;389(6651):614-618.
- Rogulja D, Rauskolb C, Irvine KD. Morphogen control of wing growth through the Fat signaling pathway. *Dev Cell*. 2008;15(2):309-321.
- Rulifson EJ, Blair SS. Notch regulates wingless expression and is not required for reception of the paracrine wingless signal during wing margin neurogenesis in *Drosophila*. *Development*. 1995;121(9):2813-2824.
- Russell S. The *Drosophila* dominant wing mutation *Dichaete* results from ectopic expression of a Sox-domain gene. *Mol Gen Genet*. 2000;263(4):690-701.
- Rutledge BJ, Zhang K, Bier E, Jan YN, Perrimon N. The *Drosophila* *spitz* gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes Dev*. 1992;6(8):1503-1517.
- Ryoo HD, Gorenc T, Steller H. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell*. 2004;7(4):491-501.
- Saj A, Arziman Z, Stempfle D, et al. A combined ex vivo and in vivo RNAi screen for notch regulators in *Drosophila* reveals an extensive notch interaction network. *Dev Cell*. 2010;18(5):862-876.
- Scholz H, Deatrick J, Klaes A, Klämbt C. Genetic dissection of *pointed*, a *Drosophila* gene encoding two ETS-related proteins. *Genetics*. 1993;135(2):455-468.
- Schweitzer R, Shaharabany M, Seger R, Shilo BZ. Secreted Spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination. *Genes Dev*. 1995;9(12):1518-1529.
- Seto ES, Bellen HJ. The ins and outs of Wingless signaling. *Trends Cell Biol*. 2004;14(1):45-53.
- Shen J, Dahmann C. The role of Dpp signaling in maintaining the *Drosophila* anteroposterior compartment boundary. *Dev Biol*. 2005;279(1):31-43.
- Shen J, Dahmann C, Pflugfelder GO. Spatial discontinuity of *optomotor-blind* expression in the *Drosophila* wing imaginal disc disrupts epithelial architecture and promotes cell sorting. *BMC Dev Biol*. 2010;10:23.
- Shen J, Dorner C, Bahlo A, Pflugfelder GO. *optomotor-blind* suppresses instability at the A/P compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Mech Dev*. 2008;125(3-4):233-246.
- Shilo BZ. Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res*. 2003;284(1):140-149.
- Shilo BZ. Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time. *Development*. 2005;132(18):4017-4027.
- Simcox A. Differential requirement for EGF-like ligands in *Drosophila* wing development. *Mech Dev*. 1997;62(1):41-50.
- Simcox AA, Grumblin G, Schnepf B, Bennington-Mathias C, Hersperger E, Shearn A. Molecular, phenotypic, and expression analysis of *vein*, a gene required for growth of the *Drosophila* wing disc. *Dev Biol*. 1996;177(2):475-489.
- Simon E, Guerrero I. The transcription factor *optomotor-blind* antagonizes *Drosophila* haltere growth by repressing decapentaplegic and hedgehog targets. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121239.

- Simon MA, Xu A, Ishikawa HO, Irvine KD. Modulation of fat:dachsous binding by the cadherin domain kinase four-jointed. *Curr Biol.* 2010;20(9):811-817.
- Simons M, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet.* 2008;42:517-540.
- Sivasankaran R, Vigano MA, Müller B, Affolter M, Basler K. Direct transcriptional control of the Dpp target omb by the DNA binding protein Brinker. *EMBO J.* 2000;19(22):6162-6172.
- Soanes KH, MacKay JO, Core N, Heslip T, Kerridge S, Bell JB. Identification of a regulatory allele of teashirt (tsh) in *Drosophila melanogaster* that affects wing hinge development. An adult-specific tsh enhancer in *Drosophila*. *Mech Dev.* 2001;105(1-2):145-151.
- Speicher SA, Thomas U, Hinz U, Knust E. The Serrate locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development.* 1994;120(3):535-544.
- St Pierre SE, Galindo MI, Couso JP, Thor S. Control of *Drosophila* imaginal disc development by rotund and roughened eye: differentially expressed transcripts of the same gene encoding functionally distinct zinc finger proteins. *Development.* 2002;129(5):1273-1281.
- Städeli R, Hoffmans R, Basler K. Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr Biol.* 2006;16(10):R378-385.
- Staley BK, Irvine KD. Hippo signaling in *Drosophila*: recent advances and insights. *Dev Dyn.* 2012;241(1):3-15.
- Strutt H, Mundy J, Hofstra K, Strutt D. Cleavage and secretion is not required for Four-jointed function in *Drosophila* patterning. *Development.* 2004;131(4):881-890.
- Sturtevant MA, Bier E. Analysis of the genetic hierarchy guiding wing vein development in *Drosophila*. *Development.* 1995;121(3):785-801.
- Sturtevant MA, Roark M, Bier E. The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes Dev.* 1993;7(6):961-973.
- Sun YH, Tsai CJ, Green MM, et al. White as a reporter gene to detect transcriptional silencers specifying position-specific gene expression during *Drosophila melanogaster* eye development. *Genetics.* 1995;141(3):1075-1086.
- Tabata T, Eaton S, Kornberg TB. The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev.* 1992;6(12B):2635-2645.
- Tabata T, Kornberg TB. Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell.* 1994;76(1):89-102.
- Tabata T, Schwartz C, Gustavson E, Ali Z, Kornberg TB. Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development.* 1995;121(10):3359-3369.
- Tagliabracchi VS, Pinna LA, Dixon JE. Secreted protein kinases. *Trends Biochem Sci.* 2013;38(3):121-130.
- Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature.* 2002;418(6900):892-897.
- Terriente Félix J, Magariños M, Díaz-Benjumea FJ. Nab controls the activity of the zinc-finger transcription factors Squeeze and Rotund in *Drosophila* development. *Development.*

- 2007;134(10):1845-1852.
- Terriente J, Perea D, Suzanne M, Díaz-Benjumea FJ. The *Drosophila* gene *zfh2* is required to establish proximal-distal domains in the wing disc. *Dev Biol.* 2008;320(1):102-112.
- Thompson BJ, Cohen SM. The Hippo pathway regulates the bantam microRNA to control cell proliferation and apoptosis in *Drosophila*. *Cell.* 2006;126(4):767-774.
- Treisman J. *Drosophila* homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development.* 2001;128(4):603-615.
- Tsai YC, Grimm S, Chao JL, et al. Optomotor-blind negatively regulates *Drosophila* eye development by blocking Jak/STAT signaling. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120236.
- Umemori M, Takemura M, Maeda K, Ohba K, Adachi-Yamada T. *Drosophila* T-box transcription factor Optomotor-blind prevents pathological folding and local overgrowth in wing epithelium through confining Hh signal. *Dev Biol.* 2007;308(1):68-81.
- Villa-Cuesta E, Modolell J. Mutual repression between *msh* and *Iro-C* is an essential component of the boundary between body wall and wing in *Drosophila*. *Development.* 2005;132(18):4087-4096.
- Wang D, Li L, Lu J, Liu S, Shen J. Complementary expression of *optomotor-blind* and the Iroquois complex promotes fold formation to separate wing notum and hinge territories. *Dev Biol.* 2016;416(1):225-234.
- Wang L, Sexton TR, Venard C, et al. Pleiotropy of the *Drosophila* JAK pathway cytokine Unpaired 3 in development and aging. *Dev Biol.* 2014;395(2):218-231.
- Wang SH, Simcox A, Campbell G. Dual role for *Drosophila* epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev.* 2000;14(18):2271-2276.
- Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, et al. *arrow* encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature.* 2000;407(6803):527-530.
- Weihe U, Dorfman R, Wernet MF, Cohen SM, Milán M. Proximodistal subdivision of *Drosophila* legs and wings: the elbow-no ocelli gene complex. *Development.* 2004;131(4):767-774.
- Whitworth AJ, Russell S. Temporally dynamic response to Wingless directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the *Drosophila* wing. *Dev Biol.* 2003;254(2):277-288.
- Willecke M, Hamaratoglu F, Sansores-Garcia L, Tao C, Halder G. Boundaries of *Dachsous* Cadherin activity modulate the Hippo signaling pathway to induce cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(39):14897-14902.
- Williams JA, Bell JB, Carroll SB. Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes Dev.* 1991;5(12B):2481-2495.
- Williams JA, Paddock SW, Carroll SB. Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development.* 1993;117(2):571-584.
- Williams JA, Paddock SW, Vorwerk K, Carroll SB. Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature.* 1994;368(6469):299-305.
- Worley MI, Alexander LA, Hariharan IK. CtBP impedes JNK- and Upd/STAT-driven cell fate misspecifications in regenerating. *Elife.* 2018;7.

- Wu J, Cohen SM. Repression of Teashirt marks the initiation of wing development. *Development*. 2002;129(10):2411-2418.
- Wu S, Huang J, Dong J, Pan D. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell*. 2003;114(4):445-456.
- Xu T, Rubin GM. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development*. 1993;117(4):1223-1237.
- Zecca M, Basler K, Struhl G. Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development*. 1995;121(8):2265-2278.
- Zeidler MP, Perrimon N, Strutt DI. Polarity determination in the *Drosophila* eye: a novel role for unpaired and JAK/STAT signaling. *Genes Dev*. 1999;13(10):1342-1353.
- Zeidler MP, Bausek N. The *Drosophila* JAK-STAT pathway. *JAKSTAT*. 2013;2(3):e25353.
- Zhang X, Luo D, Pflugfelder GO, Shen J. Dpp signaling inhibits proliferation in the *Drosophila* wing by Omb-dependent regional control of bantam. *Development*. 2013;140(14):2917-2922.
- Zirin JD, Mann RS. Differing strategies for the establishment and maintenance of teashirt and homothorax repression in the *Drosophila* wing. *Development*. 2004;131(22):5683-5693.
- Zirin JD, Mann RS. Nubbin and Teashirt mark barriers to clonal growth along the proximal-distal axis of the *Drosophila* wing. *Dev Biol*. 2007;304(2):745-758.
- Ziv O, Suissa Y, Neuman H, et al. The co-regulator dNAB interacts with Brinker to eliminate cells with reduced Dpp signaling. *Development*. 2009;136(7):1137-1145.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	anterior
Abb.	Abbildung
AD	anterior dorsal
AV	anterior ventral
A/P	anterior/posterior
A-P	anterior-posterior
Bal.	Balancerchromosom
BSA	Rinderserumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
CRM	cis-regulatorisches Modul
D	dorsal
D/V	dorso/ventral
D-V	dorso-ventrale
engl.	englisch
<i>et al.</i>	lat.: et alii (und andere)
Fa.	Firma
GFP	engl.: green fluorescent protein
g-o-f	engl.: gain-of-function
L1/L2/L3	erstes/zweites/drittes larvales Stadium
l-o-f	engl.: loss-of-function
Lsg.	Lösung
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Min	Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
P	posterior
P-D	proximo-distale
PD	posterior dorsal
PV	posterior ventral
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
Tbx	T-Box
TF	Transkriptionsfaktor
TritonX-100	Octylphenolpolyethylenglycolether
usw	und so weiter
V	ventral
vgl.	vergleichen
z.B.	zum Beispiel

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Kompartimente in der Flügelimaginalscheibe .....	6
Abbildung 2	Omb-Expression in der Flügelimaginalscheibe .....	7
Abbildung 3	Einfluss von <i>omb</i> Verlust auf die Flügelentwicklung .....	9
Abbildung 4	Expressionsmuster von <i>ap-lacZ</i> in <i>wt</i> und <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	16
Abbildung 5	Ap- und Wg-Expression in <i>wt</i> Flügelscheibe .....	17
Abbildung 6	Ap- und Wg-Expression in <i>bi</i> und <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	18
Abbildung 7	Ap- und Wg-Expression in <i>wt</i> , <i>bi</i> , <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> und <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	18
Abbildung 8	Ap- und Wg-Expression in <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	20
Abbildung 9	Ap- und Wg-Expression in <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	22
Abbildung 10	Expressionsmuster von <i>ap-lacZ</i> und Wg in <i>wt</i> Flügelscheibe .....	25
Abbildung 11	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>ap-lacZ</i> -Expression .....	26
Abbildung 12	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>wg-lacZ</i> - und Wg-Expression .....	27
Abbildung 13	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>ap-lacZ</i> - und Wg-Expression .....	28
Abbildung 14	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>wg-lacZ</i> - und Wg-Expression .....	29
Abbildung 15	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>ap-lacZ</i> - und Wg-Expression. ....	30
Abbildung 16	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>arr-lacZ</i> - und Wg-Expression .....	30
Abbildung 17	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>ap-lacZ</i> -Expression .....	31
Abbildung 18	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>ap-lacZ</i> - und Wg-Expression .....	32
Abbildung 19	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>ap-lacZ</i> - und Wg-Expression .....	33
Abbildung 20	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>wg-lacZ</i> - und Wg-Expression .....	34
Abbildung 21	Effekte der klonalen <i>omb</i> Überexpression auf die <i>ap-lacZ</i> - und Wg-Expression .....	35
Abbildung 22	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die Notch-Aktivität.....	38
Abbildung 23	Model zum Migrationsverhalten <i>omb</i> l-o-f Klone an der D/V-Grenze.....	40
Abbildung 24	Wg- und Vg-Expression in einer wildtypischen Flügelimaginalscheibe .....	46
Abbildung 25	Effekte des klonalen <i>kto</i> Verlusts auf die Wg-Expression.....	47
Abbildung 26	Effekte des klonalen <i>kto</i> Verlusts auf die Wg- und Vg-Expression .....	48
Abbildung 27	Effekte des klonalen <i>kto</i> Verlusts auf die Wg- und Omb-Expression.....	49
Abbildung 28	Effekte des klonalen <i>kto</i> Verlusts auf die Ap-Expression .....	50
Abbildung 30	Expressionsmuster von <i>caps-lacZ</i> in <i>wt</i> und <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	56
Abbildung 31	Effekte der klonalen <i>omb</i> Überexpression auf die <i>caps-lacZ</i> -Expression .....	57
Abbildung 33	Expressionsmuster von <i>kek1-lacZ</i> in <i>wt</i> und <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	61
Abbildung 34	Expressionsmuster hinge-relevanter Gene .....	66
Abbildung 35	<i>dpp-lacZ</i> -Expression in <i>wt</i> , <i>bi</i> , <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> und <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	68
Abbildung 36	<i>dpp-lacZ</i> -Expression in XZ-Bilder von <i>wt</i> , <i>bi</i> , <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> und <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	69
Abbildung 37	<i>dpp-lacZ</i> -Expression in <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	69
Abbildung 38	Wg-Expression in <i>wt</i> , <i>bi</i> , <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> und <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	72
Abbildung 39	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>wg-lacZ</i> - und Wg-Expression .....	73
Abbildung 40	Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>wg-lacZ</i> - und Wg-Expression .....	74
Abbildung 41	Effekte der Expression von <i>omb</i> RNAi auf die Wg-Expression.....	75

