



Suche nach Zielgenen des T-Box Transkriptionsfaktors  
Optomotor-blind aus *Drosophila melanogaster*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Johannes-Gutenberg-Universität Mainz  
Fachbereich Biologie

vorgelegt von  
Christian Gadomsky  
geboren in Saarbrücken

Mainz 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Das Wesen der Dinge hat die Angewohnheit, sich zu verbergen.

Heraklit

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	6
1.1	Omb und die T-Box Protein Familie.....	6
1.2	T-Box Proteine und Krebs .....	8
1.3	Neue <i>omb</i> Mutationen .....	9
1.4	Zielgene von Omb .....	10
1.5	Imaginalscheiben als Untersuchungsobjekt.....	11
2	Material und Methoden .....	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Chemikalien .....	14
2.1.2	Enzyme .....	14
2.1.2.1	Restriktionsendonukleasen .....	14
2.1.2.2	Weitere Enzyme .....	14
2.1.3	Lösungen und Puffer.....	15
2.1.3.1	Ethanol-fällung.....	15
2.1.3.2	Phenolextraktion.....	15
2.1.3.3	Plasmid Minipräparation (manuelle Labormethode) .....	15
2.1.3.4	Gelelektrophorese.....	15
2.1.3.5	Medien.....	16
2.1.3.6	X-Gal Färbung.....	16
2.1.3.7	Herstellung von RNA Sonden.....	17
2.1.3.8	Sichtbare <i>in situ</i> Hybridisierung .....	17
2.1.3.9	Antikörperfärbung .....	18
2.1.3.10	Antikörper .....	18
2.1.3.11	Proteinherstellung und Aufreinigung.....	18
2.1.3.12	Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) für EMSA.....	19
2.1.3.13	SDS-PAGE zum Proteinnachweis .....	19
2.1.3.14	Western Blot .....	20
2.1.3.15	EMSA .....	20
2.1.4	Kits.....	21
2.1.5	Oligonukleotide (Primer) .....	22
2.1.6	Laborgeräte.....	22
2.1.6.1	Mikroskope .....	22

2.1.6.2	PCR Geräte .....	22
2.1.6.3	Gelkammern für Elektrophorese.....	22
2.1.6.4	Gel-Dokumentationssystem .....	23
2.1.6.5	Western Blot Apparatur .....	23
2.1.6.6	Pipetten .....	23
2.1.6.7	Zentrifugen .....	23
2.1.6.8	Sonstige Laborgeräte .....	23
2.1.7	Fliegenstämme .....	23
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	27
2.2.1.1	Gelextraktion .....	27
2.2.2	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese ( <i>SDS-PAGE</i> ) .....	28
2.2.3	Western Blot .....	28
2.2.4	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i> .....	28
2.2.5	Präparation von L3 Larven.....	29
2.2.6	X-Gal Färbung von L3 Imaginalscheiben .....	30
2.2.7	Herstellung von RNA-Sonden.....	30
2.2.8	Sichtbare <i>in situ</i> Hybridisierung ( <i>in situ</i> ) .....	31
2.2.9	Antikörperfärbung .....	33
2.2.10	Enzymreaktionen .....	33
2.2.10.1	Restriktionsverdau .....	33
2.2.10.2	Ligation .....	34
2.2.10.3	Dephosphorylierung.....	35
2.2.11	Ethanol fällung .....	35
2.2.12	Phenolextraktion .....	36
2.2.13	Transformation.....	36
2.2.14	Bakterienkultur.....	37
2.2.15	Plasmidpräparation.....	37
2.2.16	Sequenzierungen.....	38
2.2.17	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	38
2.2.17.1	Standard PCR.....	38
2.2.17.2	<i>Site-Directed Mutagenesis</i> .....	39
2.2.17.3	<i>Megaprime PCR</i> .....	40
2.2.17.4	<i>Pool PCR</i> .....	40