Abbildung 42 Effekte der Überexpression von Omb auf die Wg-Expression .....	76
Abbildung 43 Effekte der klonalen <i>omb</i> Überexpression auf die Wg-Expression .....	77
Abbildung 44 Vg- und Wg-Expression in <i>wt</i> und <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	79
Abbildung 46 Zfh2- und Wg-Expression in <i>wt</i> und <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheibe .....	84
Abbildung 47 Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die Zfh2-Expression .....	85
Abbildung 48 Nab-Expression in <i>wt</i> , <i>bi</i> , <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> und <i>(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	88
Abbildung 49 Expressionsmuster von <i>hth-lacZ</i> in <i>wt</i> und <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	90
Abbildung 50 <i>hth-lacZ</i> -Expression in <i>wt</i> , <i>bi</i> , <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> und <i>(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	91
Abbildung 51 Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>hth-lacZ</i> -Expression .....	93
Abbildung 52 Expressionsmuster von <i>tsh-lacZ</i> in <i>wt</i> und <i>I(1)omb</i> <sup>ΔP6</sup> Flügelscheiben .....	95
Abbildung 53 10xSTAT-GFP-Expression in <i>wt</i> Flügelscheibe .....	96
Abbildung 54 10xSTAT-GFP-Expression in <i>wt</i> , <i>bi</i> , <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> und <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	97
Abbildung 55 10xSTAT-GFP-Expression in <i>wt</i> , <i>bi</i> , <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> und <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	99
Abbildung 56 10xSTAT-GFP-Expression in <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	101
Abbildung 57 10xSTAT-GFP-Expression in XZ-Bilder .....	102
Abbildung 58 10xSTAT-GFP-Expression in XZ-Bilder von <i>wt</i> und <i>bi</i> Flügelscheiben .....	104
Abbildung 59 10xSTAT-GFP-Expression in XZ-Bilder von <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	105
Abbildung 60 Expressionsmuster von <i>STAT92E-lacZ</i> in <i>wt</i> und <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	106
Abbildung 61 EdU Färbung und Wg-Expression in <i>wt</i> , <i>bi</i> , <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> und <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	112
Abbildung 62 EdU Färbung und Wg-Expression <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	113
Abbildung 63 Apoptose in <i>wt</i> , <i>bi</i> , <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> und <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> L3 Flügelscheiben .....	115
Abbildung 65 Expressionsmuster von <i>fj-lacZ</i> in <i>wt</i> und <i>I(1)omb</i> <sup>ΔP6</sup> Flügelscheiben .....	120
Abbildung 66 Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>fj-lacZ</i> -Expression .....	121
Abbildung 67 Effekte der Überexpression von Omb auf die <i>fj-lacZ</i> -Expression .....	122
Abbildung 68 Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>fj-lacZ</i> -Expression .....	124
Abbildung 69 Expressionsmuster von <i>ds-lacZ</i> in <i>wt</i> Flügelscheiben .....	125
Abbildung 70 Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>ds-lacZ</i> -Expression .....	126
Abbildung 71 Effekte der klonalen <i>omb</i> Überexpression auf die <i>ds-lacZ</i> -Expression .....	127
Abbildung 72 Effekte der klonalen <i>omb</i> Überexpression auf die <i>ds-lacZ</i> -Expression .....	128
Abbildung 73 Ap- und Wg-Expression in <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	162
Abbildung 74 Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die Wg-Expression .....	163
Abbildung 75 Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die <i>wg-lacZ</i> - und Wg-Expression .....	163
Abbildung 76 Expressionsmuster von <i>arr-lacZ</i> in <i>wt</i> und <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	164
Abbildung 77 Effekte der klonalen <i>omb</i> Überexpression auf die <i>ap-lacZ</i> -Expression .....	165
Abbildung 78 Effekte des klonalen <i>omb</i> Verlusts auf die Notch-Aktivität .....	166
Abbildung 79 Literaturergebnisse .....	167
Abbildung 80 <i>dpp-lacZ</i> - und Wg-Expression in <i>wt</i> Flügelscheiben .....	167
Abbildung 81 <i>dpp-lacZ</i> - und Wg-Expression in <i>bi</i> Flügelscheiben .....	168
Abbildung 82 <i>dpp-lacZ</i> - und Wg-Expression in <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	168
Abbildung 83 <i>dpp-lacZ</i> - und Wg-Expression in <i>I(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	169

Abbildung 84 Omb-Expression in <i>wt</i> und <i>wgspd</i> <sup>fg</sup> L3 Flügelscheibe.....	169
Abbildung 85 Zfh2- und Wg-Expression in <i>wt</i> Flügelscheiben.....	170
Abbildung 86 Zfh2- und Wg-Expression in <i>wt</i> Flügelscheiben.....	171
Abbildung 87 Zfh2- und Wg-Expression in <i>bi</i> Flügelscheiben.....	172
Abbildung 88 Zfh2- und Wg-Expression in <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	173
Abbildung 89 Zfh2- und Wg-Expression in <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	174
Abbildung 90 Zfh2-Expression in <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben.....	175
Abbildung 91 Zfh2-Expression in <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben.....	176
Abbildung 92 Zfh2-Expression in <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben.....	177
Abbildung 93 <i>hth-lacZ</i> - und Nab-Expression in <i>wt</i> Flügelscheiben.....	178
Abbildung 94 <i>hth-lacZ</i> - und Nab-Expression in <i>bi</i> und <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben.....	179
Abbildung 95 <i>hth-lacZ</i> - und Nab-Expression in <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	180
Abbildung 96 Nab- und Wg-Expression in <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben.....	181
Abbildung 97 10xSTAT-GFP-Expression in <i>wt</i> Flügelscheiben .....	182
Abbildung 98 10xSTAT-GFP-Expression in <i>bi</i> Flügelscheiben.....	183
Abbildung 99 10xSTAT-GFP-Expression in <i>bi/omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben.....	184
Abbildung 100 10xSTAT-GFP-Expression in <i>l(1)omb</i> <sup>3198</sup> Flügelscheiben .....	185

## 8.3 Ergänzende Abbildungen

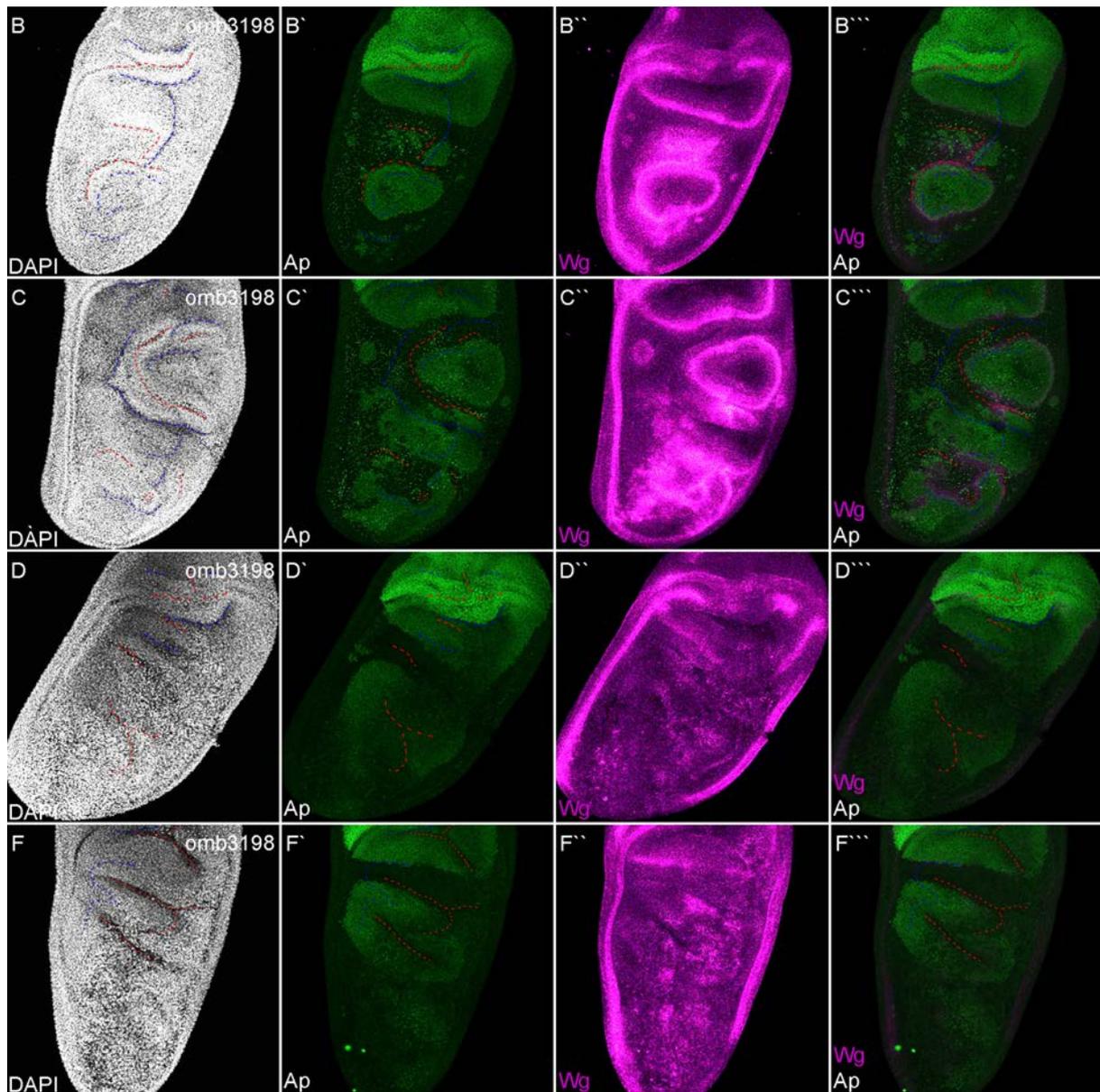


Abbildung 73 Ap- und Wg-Expression in *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *I(1)omb<sup>3198</sup>* mutante (B-F) L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; B-F), anti-Ap (Grün; B'-F'), anti-Wg (Magenta; B''-F''), Überlagerung des anti-Ap (Grün) und anti-Wg (Magenta) Signals (B'''-F'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. Apikale Falten (Rot) und basale Falten (Blau) wurden markiert (Auswahl). (B''-F'') Aufgrund der sehr schwachen bzw. fehlenden Immunfluoreszenz von Wg innerhalb der pouch (wie in Abb. 9 gezeigt), wurde eine nachträgliche Bildbearbeitung (Tonwertkorrektur) durchgeführt (siehe 5.2.18). Hierbei wurde bestätigt, dass – im medialen Bereich der Flügelscheibe in (D und F) – weder an der D/V-Grenze noch in der ventralen hinge Wg exprimiert wurde. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

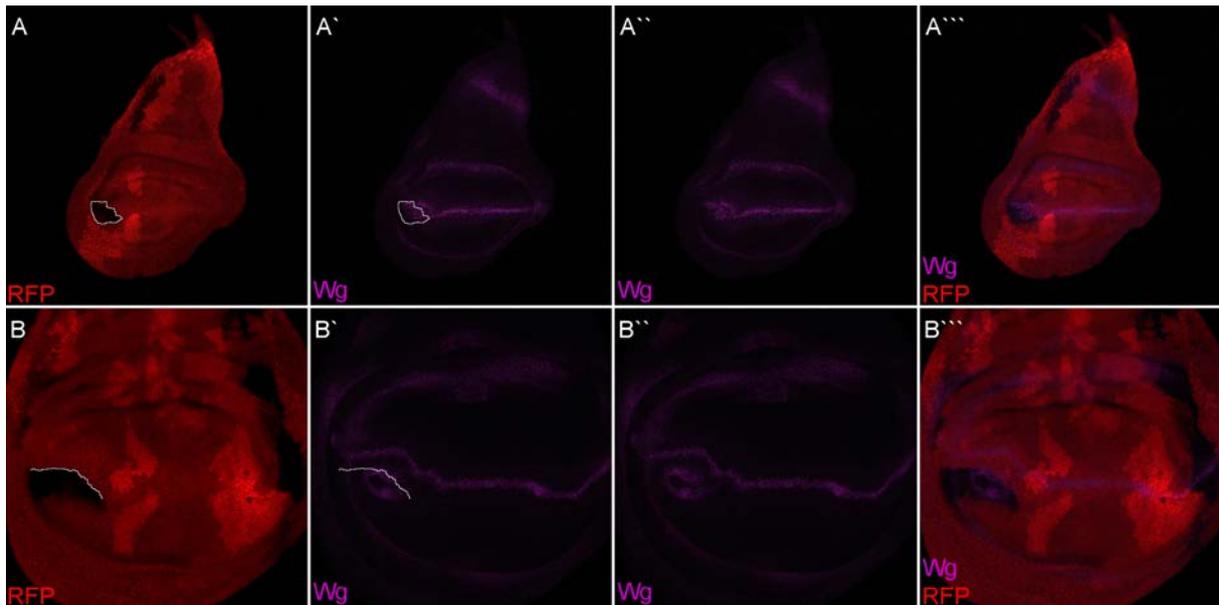


Abbildung 74 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die Wg-Expression  
 mRFP (Rot; A,B), *wg-lacZ* (Grün; A'), anti-Wg (Magenta; A'',B''), Überlagerung des anti-Wg (Magenta) und mRFP (Rot) Signals (A''',B'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

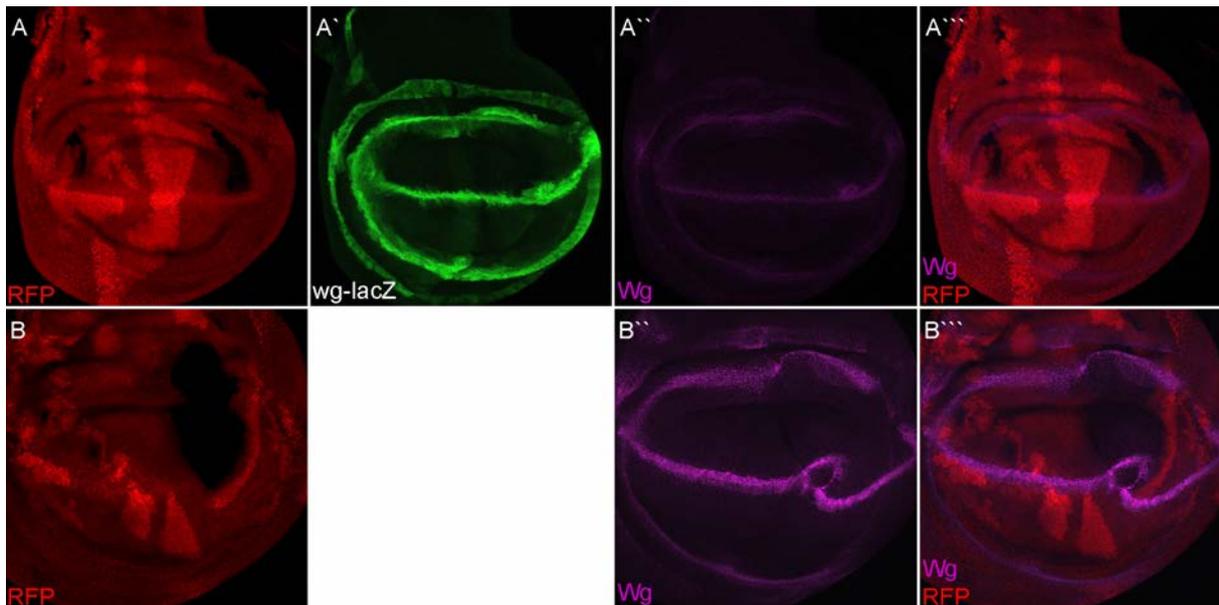


Abbildung 75 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die *wg-lacZ*- und Wg-Expression  
 mRFP (Rot; A,B), *wg-lacZ* (Grün; A'), anti-Wg (Magenta; A'',B''), Überlagerung des anti-Wg (Magenta) und mRFP (Rot) Signals (A''',B'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

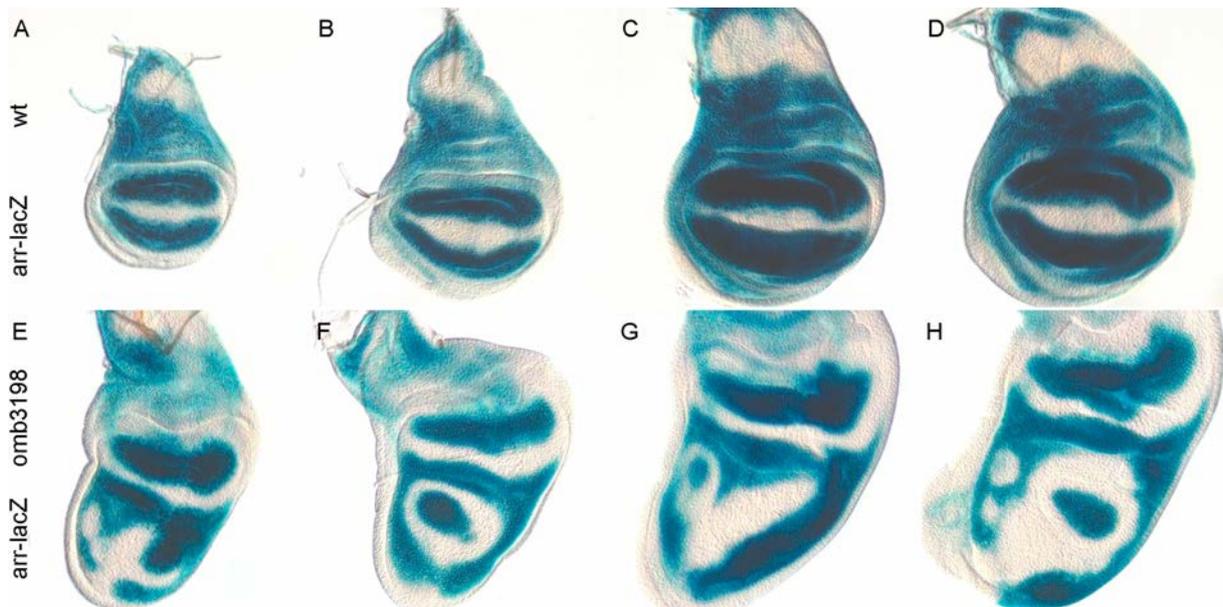


Abbildung 76 Expressionsmuster von *arr-lacZ* in *wt* und *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Die *arr-lacZ*-Expression in Flügelscheiben von wildtypischen (Kontrolle; A-D) und *I(1)omb<sup>3198</sup>* (E-H) Larven des dritten Larvenstadiums wurde mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. In *I(1)omb<sup>3198</sup>* mutanten Flügelscheiben wurde vorwiegend im V-Kompartiment eine Änderung der *arr-lacZ*-Expression festgestellt.

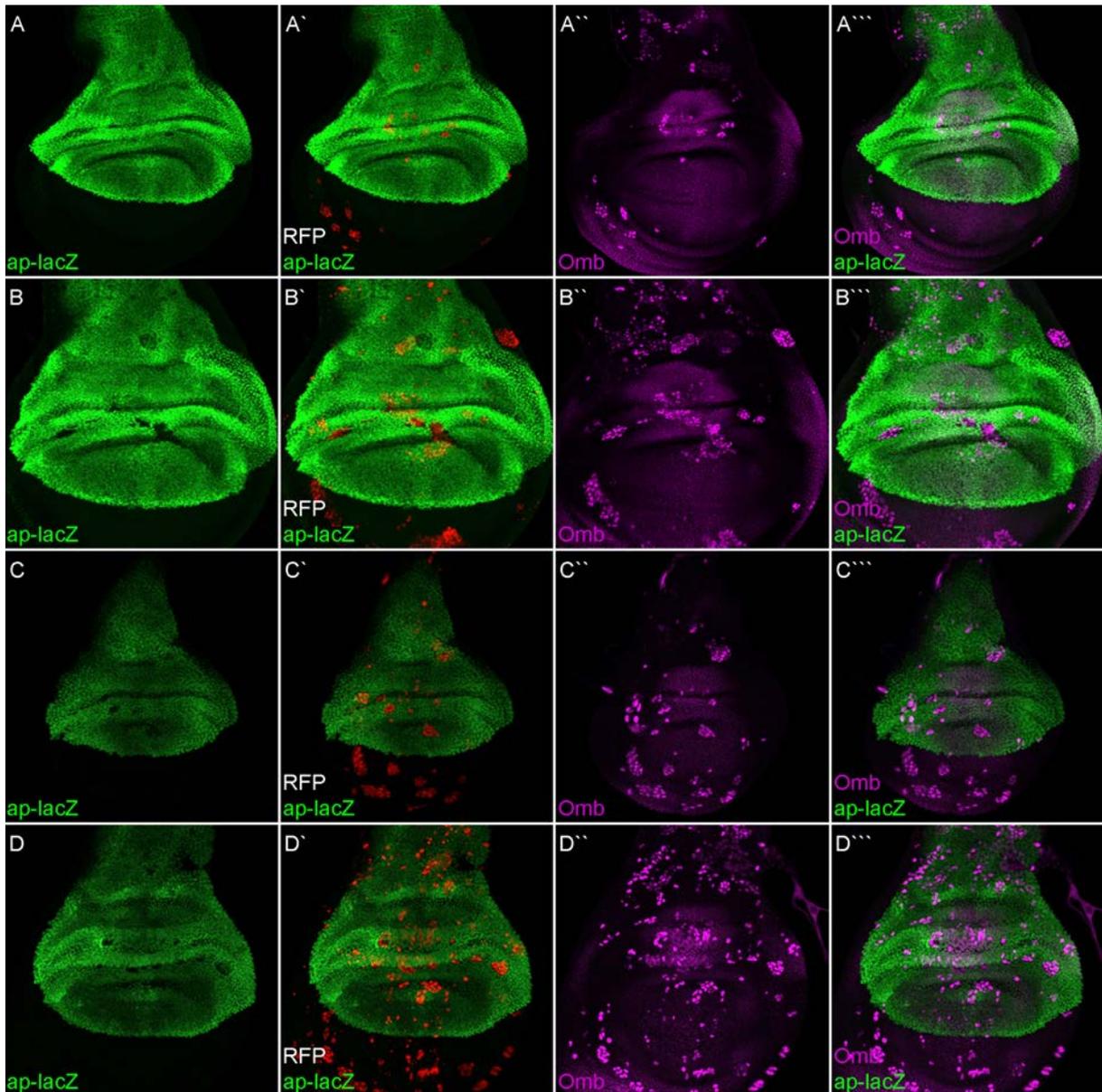


Abbildung 77 Effekte der klonalen *omb* Überexpression auf die *ap-lacZ*-Expression  
*ap-lacZ* (Grün; A-D), anti-Omb (Magenta; A''-D''), Überlagerung des *ap-lacZ* (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A'-D'), Überlagerung des anti-Omb (Magenta) und mRFP (Rot) Signals (A'''-D'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Dargestellt sind L3 Flüglimaginalscheiben. Für Abbildungsbeschreibung siehe auch Abb. 21. Der Nachweis der Expression von UAS-*omb* in Zellklonen erfolgte durch Immunfluoreszenz gegen Omb und durch Coexpression von UAS-mRFP. (A-D) Einige dorsale Klone (nicht alle) zeigen eine teilweise oder vollständige Reduktion bzw. einen Verlust der *ap-lacZ*-Expression. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

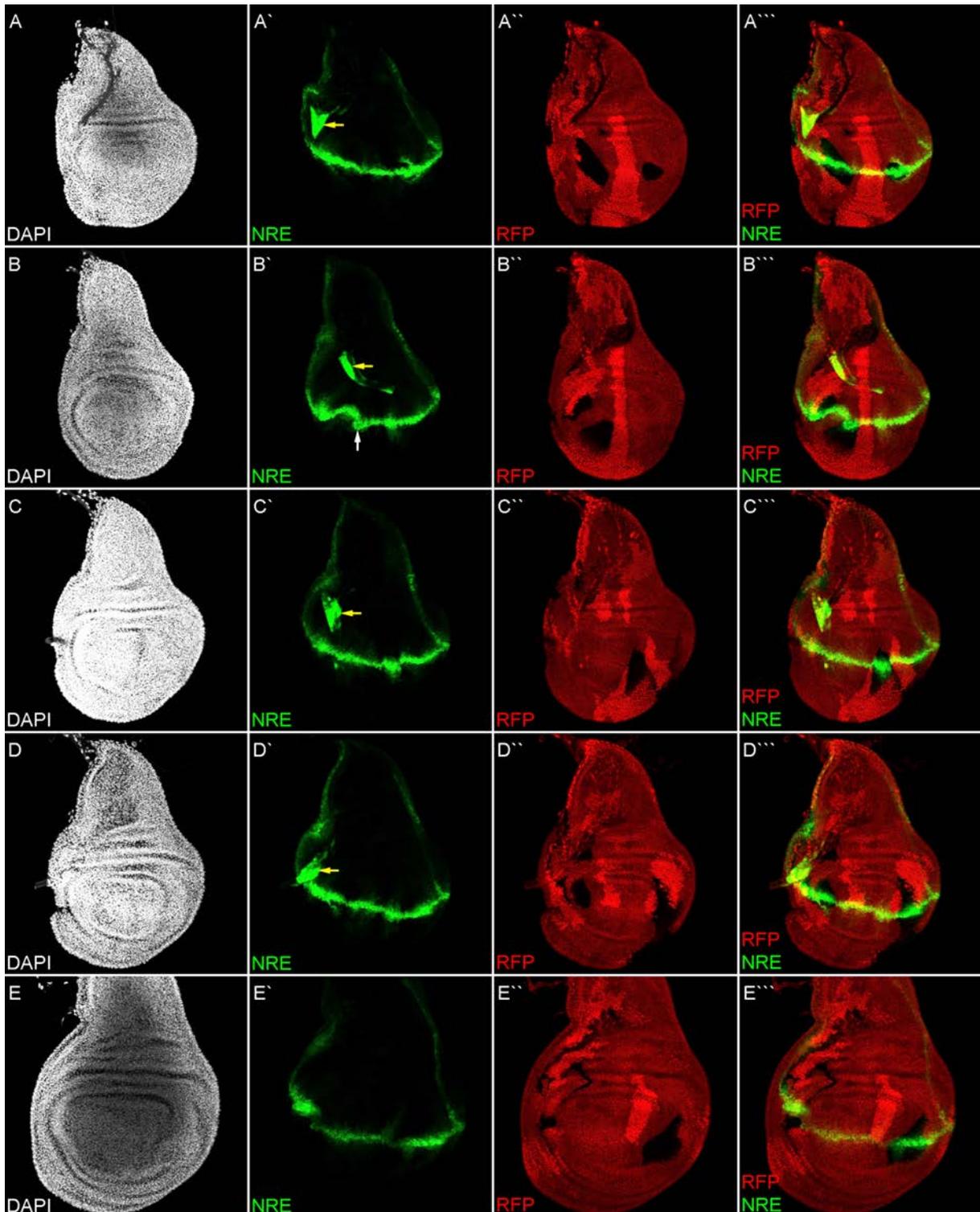


Abbildung 78 Effekte des klonalen *omb* Verlusts auf die Notch-Aktivität

DAPI (Weiß, A-E), NRE-GFP (Grün; A'-E'), mRFP (Rot; A''-E''), Überlagerung des NRE-GFP (Grün) und mRFP (Rot) Signals (A'''-E'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Maximalprojektion von Z-Bildstapeln; apikale Einzelbilder wurden entfernt. In der Trachee wurde eine starke NRE-GFP Reporteraktivität detektiert (gelbe Pfeile). Der weiße Pfeil markiert die Verlagerung der NRE-GFP-Expression, in den ventralen Klon. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

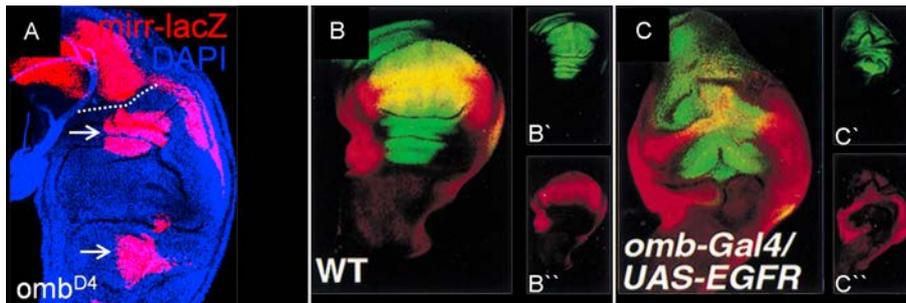
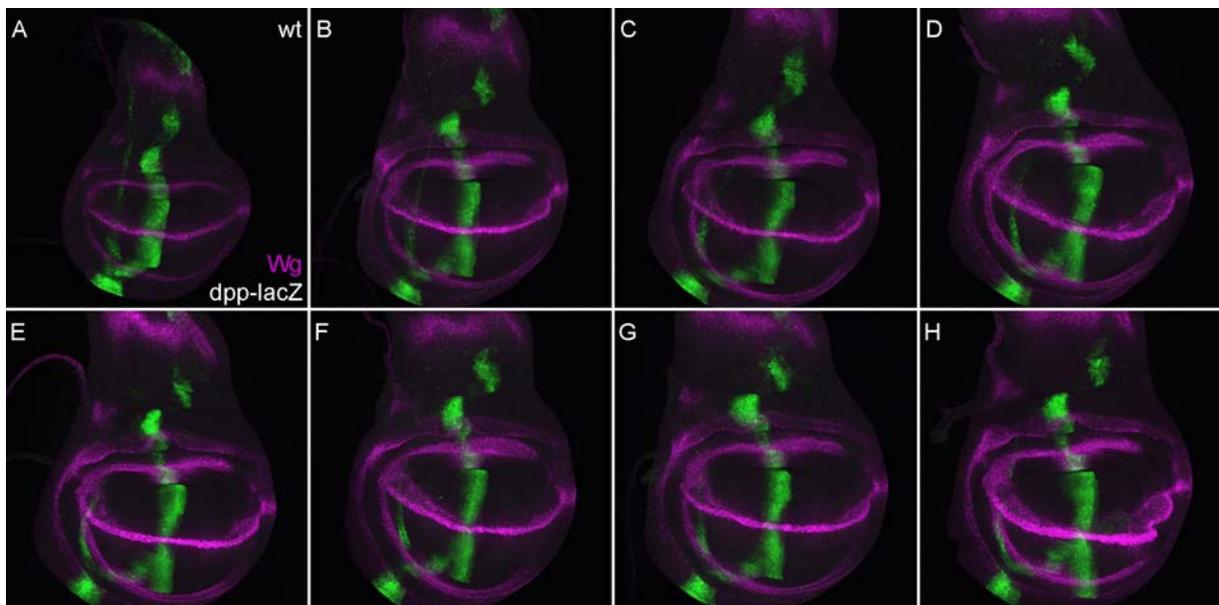


Abbildung 79 Literaturergebnisse

(A) Aus Wang et al., 2016 (verändert). (B-C) Aus Wang et al., 2000 (verändert). (A) *I(1)omb<sup>D4</sup>* mutante Flügelscheibe. DAPI (Blau), *mirr-lacZ* (Rot) (anterior links und dorsal oben). (B) *wt* Flügelscheibe (*omb-Gal4; UAS-GFP*). Vg (Rot), *omb-Gal4; UAS-GFP* (Grün) (anterior links und ventral oben). (C) Überexpression eines konstitutiv aktivem EGFR in der *omb* Domäne (*omb-Gal4/UAS-EGFR<sup>top4.2</sup>; UAS-GFP*). Vg (Rot), UAS-GFP (Grün) (anterior links und ventral oben).