2.2.18	Herstellung von <i>enhancer-reporter</i> Konstrukten für die Transgenese	41
2.2.19	Transgenese.....	42
2.2.20	Fliegenhaltung.....	42
2.2.21	Fliegenkreuzungen.....	43
2.2.21.1	Kombination von autosomalen <i>enhancer-reporter</i> Insertionen mit <i>I(1)omb<sup>15</sup></i>	43
2.2.21.2	Kombination des x-chromosomalen <i>D/V-h-lacZ</i> Transgens mit <i>I(1)omb<sup>D4</sup></i>	43
2.2.21.3	Identifikation transgener Fliegen.....	44
2.2.21.4	<i>Balancer</i> -Kreuzungen.....	44
2.2.22	Verwendete Computerprogramme und Datenbanken.....	46
3	Ergebnisse und Diskussion.....	47
3.1	Null Mutationen in <i>Omb</i> .....	47
3.1.1	Phänotypische Charakterisierung neuer <i>omb</i> Allele.....	47
3.1.2	Identifizierung molekularer Läsionen in den <i>I(1)omb</i> Allelen.....	47
3.1.3	<i>Missense</i> Mutationen liegen in konservierten Bereichen von <i>Omb</i> .....	48
3.1.4	Herstellung und Isolation von MBP- <i>OmbT</i> Fusionsproteinen.....	49
3.1.5	<i>Missense</i> Mutationen in <i>Omb-T</i> verhindern die DNA Bindung.....	51
3.1.6	Diskussion: Neue <i>omb</i> Mutationen und ihre Auswirkung auf die Funktion des Proteins.....	52
3.2	Potentielle Zielgene von <i>Omb</i> .....	54
3.2.1	<i>Dorsocross 2 (Doc2)</i> .....	54
3.2.1.1	<i>DocF1</i> .....	56
3.2.1.2	<i>DocF3</i> .....	58
3.2.1.3	<i>DocF3-s4</i> .....	60
3.2.1.4	<i>DocF3-s2</i> .....	63
3.2.1.5	<i>DocF3-s3</i> .....	63
3.2.1.6	<i>DocF7</i> .....	66
3.2.1.7	Diskussion.....	68
3.2.2	<i>hairy (h)</i> .....	72
3.2.2.1	<i>D/V-h[9kb]</i> .....	73
3.2.2.2	Diskussion.....	74
3.2.3	<i>hedgehog (hh)</i> .....	75
3.2.3.1	<i>hh[6,2kb]</i> .....	75

---

3.2.3.2	Diskussion .....	77
3.2.4	<i>invected (inv)</i> .....	78
3.2.4.1	<i>inv[5,3kb]</i> .....	79
3.2.4.2	Diskussion .....	83
3.2.5	<i>mirror (mirr)</i> .....	85
3.2.5.1	<i>mirr[5,6kb]</i> .....	86
3.2.5.2	<i>mirr[1,7kb]</i> .....	87
3.2.5.3	Diskussion .....	93
3.2.6	<i>muscle-segment-homeobox (msh/Drop)</i> .....	94
3.2.6.1	Omb reguliert <i>msh</i> .....	95
3.2.6.2	<i>msh[4,8kb]</i> .....	97
3.2.6.3	<i>msh[1,6kb]</i> .....	100
3.2.6.4	Diskussion .....	101
3.2.7	<i>retained (retn/dri)</i> .....	102
3.2.7.1	<i>retn[5,8kb]</i> .....	102
3.2.8	<i>scute (sc)</i> .....	103
3.2.8.1	<i>scute[5,9kb]</i> .....	104
3.2.9	<i>shifted (shf)</i> .....	104
3.2.9.1	<i>shf[4,3kb]</i> .....	105
3.2.10	<i>Tenascin major (Ten-m/ odd Oz)</i> .....	106
3.2.10.1	<i>ten-m[5,8kb]</i> .....	106
3.2.10.2	Diskussion .....	109
3.2.11	<i>thickveins (tkv)</i> .....	109
3.2.11.1	<i>tkvA[5,2kb], tkvB[3kb], tkvC[4kb] und tkvD[3,3kb]</i> .....	110
3.2.11.2	Diskussion .....	111
3.2.12	<i>ventral veins lacking (vvl, dfr)</i> .....	111
3.2.12.1	<i>vvl[6,3kb]</i> .....	112
3.2.12.2	Reguliert Omb die <i>vvl</i> Expression? .....	112
3.2.12.3	Diskussion .....	113
3.2.13	<i>vestigial (vg)</i> .....	114
3.2.13.1	<i>vgQE[1kb]</i> .....	115
3.2.13.2	Omb aktiviert die <i>vgQE[1kb]</i> Expression unabhängig der TBEs .....	116
3.2.13.3	Omb-Bindungsverhalten <i>in vitro</i> .....	118
3.2.13.4	Diskussion .....	120