Abbildung 80 *dpp-lacZ*- und *Wg*-Expression in *wt* Flügelscheiben

Dargestellt sind *wt* L3 Flügelimaginalscheiben. (A-H) Überlagerung des anti- $\beta$ -Galaktosidase (*dpp-lacZ*, Grün) und anti-*Wg* (Magenta) Signals. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

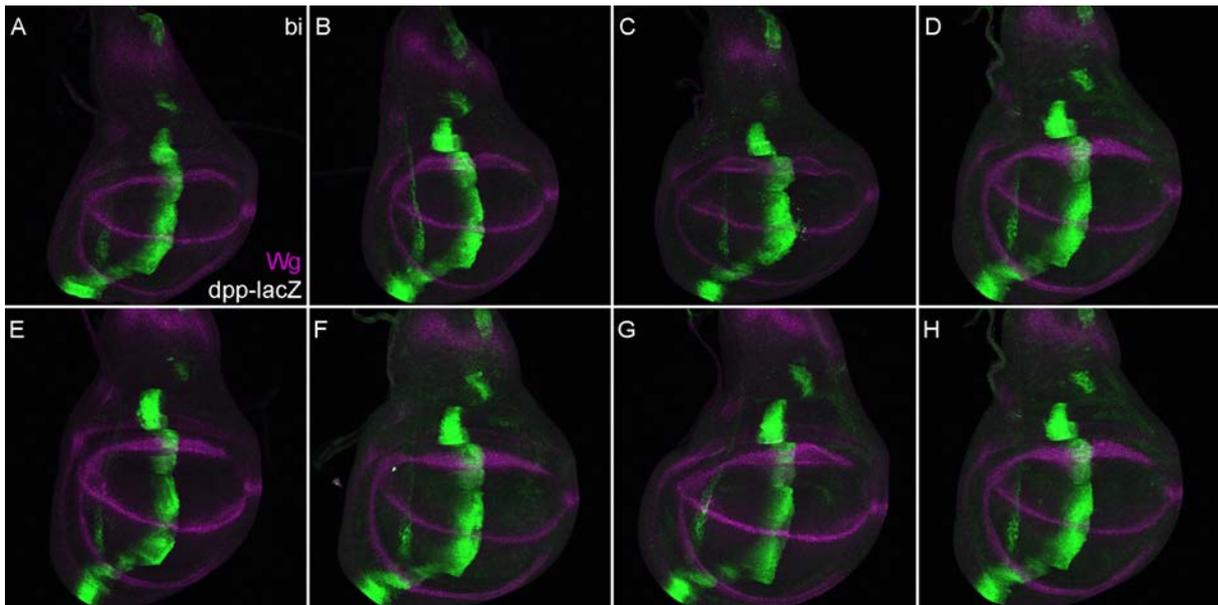


Abbildung 81 *dpp-lacZ*- und *Wg*-Expression in *bi* Flügelscheiben  
 Dargestellt sind *bi* L3 Flügelimaginalscheiben. (A-H) Überlagerung des anti- $\beta$ -Galaktosidase (*dpp-lacZ*, Grün) und anti-*Wg* (Magenta) Signals. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

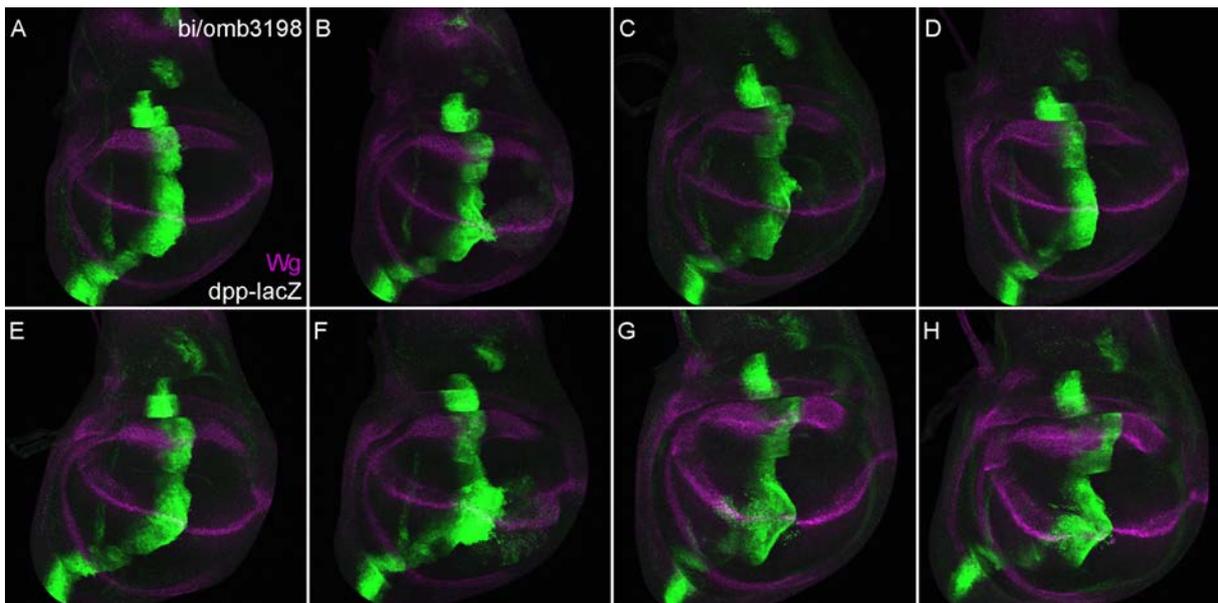


Abbildung 82 *dpp-lacZ*- und *Wg*-Expression in *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
 Dargestellt sind *bi/omb<sup>3198</sup>* mutante L3 Flügelimaginalscheiben. (A-H) Überlagerung des anti- $\beta$ -Galaktosidase (*dpp-lacZ*, Grün) und anti-*Wg* (Magenta) Signals. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

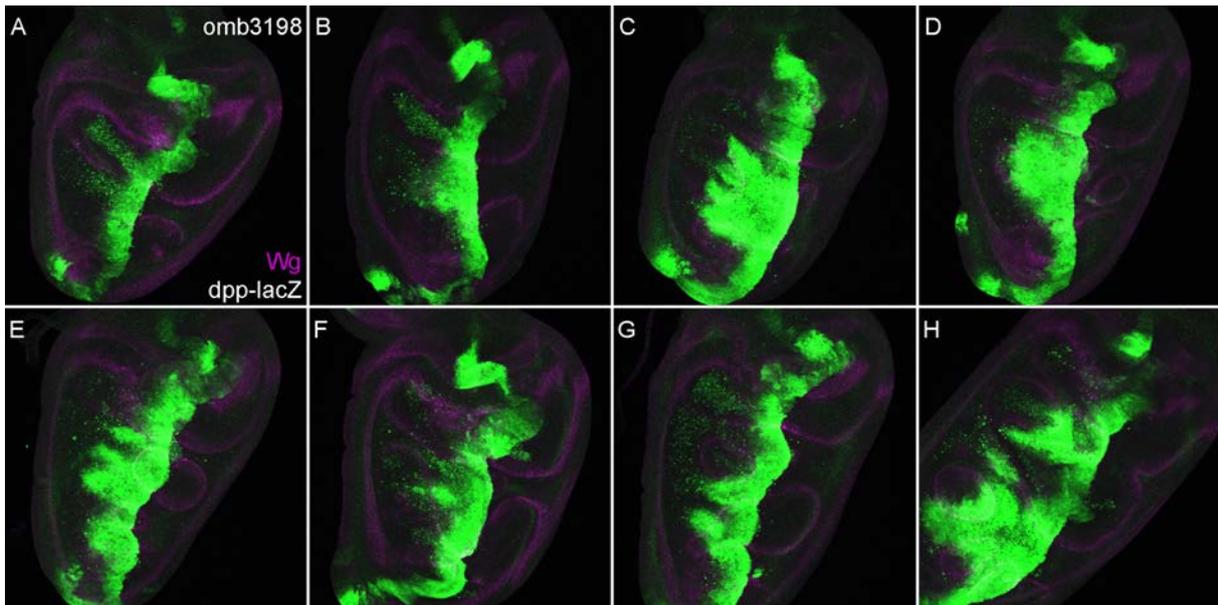


Abbildung 83 *dpp-lacZ*- und *Wg*-Expression in *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
 Dargestellt sind *I(1)omb<sup>3198</sup>* mutante L3 Flügelimaginalscheiben. (A-H) Überlagerung des anti- $\beta$ -Galaktosidase (*dpp-lacZ*, Grün) und anti-*Wg* (Magenta) Signals. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

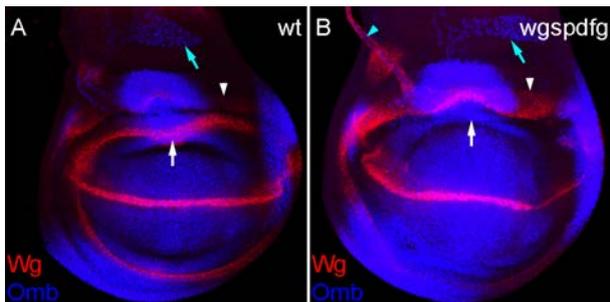


Abbildung 84 *Omb*-Expression in *wt* und *wgsd<sup>fg</sup>* L3 Flügelscheibe  
 (A) *wt* L3 Flügelimaginalscheibe. (B) *wgsd<sup>fg</sup>* mutante L3 Flügelimaginalscheibe. (A,B) Überlagerung des anti-*Wg* (Rot) und anti-*Omb* (Blau) Signals. Die weißen Pfeile markieren die Position der *Wg*-IR-Domäne und die weißen Pfeilspitzen die *Wg*-OR-Domäne. Die türkise Pfeile markieren die *Omb*-Expression im Luftsack Primordium (ASP) und die türkise Pfeilspitzen die Trachee. In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder wurden Tonwertkorrigiert.

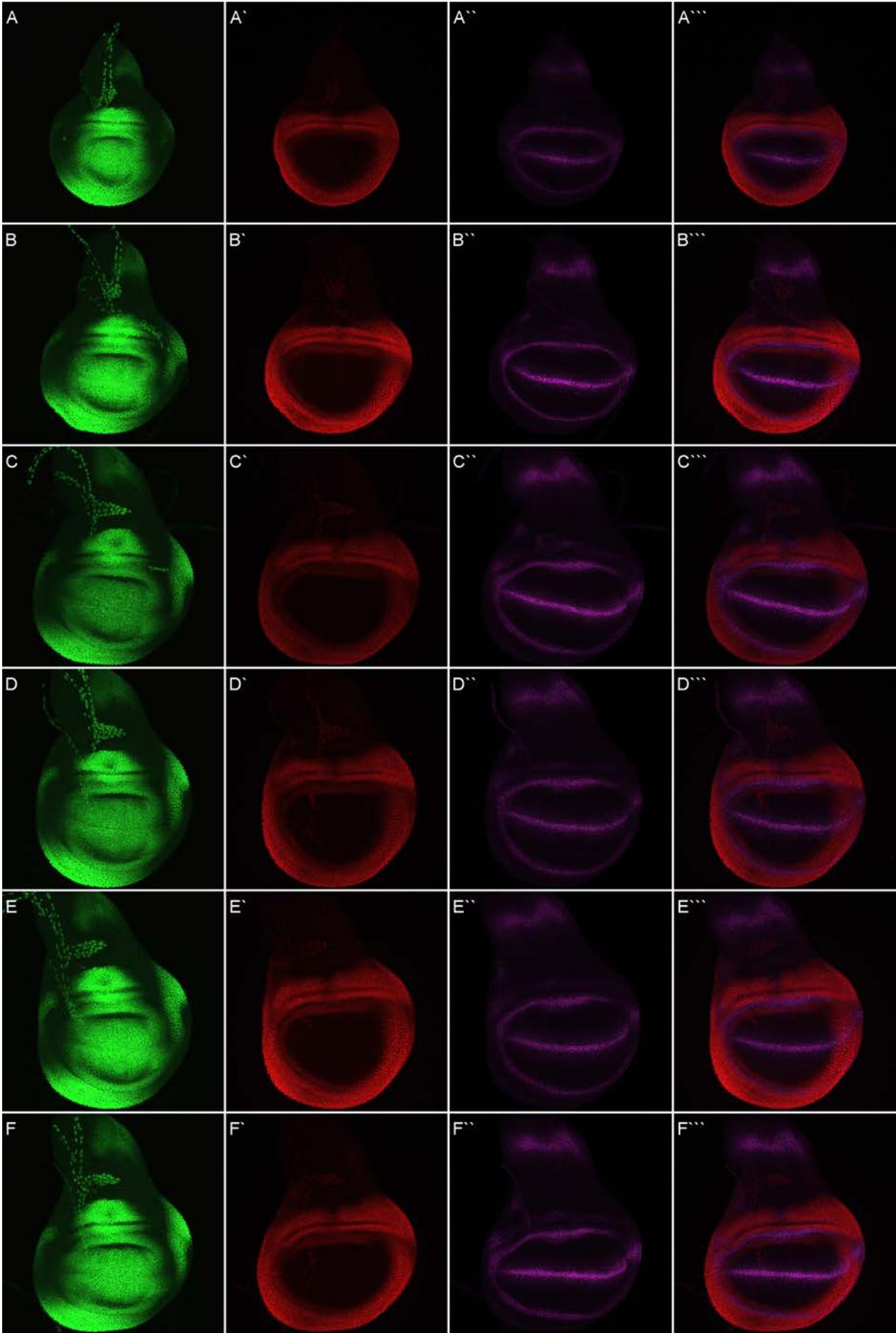
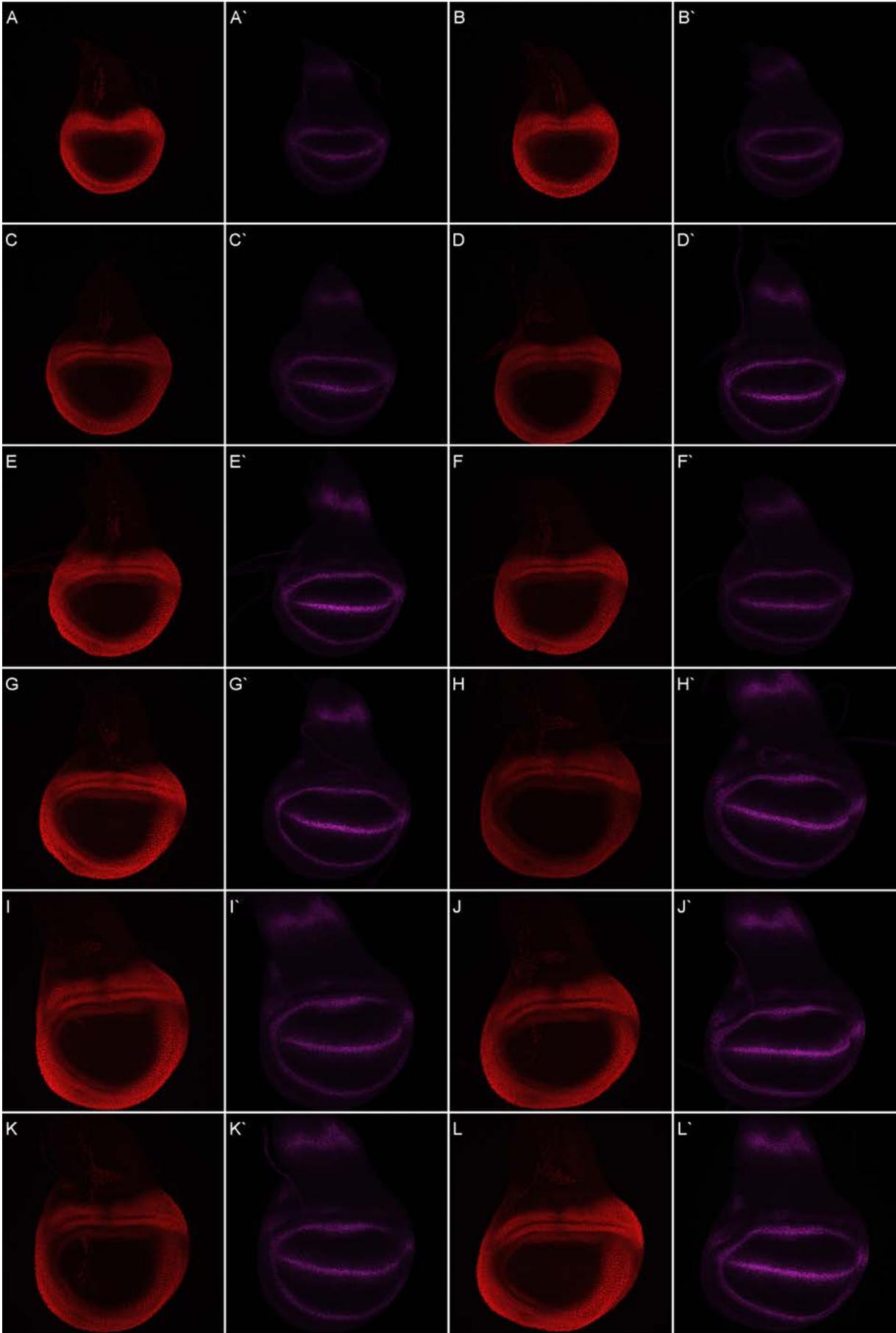


Abbildung 85 Zfh2- und Wg-Expression in wt Flügelscheiben



Abbildungung 86 Zfh2- und Wg-Expression in wt Flügelscheiben

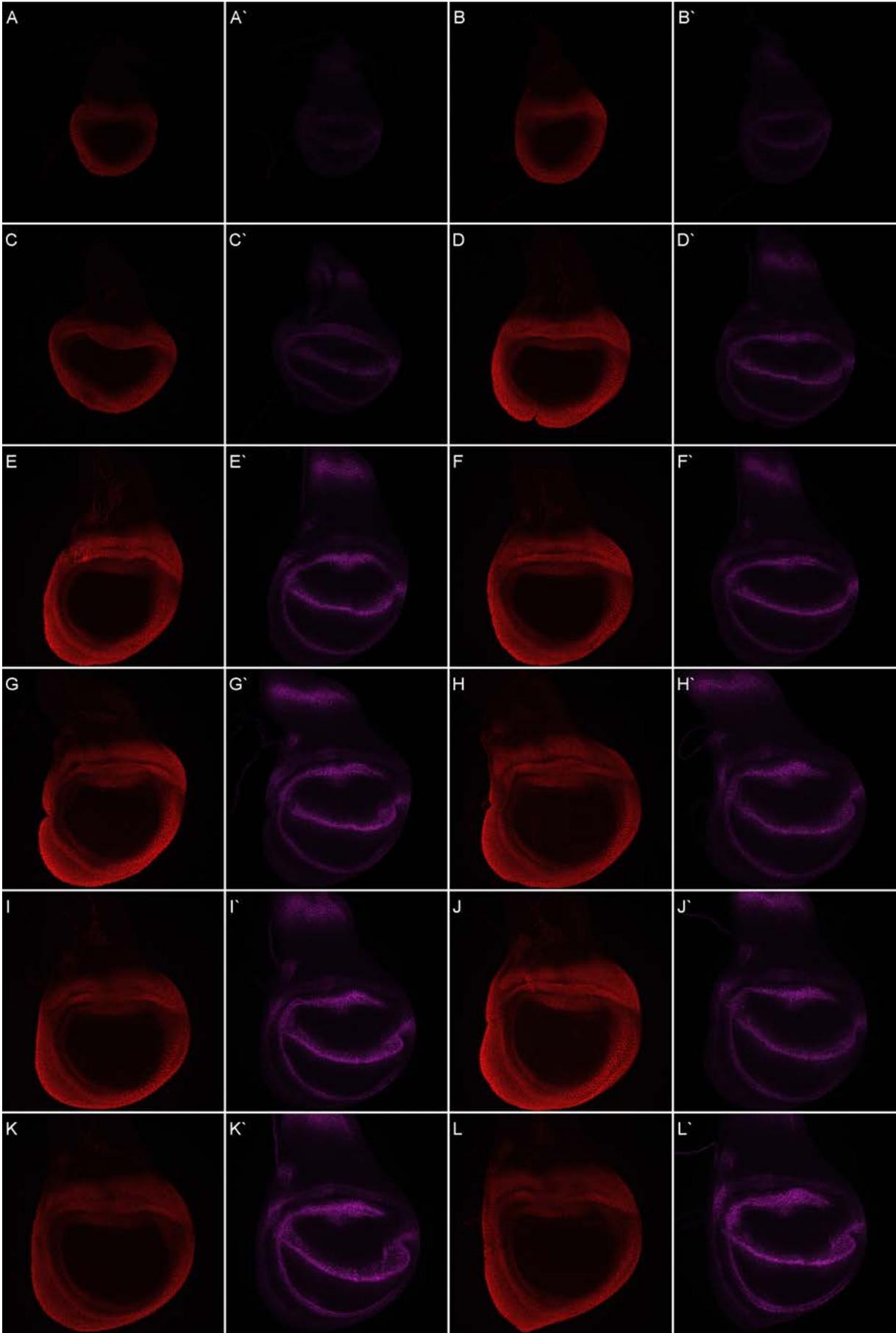


Abbildung 87 Zfh2- und Wg-Expression in *bi* Flügelscheiben

Dargestellt sind *bi* L3 Flügelimaginalscheiben. anti-Zfh2 (Rot; A-L), anti-Wg (Magenta; A`-L`). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

Abbildung 85 (auf der Seite 170) Zfh2- und Wg-Expression in *wt* Flügelscheiben

Dargestellt sind *wt* L3 Flügelimaginalscheiben. anti-Omb (Grün; A-F), anti-Zfh2 (Rot; A`-F`), anti-Wg (Magenta; A``-F``), Überlagerung des anti-Zfh2 und anti-Wg Signals (A````-F````). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

Abbildung 86 (auf der Seite 171) Zfh2- und Wg-Expression in *wt* Flügelscheiben

Dargestellt sind *wt* L3 Flügelimaginalscheiben. anti-Zfh2 (Rot; A-L), anti-Wg (Magenta; A`-L`). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

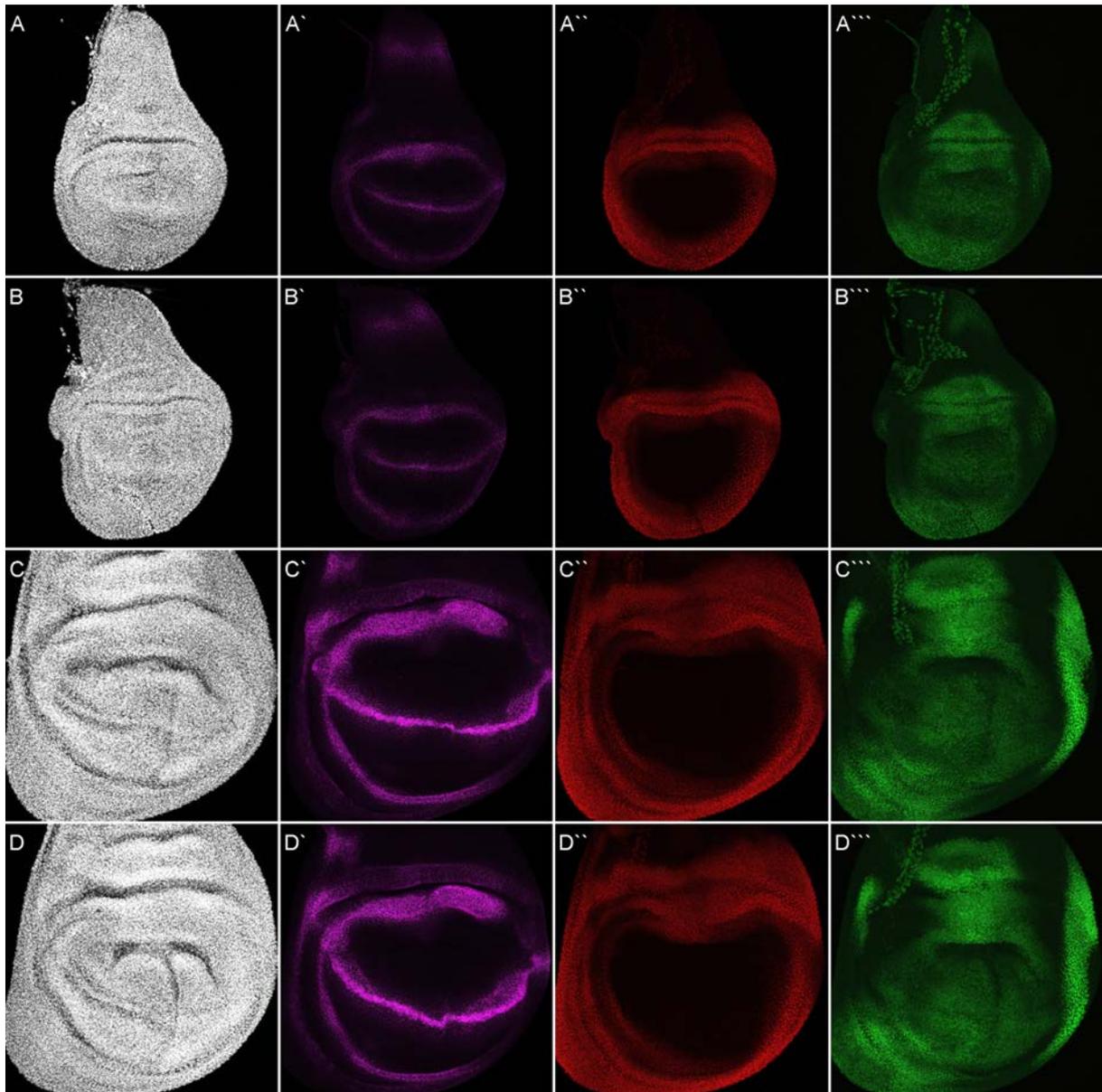


Abbildung 88 Zfh2- und Wg-Expression in *bilomb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben

Dargestellt sind *bilomb*<sup>3198</sup> mutante L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-D), anti-Wg (Magenta; A`-D`), anti-Zfh2 (Rot; A``-D``), anti-Omb (Grün; A````-D````). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

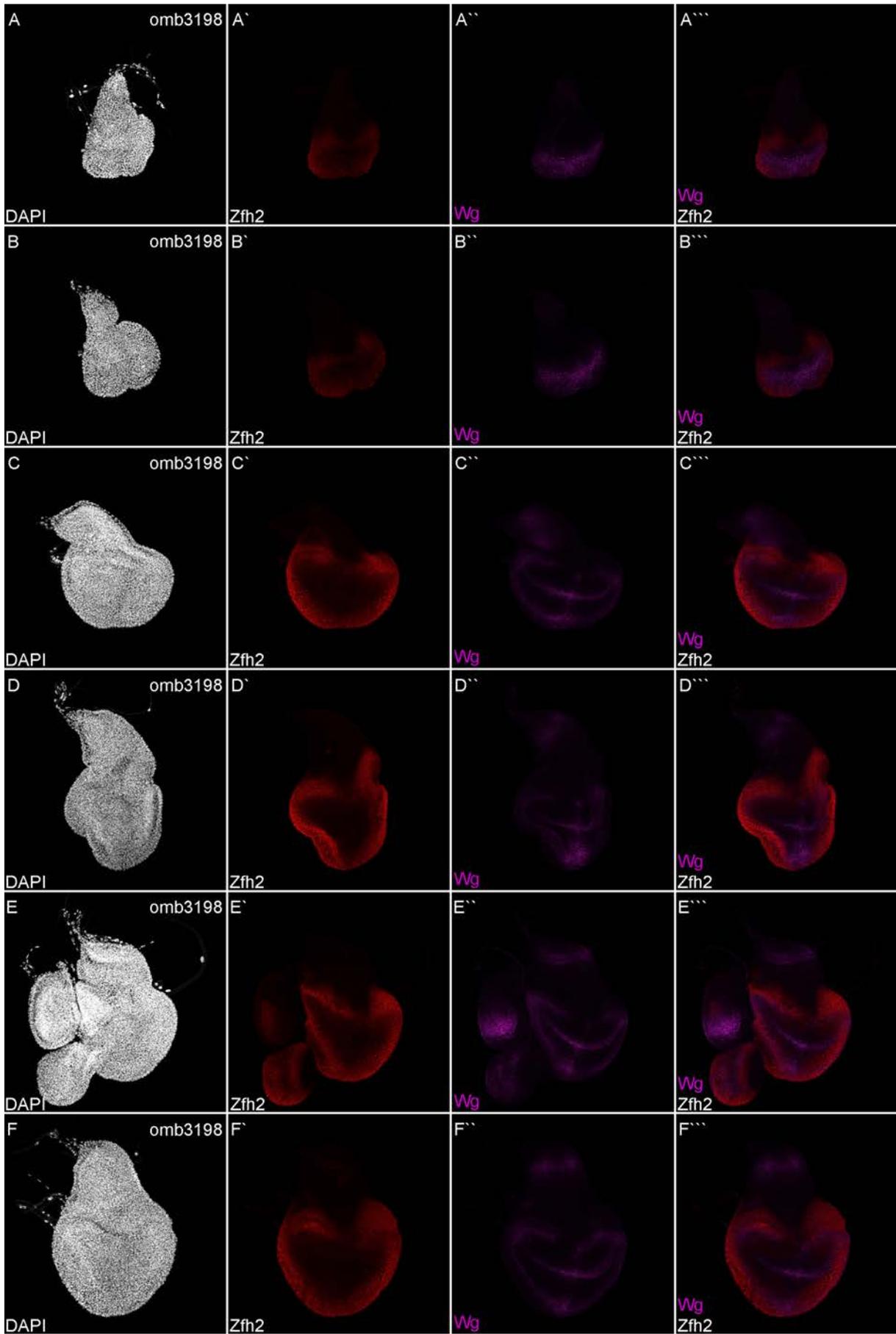


Abbildung 89 Zfh2- und Wg-Expression in *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutante L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-F), anti-Zfh2 (Rot; A'-F'), anti-Wg (Magenta; A''-F''), Überlagerung des anti-Zfh2 und anti-Wg Signals (A'''-F'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

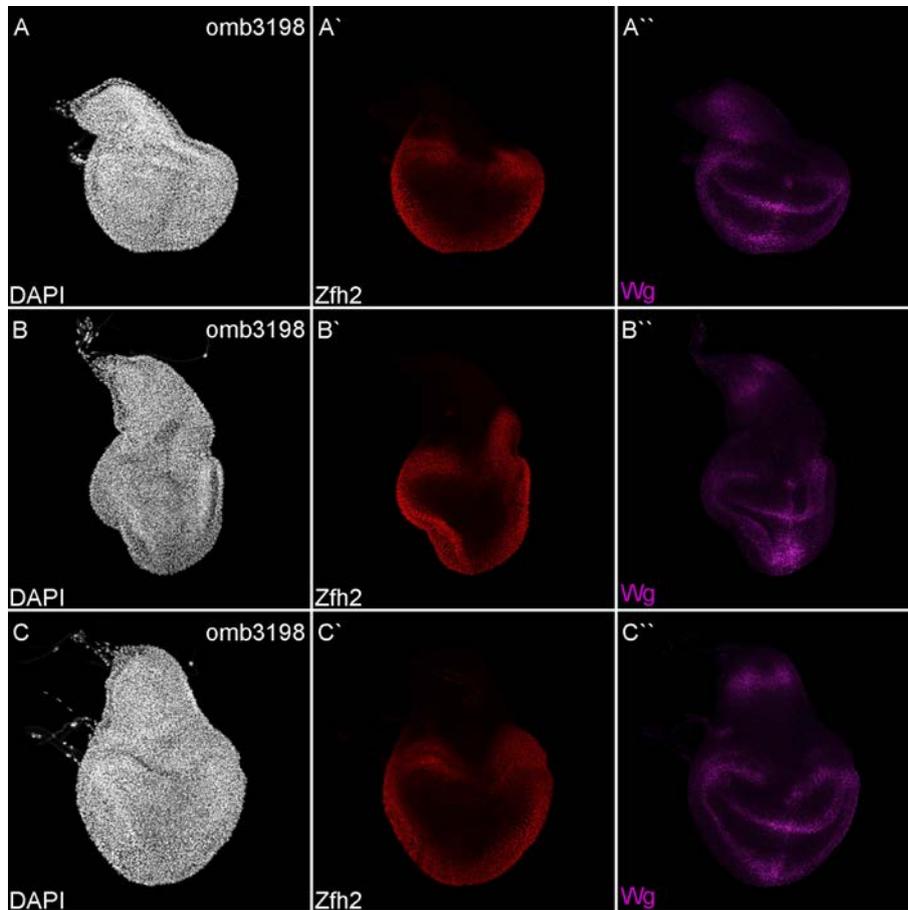


Abbildung 90 Zfh2-Expression in *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelnscheiben

Dargestellt sind *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutante L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-C), anti-Zfh2 (Rot; A'-C'), anti-Wg (Magenta; A''-C''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Fluoreszenzbilder (A'', B'', C'') wurden Tonwertkorrigiert.