---

3.3	Expression von Vertebraten Tbx Genen in <i>Drosophila</i> .....	122
3.3.1	<i>pEntry-D-Topo-omb-3xflag</i> und <i>pCa4B2G-UAS-GW-omb-3xflag</i> .....	123
3.3.1.1	Sequenzanalyse des <i>pCa4B2G-UAS-GW-omb-3xflag</i> aus der Arbeit von Anne Legler (AL).....	123
3.3.1.2	Mutagenese zur Korrektur einer Rasterschub-Deletion in <i>pEntry-D-Topo-omb-3xflag</i> (Remutation 1).....	124
3.3.1.3	Sequenzanalyse von <i>pEntry-D-Topo-omb-3xflag-remut-1</i> .....	124
3.3.1.4	Austausch des dreifach mutierten Bereichs in <i>pEntry-D-Topo-omb-3xflag-remut-1</i> (Remutation 2).....	125
3.3.1.5	Charakterisierung des <i>pCaB2G-UAS-GW-omb-3xflag</i> .....	126
3.3.2	<i>pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag</i> und <i>pCa4B2G-UAS-GW-Tbx5-3xflag</i> .....	127
3.3.2.1	Sequenzanalyse des <i>pCa4B2G-UAS-GW-Tbx5-3xflag</i> (AL).....	127
3.3.2.2	Sequenzanalyse des <i>pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag</i> (AL).....	128
3.3.2.3	Resynthese und Sequenzanalyse des <i>pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag</i> 129	
3.3.2.4	Reparaturmutagenese des <i>pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag</i> (AL).....	130
3.3.2.5	Sequenzanalyse der <i>pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag-mut1</i> und <i>-mut2</i> Klone 130	
3.3.2.6	Sequenzanalyse des <i>pCa4B2G-UAS-GW-TBX5-3xflag</i> .....	132
3.3.2.7	Diskussion.....	132
3.4	Konstruktion eines TBX2-T-MBP Fusionsprotein-Vektors.....	134
3.4.1	Diskussion.....	136
3.5	Zusammenfassung.....	138
4	Stichwortverzeichnis.....	139
5	Anhang.....	140
5.1	Alignment der Omb Proteinsequenz gegen die Dreifachmutante <i>pEntry-D-Topo-omb-</i> (remut 1).....	140
5.2	Konzeptionelle Sequenz von <i>pEntry-D-Topo-omb-</i> (mit Annotationen).....	141
5.3	Verwendete Oligonukleotide.....	143
5.4	TBE Analyse der <i>Doc</i> Region.....	149
5.5	Literatur.....	154
5.6	Versicherung.....	163