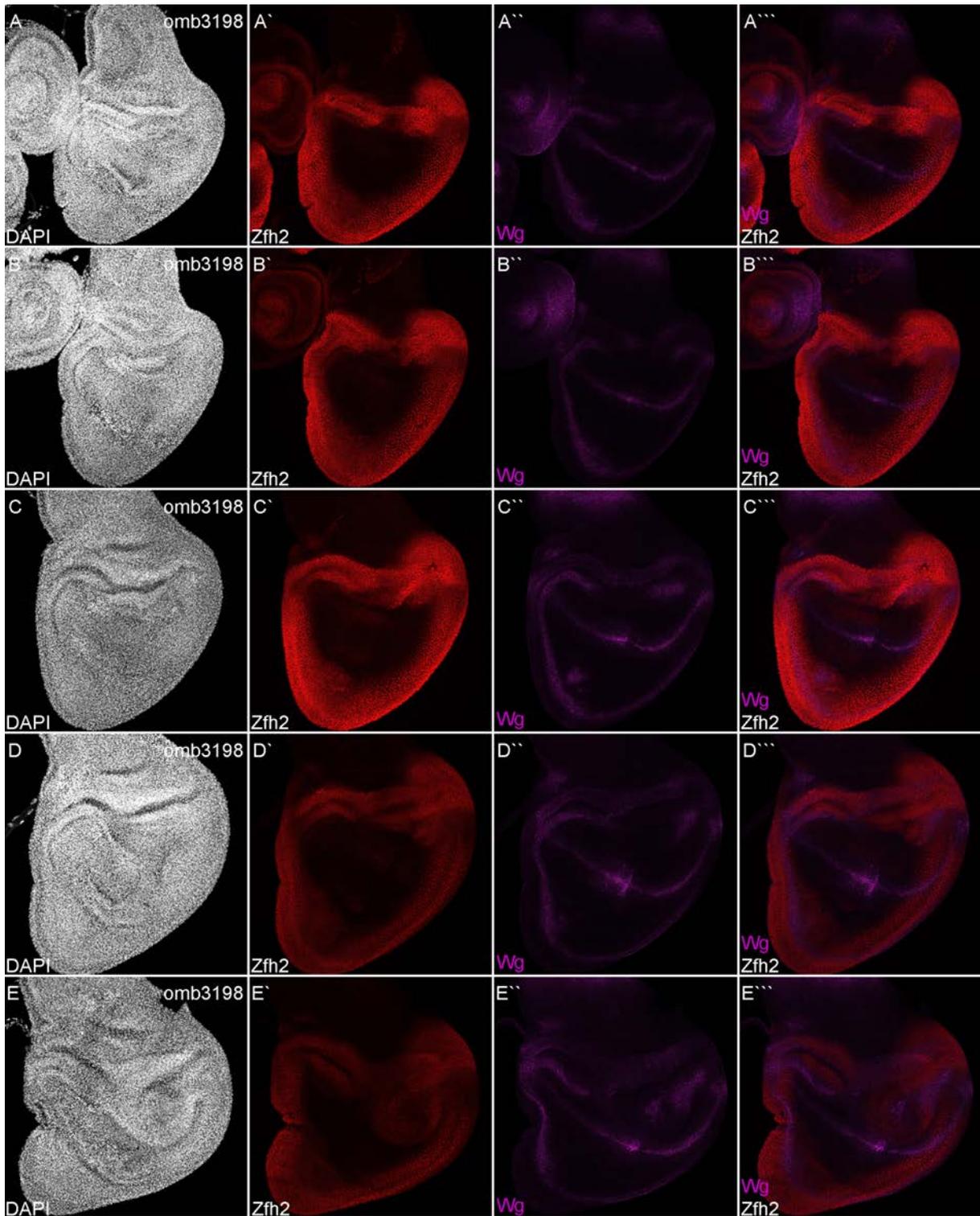


Abbildung 91 Zfh2-Expression in *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutante L3 Flügelimagnalscheiben. DAPI (Weiß; A-E), anti-Zfh2 (Rot; A'-E'), anti-Wg (Magenta; A''-E''), Überlagerung des anti-Zfh2 und anti-Wg Signals (A'''-E'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

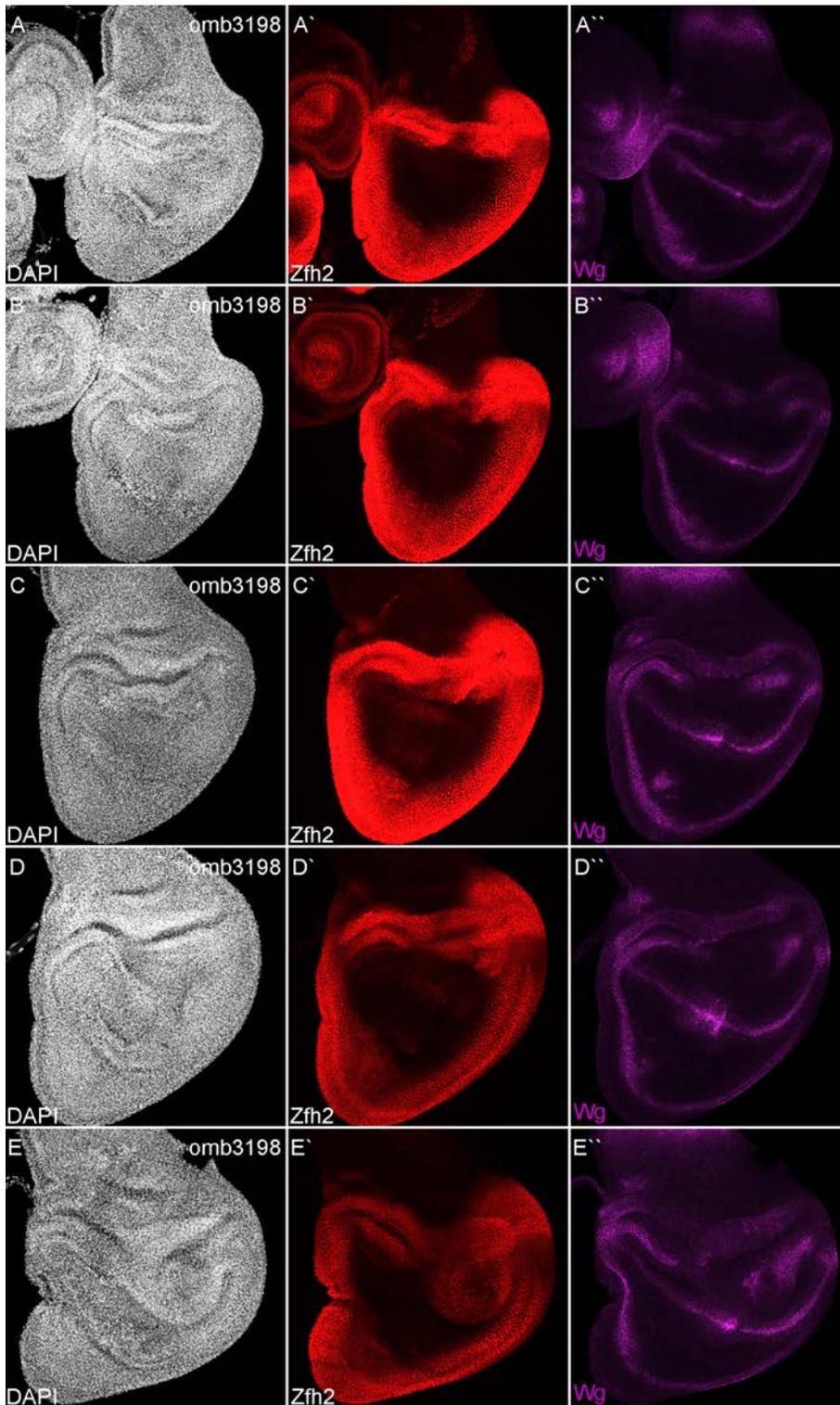
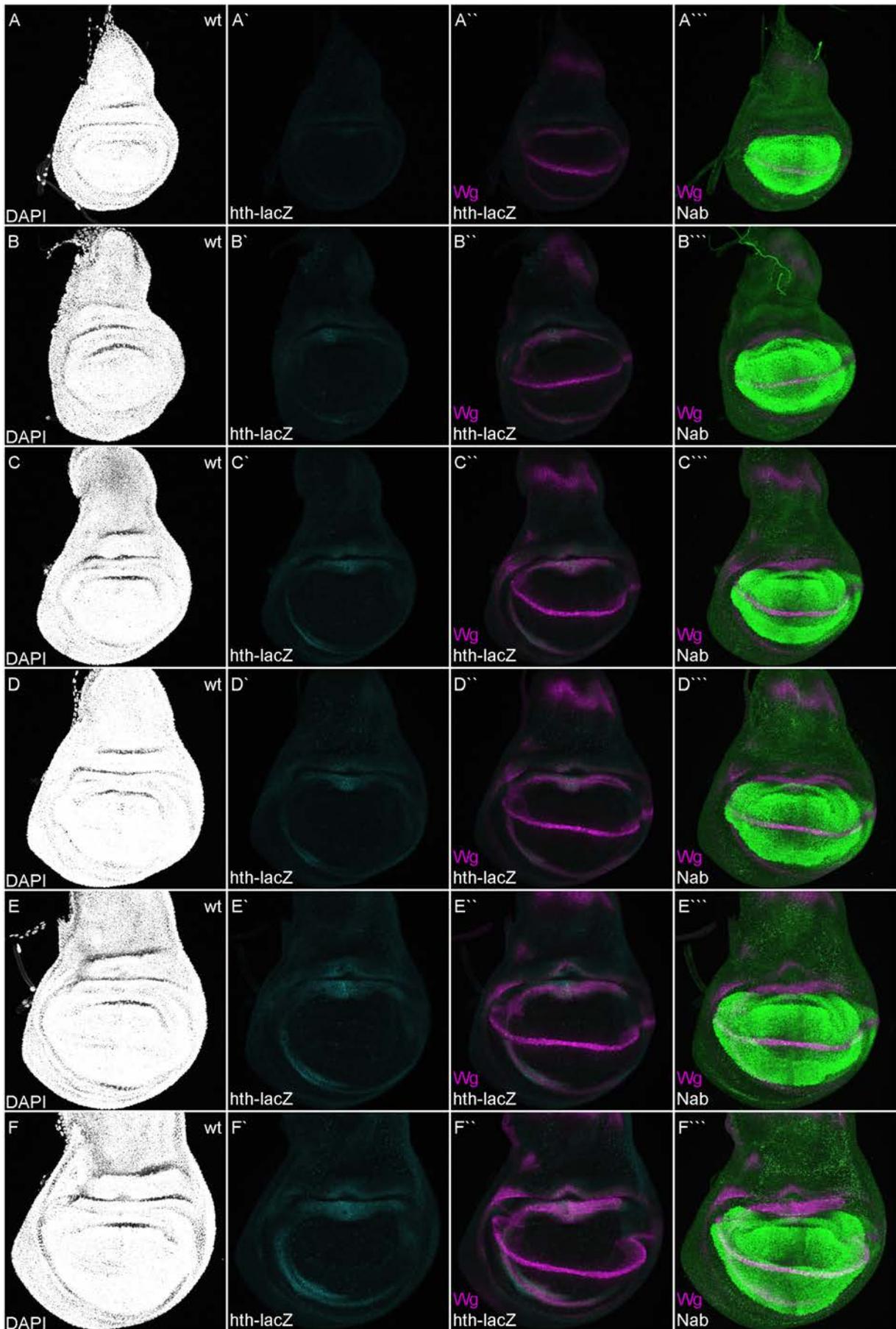


Abbildung 92 Zfh2-Expression in *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutante L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-E), anti-Zfh2 (Rot; A'-E'), anti-Wg (Magenta; A''-E''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Fluoreszenzbilder (A'-E', A''-E'') wurden Tonwertkorrigiert.

Abbildung 93 *hth-lacZ*- und Nab-Expression in wt Flügelscheiben

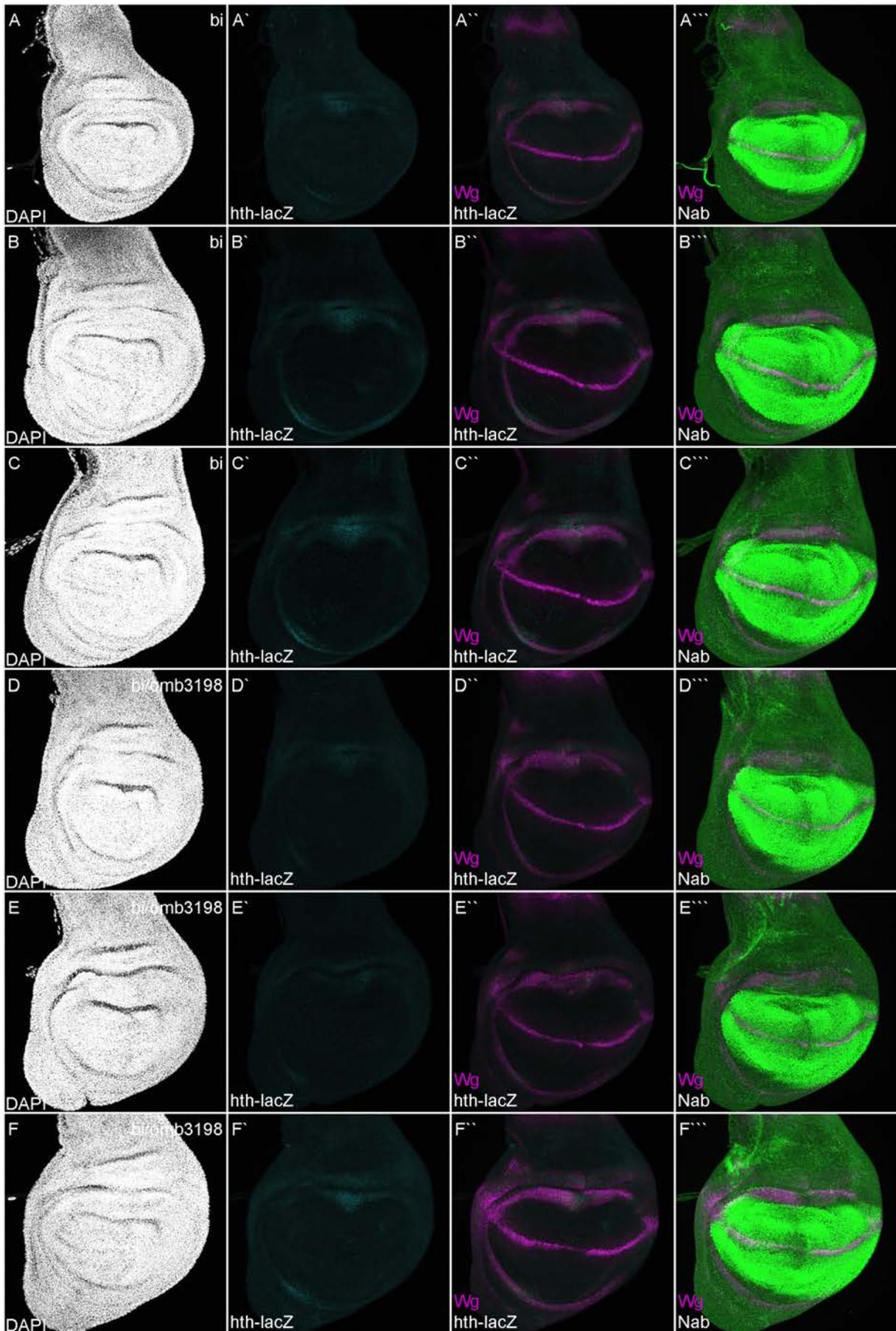


Abbildung 94 *hth-lacZ*- und Nab-Expression in *bi* und *bi/omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *bi* (A-C) und *bi/omb<sup>3198</sup>* (D-F) L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-F), *hth-lacZ* (Türkis; A'-F'), Überlagerung des *hth-lacZ* (Türkis) und anti-Wg (Magenta) Signals (A''-F''), Überlagerung des anti-Nab (Grün) und anti-Wg (Magenta) Signals (A'''-F'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

Abbildung 93 (auf der Seite 178) *hth-lacZ*- und Nab-Expression in *wt* Flügelscheiben  
 Dargestellt sind *wt* (mittlere bis späte) L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-F), *hth-lacZ* (Türkis; A'-F'), Überlagerung des *hth-lacZ* (Türkis) und anti-Wg (Magenta) Signals (A''-F''), Überlagerung des anti-Nab (Grün) und anti-Wg (Magenta) Signals (A'''-F'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A'-F') In der hinge wird *hth-lacZ* in einem inneren Ring (distal der H/H-Falte) und einen äußeren Ring (proximal der H/H-Falte) exprimiert. (A''-F'') *hth-lacZ* und Wg werden in der hinge coexprimiert. (A'''-F''') Die Nab-Expression grenzt proximal an die Wg-IR-Domäne und ist proximal stärker als distal. Entlang der D/V-Grenze wird kein Nab detektiert. Im A-Kompartiment erscheint die anti-Nab Färbung an der A/P-Grenze reduziert und nimmt von medial nach lateral an Intensität zu. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

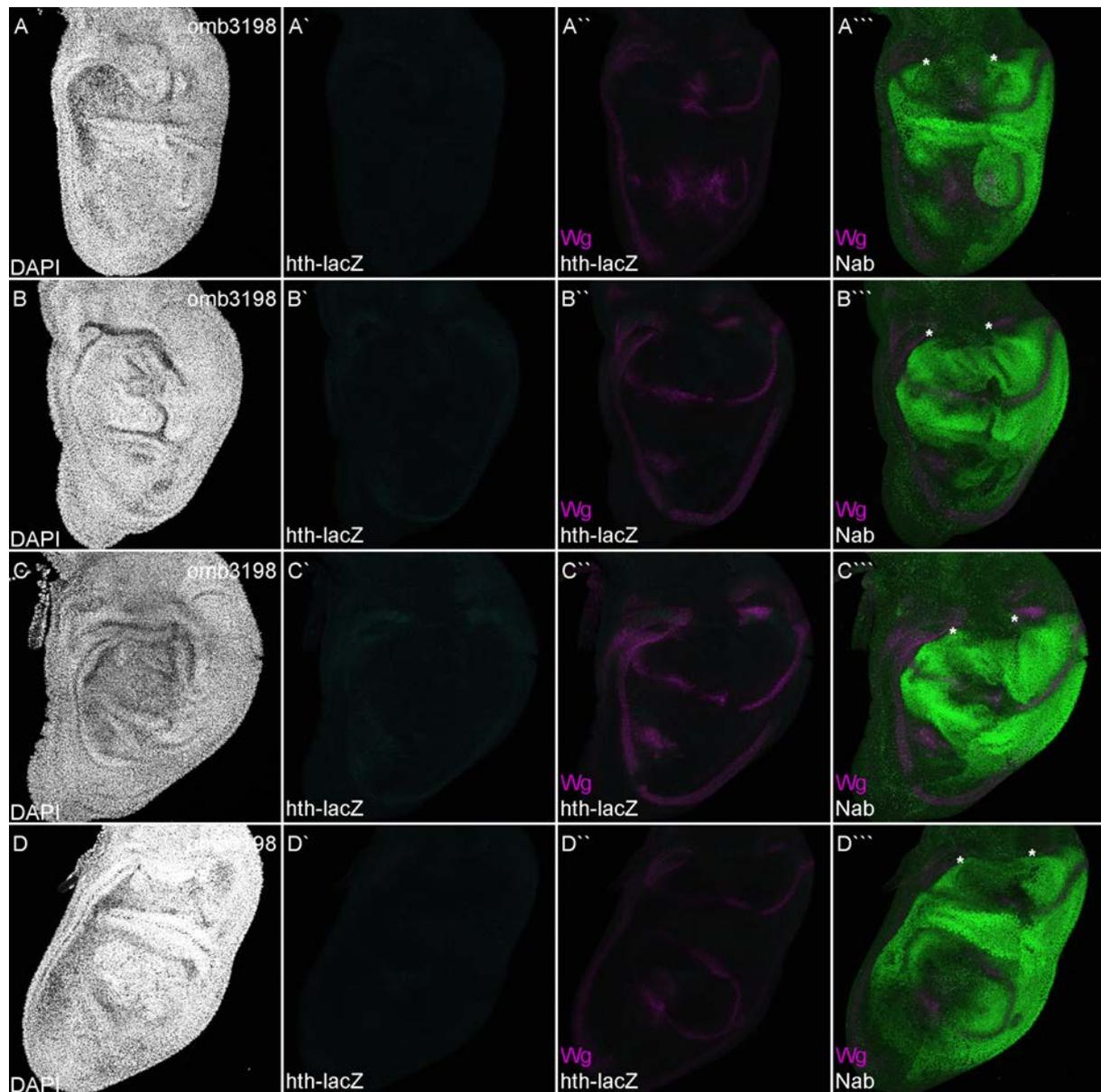


Abbildung 95 *hth-lacZ*- und Nab-Expression in *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutante L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-F), *hth-lacZ* (Türkis; A'-F'), Überlagerung des *hth-lacZ* (Türkis) und anti-Wg (Magenta) Signals (A''-F''), Überlagerung des anti-Nab (Grün) und anti-Wg (Magenta) Signals (A'''-F'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A'-D') In der dorsalen hinge ist die *hth-lacZ*-Expression medial unterbrochen. (A''-D'') *hth-lacZ* und Wg werden in der hinge coexprimiert. (A'''-D''') Flügelscheiben zeigen in Bereichen ektopischer Wg-Expression eine Verminderung oder ein Fehlen der anti-Nab Färbung. Der Stern (\*) kennzeichnet die verbleibende Wg-IR-Expression in der dorsalen hinge. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

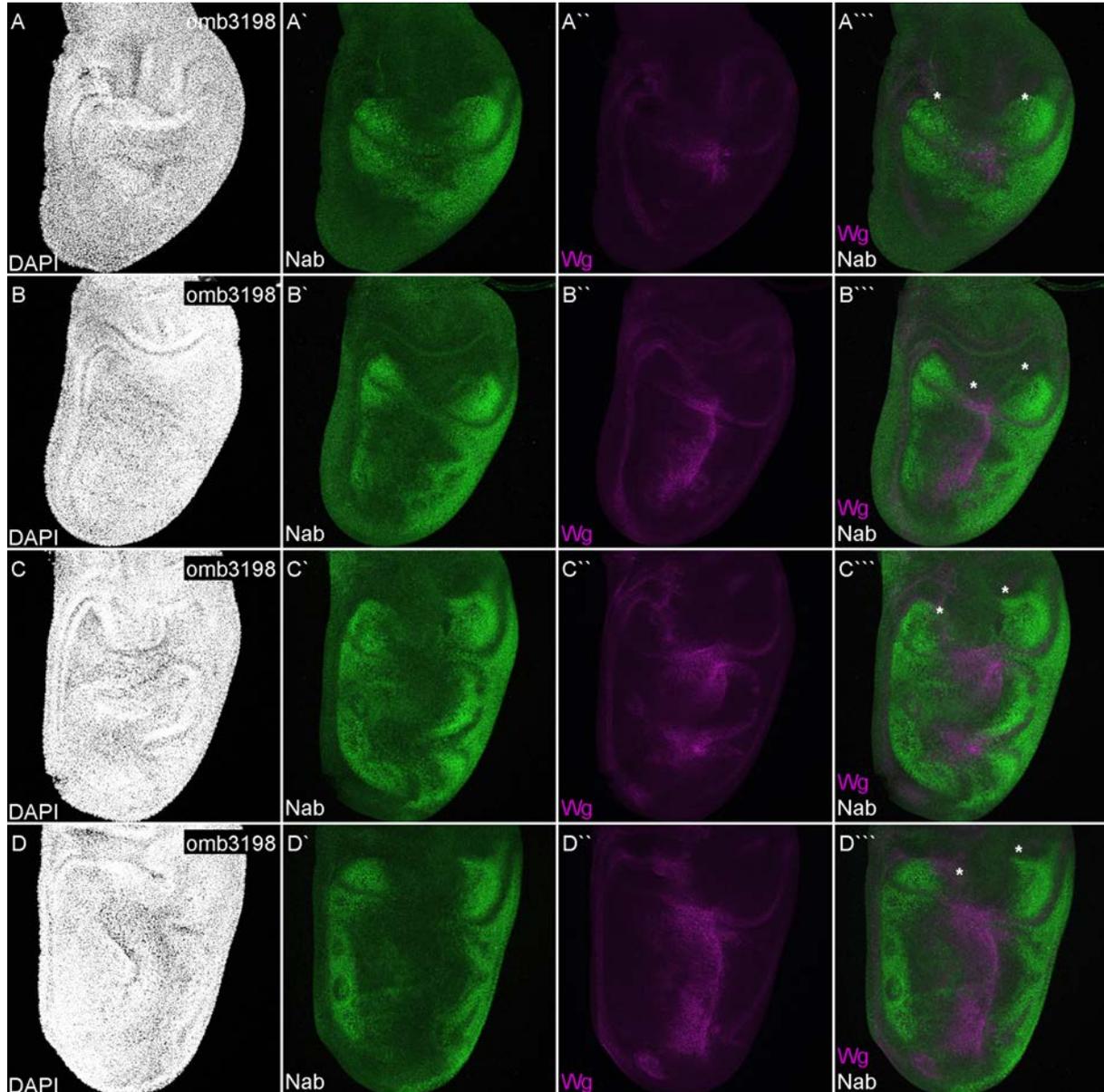


Abbildung 96 Nab- und Wg-Expression in *l(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben

Dargestellt sind *l(1)omb<sup>3198</sup>* mutante L3 Flügelimaginalscheiben. DAPI (Weiß; A-D), Nab (Grün; A'-D'), anti-Wg (Magenta; A''-D''), Überlagerung des anti-Nab (Grün) und anti-Wg (Magenta) Signals (A'''-D'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. (A'-D') In der medialen pouch ist die anti-Nab Färbung größtenteils reduziert. (A''-D'') Wg wird in der pouch fehlexprimiert. (A'''-D''') Flügelscheiben zeigen in Bereichen ektopischer Wg-Expression eine Verminderung oder ein Fehlen der anti-Nab Färbung. Der Stern (\*) kennzeichnet die verbleibende Wg-IR-Expression in der dorsalen hinge. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

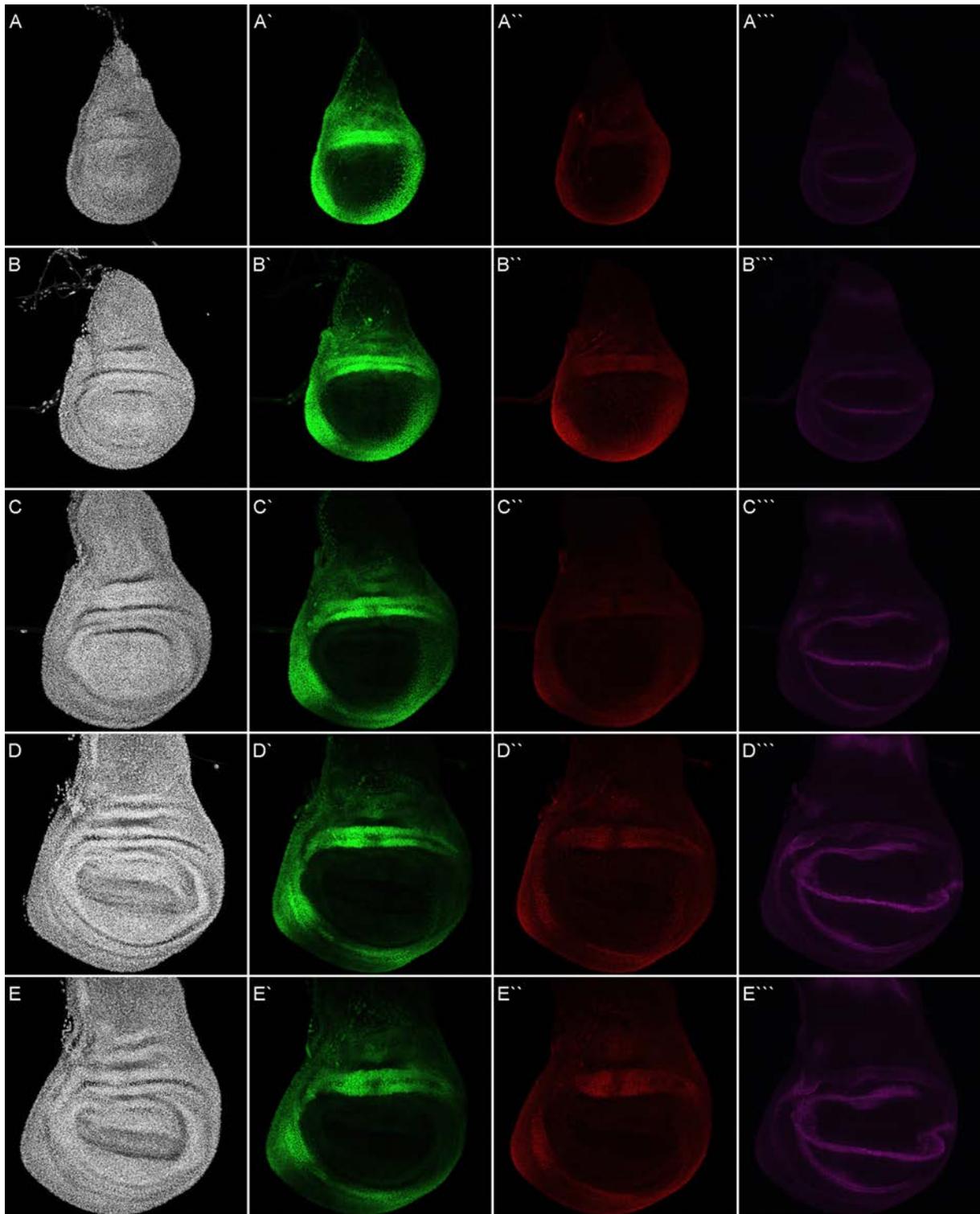


Abbildung 97 10xSTAT-GFP-Expression in *wt* Flügelscheiben

Dargestellt sind wildtypische L3 Flügelimagnalscheiben in unterschiedlichem Entwicklungsstadium (früh – mittel – spät (L3), von oben nach unten). DAPI (Weiß; A-E), 10xSTAT-GFP (Grün; A'-E'), anti-GFP (Rot; A''-E''), anti-Wg (Magenta; A'''-E'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