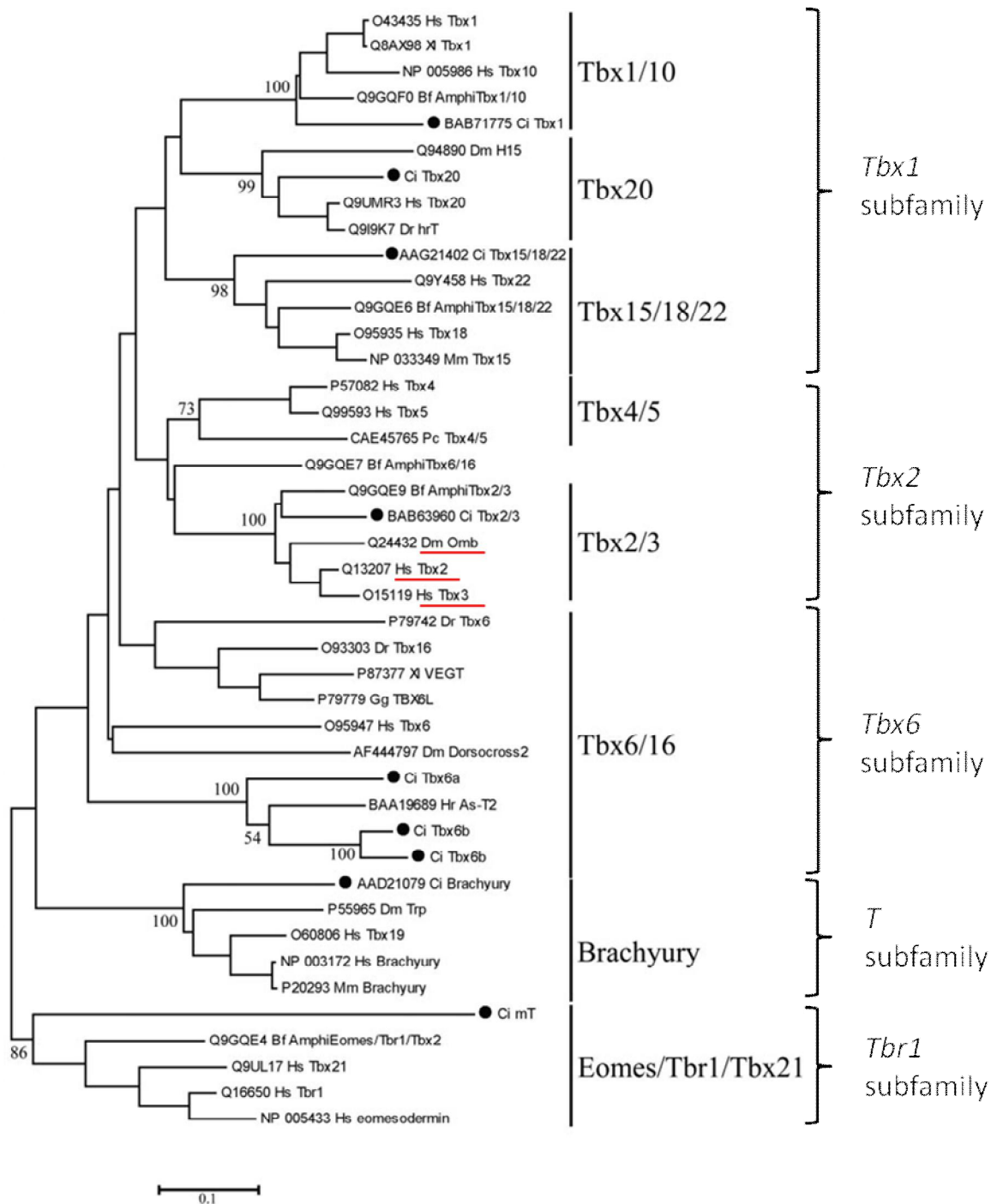
## 1 Einleitung

### 1.1 Omb und die T-Box Protein Familie

T-Box Proteine gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Vertebraten und Invertebraten spielen (Papaioannou, 2001). Beim Menschen erkennt man diesen Umstand daran, dass Mutationen in TBX Genen eine Reihe von Krankheiten verursachen. Dazu zählen Mutationen in TBX1 (DiGeorge syndrome), TBX15 (Cousine syndrome), TBX19 (Isolated ACTH deficiency), TBX20 (congenital heart disease), TBX22 (X-linked cleft palate and ankyloglossia) (Kirk et al., 2007; Lausch et al., 2008; Packham and Brook, 2003). T-Box Proteine zeichnen sich alle durch ein gemeinsames Merkmal aus: die T-Domäne. Die T-Domäne ist ein 200 Aminosäure (As) umfassendes DNA-Bindungsmotif. Sie ist nach dem zuerst entdeckten T-Box Gen *T* (*Brachyury*) in Mäusen benannt (Dobrovolskia-Zavadskia, 1927). 1992 konnte erstmals von Pflugfelder et al. eine Sequenzhomologie zwischen der T-Box des Mäusegens *T* und der von *omb* in *Drosophila* nachgewiesen werden. *omb* ist eines von 8 *Drosophila* T-Box Genen und es existieren weitere 17 Verwandte in Säugern. Phylogenetisch lässt es sich als einziges *Drosophila* Gen der *Tbx2* Unterfamilie, einer von insgesamt 5 Unterfamilien, zuordnen (**Abbildung 1.1**). In Vertebraten umfasst diese Gruppe *Tbx2* - *Tbx5*. *Tbx2/3* hält man für orthologe Gene von *omb*, da ihre transkriptionellen Eigenschaften und die Beschaffenheit ihrer T-Domäne miteinander vergleichbar sind (Porsch et al., 1998; Porsch et al., 2005). Inzwischen konnte mehrfach gezeigt werden, dass T-Box Proteine Sequenzen (T-Box Binding Elements: TBEs) erkennen, die der palindromischen „half-site“ (HS) sehr ähnlich sind, welche ursprünglich für das Brachyury Protein der Maus gefunden wurde (Andreou AM, 2007; Garnett et al., 2009; Grimm and Pflugfelder, 1996; Kispert and Hermann, 1993; Tada and Smith, 2001). Zum Beispiel selektiert Omb in einem SELEX (*in vitro target site selection*) Experiment die gleiche consensus HS, bestehend aus zehn Basenpaaren, wie Brachyury und Tbx6 der Maus.