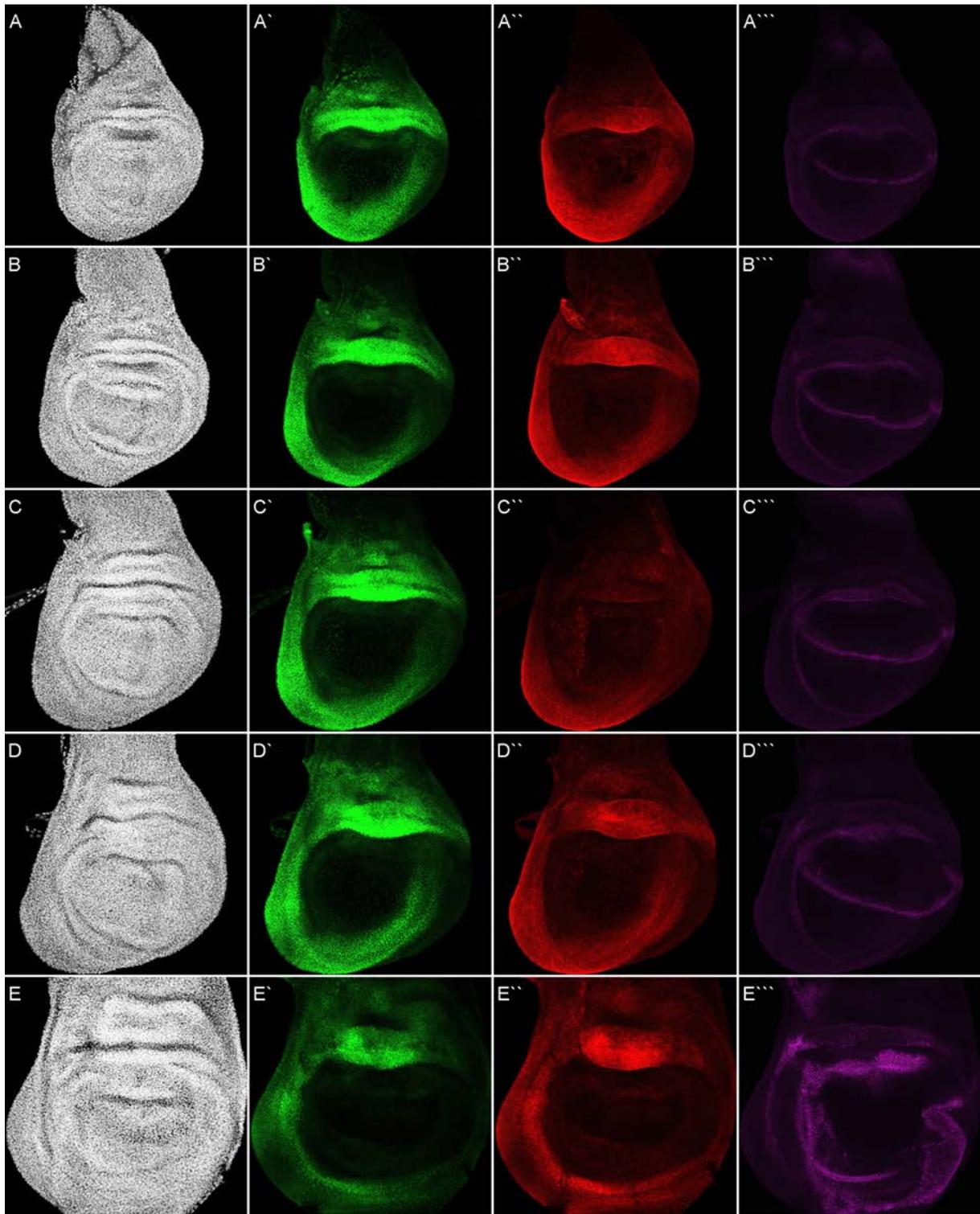


Abbildung 98 10xSTAT-GFP-Expression in *bi* Flügelscheiben

Dargestellt sind *bifid* mutante L3 Flügelimaginatscheiben in unterschiedlichem Entwicklungsstadium (früh – mittel – spät (L3), von oben nach unten). DAPI (Weiß; A-E), 10xSTAT-GFP (Grün; A'-E'), anti-GFP (Rot; A''-E''), anti-Wg (Magenta; A'''-E'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. In E ist eine sehr späte L3 (präpupale) Flügelscheibe gezeigt; in (E''') ist anhand der anti-Wg Färbung entlang der D/V-Grenze zu erkennen, dass die Flügelscheibe bereits evertiert. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

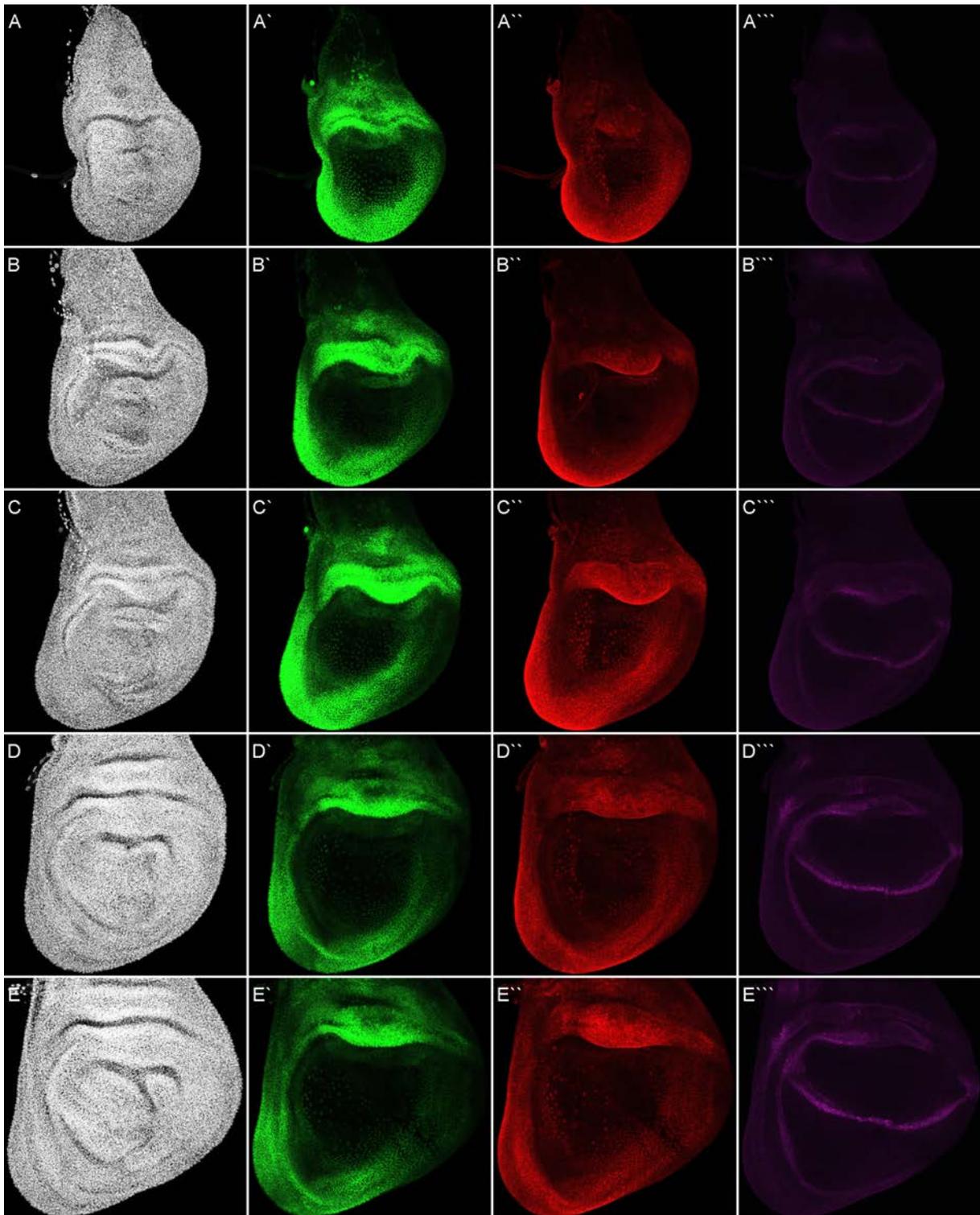


Abbildung 99 10xSTAT-GFP-Expression in *bi/omb*<sup>3198</sup> Flügelscheiben

Dargestellt sind *bi/omb*<sup>3198</sup> mutante L3 Flügelimaginalscheiben in unterschiedlichem Entwicklungsstadium (früh – mittel – spät (L3), von Oben nach Unten). DAPI (Weiß; A-E), 10xSTAT-GFP (Grün; A'-E'), anti-GFP (Rot; A''-E''), anti-Wg (Magenta; A'''-E'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

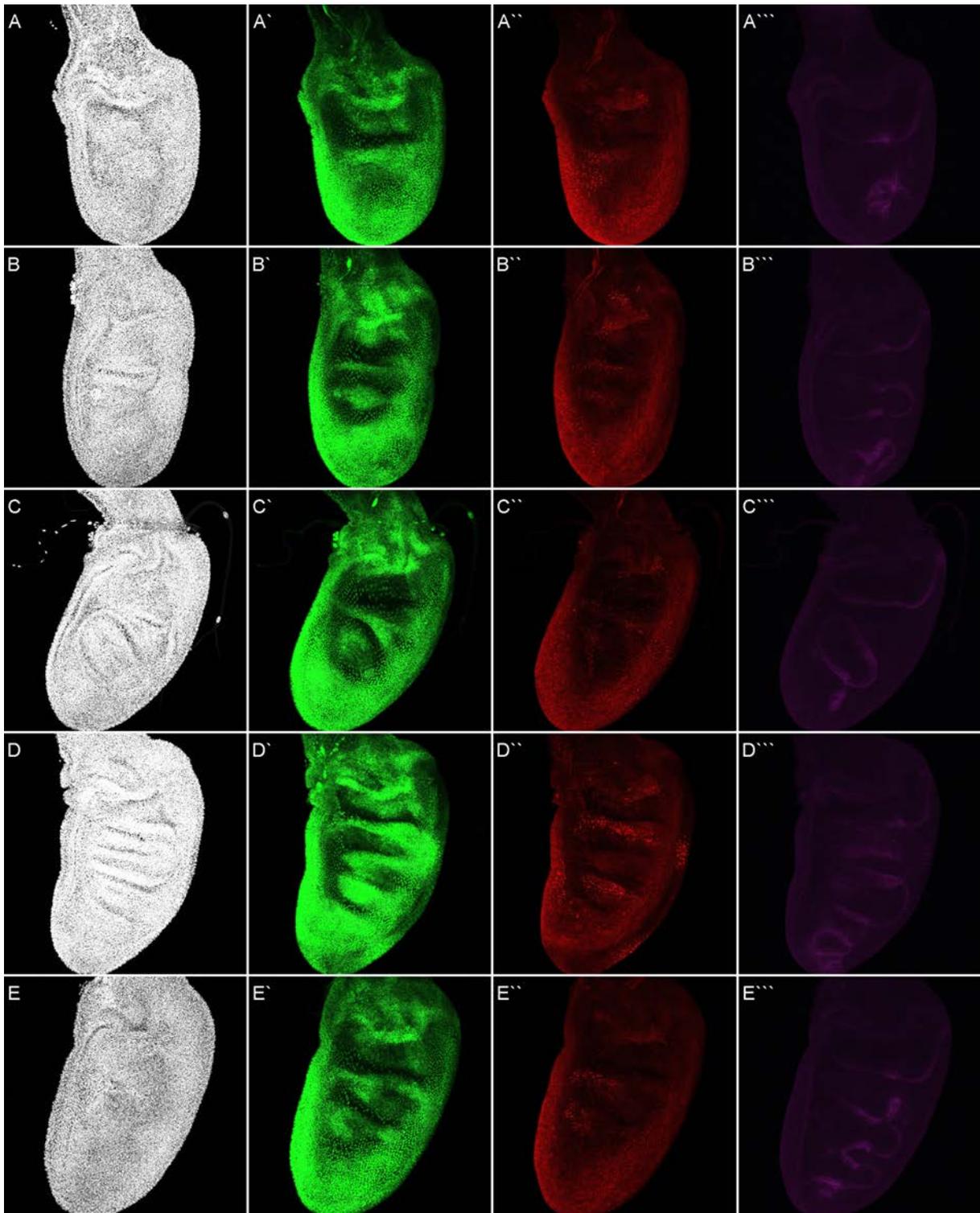


Abbildung 100 10xSTAT-GFP-Expression in *I(1)omb<sup>3198</sup>* Flügelscheiben  
 Dargestellt sind *I(1)omb<sup>3198</sup>* mutante L3 Flügelimaginalscheiben in unterschiedlichem Entwicklungsstadium (früh – mittel – spät (L3), von oben nach unten). DAPI (Weiß; A-E), 10xSTAT-GFP (Grün; A'-E'), anti-GFP (Rot; A''-E''), anti-Wg (Magenta; A'''-E'''). In allen Bildern ist anterior links und dorsal oben. Darstellung als Maximalprojektion von Z-Bildstapeln. Alle Fluoreszenzbilder ohne Tonwertkorrektur.

## 8.4 Versicherung

Versicherung gemäß § 11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 22.12.2003

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

Mainz, den 03.08.2018

---

(Fred Eichinger)

## 8.5 Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater für die Möglichkeit der Anfertigung einer Dissertation, die Anregungen und kritischen Kommentare und für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Zweitgutachter für die freundliche Übernahme der Aufgaben des Zweitgutachters bedanken.

Bei allen Kollegen und Mitarbeitern am Institut für Genetik bedanke ich mich für die gemeinsam verbrachte Zeit, die stete Hilfsbereitschaft und die vielseitige Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich für ihre fortwährende Unterstützung.

## 8.6 Lebenslauf