Neben den oben erwähnten Krankheiten können Mutationen der Gene der TBX2 Unterfamilie unter anderem die Entwicklung von Extremitäten stören. In diesen Fällen führen diese Genmutationen zu haploinsuffizienten Syndromen wie z.B. dem

Ulnar-mammary syndrome (TBX3), dem Small patella syndrome (TBX4) und dem Holt-Oram syndrome (TBX5) (Bongers et al., 2004; Packham and Brook, 2003). Von *Omb* weiß man, dass es ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Extremitäten bei *Drosophila*, insbesondere des Flügels, spielt. So fand man in pharat-adulten Tieren von *Omb* Nullmutanten stark missgebildete Flügelblätter. Wird *Omb* im Notumbereich der Flügelimaginalscheibe ektopisch exprimiert, führt dies zu einer Überproliferation und schließlich zur Ausbildung eines zweiten Flügelpaares (Grimm and Pflugfelder, 1996; Shen and Dahmann, 2005). Neben diesen extremen Phänotypen, die die Relevanz von *Omb* bei der Flügelentwicklung widerspiegeln, gibt es auch subtilere, die darauf hinweisen, dass *Omb* mehrere verschiedene Aufgaben dabei übernimmt. In Fliegen, die das regulatorische, hypomorphe *omb* Allel *bifid* (*omb<sup>bi</sup>*) exprimieren findet man beispielsweise eine Fehlentwicklung im Bereich der *hinge* Region der Imaginalscheibe, die später das Flügelgelenk ausbildet (Grimm and Pflugfelder, 1996; Morgan, 1916; Shen, 2008). Neuere Zellklonanalysen zeigen, dass *Omb* im posterioren Kompartiment die Bildung einer apikalen Furche entlang der anterioren/posterioren (A/P) Kompartimentgrenze verhindern kann und anterior zur Stabilität der A/P Grenze beiträgt (Shen, 2008; Shen and Dahmann, 2005). A-Zellen, die kein *Omb* exprimieren positionieren sich innerhalb des P Kompartiments ohne sich mit P-Zellen zu vermischen. Damit verschieben sie die A/P Grenze nach Posterior. Dies zeigt, dass *Omb* ein wichtiger Faktor für das affine Verhalten von A-Zellen ist, der nicht nur das posteriore Schicksal unterdrückt. Neben diesen Aufgaben erfüllt *Omb* als pleiotropes Gen auch wichtige Funktionen bei der Entwicklung anderer Organe und Gewebe, wie dem Auge, dem Gehirn und der Pigmentierung der abdominalen Tergiten (Brunner et al., 1992; Hofmeyer, 2008; Kopp and Duncan, 1997; Pflugfelder, 2009; Pflugfelder et al., 1992a; Tomlinson, 2003). Während der Larvalentwicklung wird *omb* zum Beispiel in den dorsalen und ventralen Rändern der Augenscheiben exprimiert und scheint die voranschreitende retinale Differenzierung zu unterdrücken (Porsch et al., 2005).



**Abbildung 1.1 Phylogenetischer Stammbaum der T-Box Genfamilie.** Die 5 Unterfamilien der T-Box Genfamilie sind angegeben. Die orthologen Gene *omb* und *TBX2/3* sind rot unterstrichen. Stammbaum leicht verändert nach (Takatori et al., 2004).

## 1.2 T-Box Proteine und Krebs

In den letzten 10 Jahren haben viele Studien ergeben, dass die menschlichen orthologen Gene von *omb* aus *Drosophila*, *Tbx2* und *Tbx3*, in einer Vielzahl von

Krebsarten überexprimiert oder amplifiziert werden. Dazu zählen Krebsarten wie das Mamma Carcinom, das Melanom, sowie Bauchspeicheldrüsen-, Eierstock-, Nieren- und Leberkrebs (Pflugfelder, 2009). In Zellkultur Experimenten konnte gezeigt werden, dass TBX2, welches als transkriptioneller Repressor gilt, dabei vermutlich die zelluläre Seneszenz unterdrückt, indem es während der Mitose in den Zellzyklus eingreift und dort den Cyklin Kinase Inhibitor CDKN2A herunterreguliert (Bilican and Goding, 2006; Jacobs et al., 2000). Normalerweise häuft sich dieser Inhibitor mit zunehmender Zellteilungszahl an. Für TBX3 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass es einen immortalisierenden Effekt auf Fibroblasten von Mausembryonen hat (Carlson et al., 2001).

Neben diesen Effekten, die einen Einfluss von TBX2/3 auf den Zellzyklus beinhalten, wird auch eine Rolle dieser Proteine bei der metastatischen Aktivität diskutiert. Dies wurde zum Beispiel bei metastatischen Formen von Gebärmutterhalskrebs entdeckt (Lyng et al., 2006). Gestützt wird diese These auch durch Untersuchungen, die ergaben, dass E-Cadherin, ein Adhäsionsmolekül, durch TBX3 reprimiert wird und somit zur Invasivität in Melanoma Gewebe beiträgt (Rodriguez et al., 2008). Bisher unveröffentlichte Ergebnisse von J. Shen und G. Pflugfelder weisen ebenfalls daraufhin, dass E-Cadherin in der Flügelimaginalscheibe von *Omb* reprimiert werden kann. Überexpression von *Omb* konnte erhöhte Motilität einzelner Zellen auslösen. Mit diesen Ergebnissen gewinnen die beiden Gene *Tbx2* und *Tbx3* an Bedeutung für die Entwicklung geeigneter Krebstherapien.

Um den Einfluss von TBX Proteinen auf die Zellmotilität *in vivo* zu testen, wurden von A. Legler (Legler, 2010) *Drosophila*-Expressionskonstrukte für *omb*, *Tbx2/3* und *Tbx5* hergestellt. Wie sich später herausstellte, enthielten die Konstrukte für *omb* und *Tbx5* Mutationen, die eine korrekte Proteinbiosynthese nicht erlaubt hätten. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die defekten Expressionskonstrukte zu reparieren.

### 1.3 Neue *omb* Mutationen

In Anbetracht der Bedeutung der *Tbx2/3* Gene für die Erforschung wichtiger Krankheiten wie z.B. Krebs war es ein Teil dieser Arbeit mehr über die Funktion von *omb*, als dem nächsten Verwandten in *Drosophila*, zu erfahren. Dazu sollten mehrere neue *omb* Mutationen kartiert werden, um Aminosäurereste innerhalb von

Proteindomänen zu identifizieren, die für den lebenden Organismus wichtig sind. Nicht zuletzt geschah dies auch aufgrund der Tatsache, dass bisher nur sehr wenige Mutationen für TBX3 und keine für TBX2 bekannt sind (Bamshad et al., 1999; Bamshad et al., 1997; Bongers et al., 2004; Meneghini et al., 2006; Sasaki et al., 2002). Vorausgegangen für die Untersuchungen hier waren eine Ethyl-Methyl-Sulfonat (EMS) Mutagenese von Herrn Pflugfelder zur Herstellung neuer *omb* Mutationen und erste molekulare und funktionelle Analysen von Dr. A. Sen (Sen, 2006). Zusammen mit dieser Arbeit wurden in *omb* drei *missense* und eine *nonsense* Mutation charakterisiert, die Aminosäurereste betreffen, welche in allen TBX Proteinen konserviert sind. Dies legt nahe, dass es sich dabei um lebenswichtige Proteinabschnitte der entsprechenden Spezies handeln könnte.

#### 1.4 Zielgene von Omb

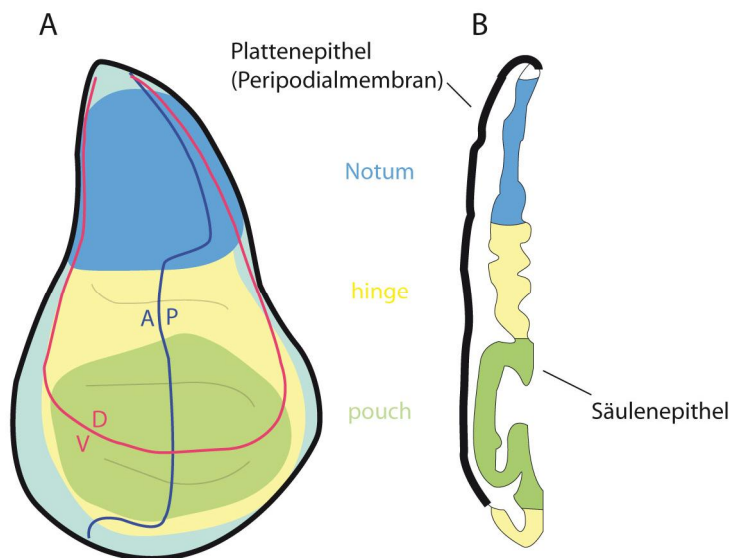
Aussagen über die Funktion eines Transkriptionsfaktors wie Omb lassen sich noch besser treffen, wenn man auch seine Zielgene kennt. Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand darin Zielgene von Omb zu finden. Einige Kandidaten wurden bereits beschrieben, aber bisher konnte für keines dieser Gene eine direkte transkriptionelle Regulation durch Omb gezeigt werden. Von Omb weiß man zum Beispiel, dass es für die Vermittlung einiger Dpp-Funktionen in der Flügelimaginalscheibe verantwortlich ist. Dazu zählt die Aktivierung von *spalt (sal)* und *vestigial (vg)* und die Repression von *thickveins (tkv)* und *master of thickveins (mtv)* (del Alamo Rodriguez et al., 2004). Ob diesen Einflüssen direkte Interaktionen mit entsprechenden Enhancern zugrunde liegen ist noch nicht untersucht worden. Es scheint zumindest klar zu sein, dass Omb bei der Kontrolle von Dpp Zielgenen eine Schlüsselrolle übernimmt. Für eine direkte Interaktion von Omb mit einem Zielgen ist nach bisheriger Auffassung die Bindung an ein regulatorisches TBE erforderlich (siehe 1.1). Von Redmond et al. (2010) wurde allerdings erstmals beschrieben, dass TBX2 auch als Corepressor ohne direkte DNA-Bindung fungieren könne. In der vorliegenden Arbeit wurde aber nach Zielgenen gesucht, die einer konventionellen Tbx-Kontrolle unterliegen und daher phylogenetisch konservierte TBEs enthalten sollten.

## 1.5 Imaginalscheiben als Untersuchungsobjekt

*Drosophila melanogaster* ist ein holometaboles Insekt. Tiere dieser Insektengruppe durchlaufen eine vollständige Metamorphose von der Larve über eine Puppe bis zum ausgewachsenen Insekt (Imago). Die Larve stellt ein Zwischenstadium in der Entwicklung vom Ei bis zum adulten Tier dar. Während des Embryonalstadiums entstehen aus Einstülpungen der Körperwand die sogenannten Imaginalscheiben, welche die Anlagen der späteren Körperanhänge, wie z.B. der Beine, sind.

Diese Arbeit befasst sich zu einem Teil mit der Regulation von Genen, die während der Larvalentwicklung in den Imaginalscheiben exprimiert werden. Die Genregulation trägt letztlich zu der Musterbildung bei, die für die Entwicklung zum erwachsenen Tier wichtig ist. Der Vorteil der Imaginalscheiben als Modell für die Untersuchung einer komplexen Genkombinatorik, wie sie in allen übrigen Geweben auch zu finden ist, liegt in ihrem abgeschlossenen System. Es handelt sich innerhalb des Larvenkörpers um fast völlig separierte Bereiche, die im Vergleich zudem relativ klein und somit „überschaubar“ sind. Als Folge dieser Beschaffenheit können sie vergleichsweise einfach identifiziert und präpariert werden (Whittle, 1990). Das Hauptaugenmerk liegt in dieser Arbeit vor allem auf der Flügelimaginalscheibe. Diese ist mit der Augenimaginalscheibe die größte und am besten erforschte. Neue Ergebnisse sollten sich also gut in den Kontext einordnen lassen können.

Die Flügelimaginalscheibe besteht aus einem zweischichtigen Epithel (**Abbildung 1.2**). Die dünnere der beiden Schichten wird als Plattenepithel (*squamous layer*) bezeichnet und die dickere als Säulenepithel (oder Hauptepithel, *columnar layer*). Die Namen beziehen sich dabei auf die Form der Zellen, die beide Schichten bilden. Welches die molekularen Grundlagen sind, die zur Formation der morphologisch unterschiedlichen Epithelien führen, ist noch nicht genau bekannt. Das Morphogen Dpp und der Transkriptionsfaktor Omb scheinen bei der Formgebung der säulenartigen Zellen des Hauptepithels eine Rolle zu spielen. Für beide Proteine konnte gezeigt werden, dass ihr Verlust zu einer Verkürzung verbunden mit einer basalen Extrusion der Zellen des Hauptepithels führen kann (Gibson and Perrimon, 2005; Shen, 2008; Shen and Dahmann, 2005).



**Abbildung 1.2 Schematische Darstellung einer Flügelimaginalscheibe des L3 Larvenstadiums.**

**A, B** Die farblichen Flächen markieren Regionen (Notum, *hinge*, *pouch*) aus denen später die Schulterregion, die Flügelgelenksregion und das Flügelblatt entstehen. **A** Aufsicht auf eine Flügel-scheibe. Die Scheibe ist in Kompartimente unterteilt. Die dunkelblaue Linie ist die Grenze zwischen anteriorem (A) und posteriorem (P) Kompartiment. Die rote Linie ist die Grenze zwischen dorsalem (D) und ventralem (V) Kompartiment. **B** Längsquerschnitt durch eine Flügel-scheibe. Die Scheibe besteht aus zwei Zellschichten (Epithelien). Das dünne Plattenepithel wird von flachen Zellen gebildet. Das dickere Epithel besteht aus säulenförmigen Zellen. Zwischen den Zellschichten liegt ein extrazellulärer Raum. (Abbildung verändert nach (Butler et al., 2003))

Für die Musterbildung der Flügel-scheibe und die spätere Entwicklung von Flügelstrukturen ist die Festlegung einer anterior-posterioren (A/P) und einer dorso-ventralen (D/V) Achse notwendig. Erreicht wird das mithilfe von sogenannten Selektorgenen, die schon früh in der larvalen Entwicklung in verschiedenen Kompartimenten (vgl. **Abbildung 1.2 A**) exprimiert werden und so deren weitere Schicksale festlegen (Garcia-Bellido and Santamaria, 1972). Zu ihnen gehören zum Beispiel die Gene *en/inv*, die innerhalb des posterioren Kompartiments exprimiert werden. Alle Zellen, die sich später in dieser Region entwickeln, erhalten eine posteriore Identität. Solche kompartiment-spezifischen Identitäten führen dazu, dass sich nur die Zellen eines Kompartiments gegenseitig erkennen und miteinander segregieren. Als Folge daraus entstehen wiederum Grenzen zwischen den Kompartimenten, die gleichzeitig als Signalzentren fungieren. Ihre Signalmoleküle tragen maßgeblich zur Proliferation und zur weiteren Musterbildung der Scheibe bei

(Brook et al., 1996; Teleman et al., 2001; Vincent and Briscoe, 2001). Eines davon ist das bereits erwähnte Morphogen Dpp.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit benutzten Laborchemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Roth, Sigma-Aldrich, Biochemika, USB bezogen.

#### 2.1.2 Enzyme

##### 2.1.2.1 Restriktionsendonukleasen

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

##### 2.1.2.2 Weitere Enzyme

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

T4 DNA Ligase	Invitrogen
RNase A	AppliChem
DNaseI	Promega
T4 Polynucleotide Kinase	NEB
Phusion Polymerase	NEB
Pfu Ultra DNA Polymerase	Stratagene
Taq Polymerase	QIAGEN
T3 RNA Polymerase	Roche
T7 RNA Polymerase	Roche
SP6 Polymerase	Roche
Platinum Pfx DNA Polymerase	invitrogen
Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas

Bacterial Alkaline Phosphatase	invitrogen
Antarctic Phosphatase	NEB
Gateway LR Clonase Enzyme Mix	invitrogen

### 2.1.3 Lösungen und Puffer

#### 2.1.3.1 Ethanolfällung

Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat (pH 7.0)
Ethanol	100% und 70%
Wasser	doppelt destilliert (Roth)

#### 2.1.3.2 Phenolextraktion

Natriumacetat Lösung	3 M Natriumacetat (pH 7.0)
MaXtract High Density	QIAGEN
Chloroform/Isopentanol Lösung	25:1 Chloroform:Isopentanol
Ethanol	100% und 70%
Wasser	doppelt destilliert (Roth)

#### 2.1.3.3 Plasmid Minipräparation (manuelle Labormethode)

P1 Puffer	(selbsthergestellt nach QIAGEN)
P2 Puffer	(selbsthergestellt nach QIAGEN)
P3 Puffer	(selbsthergestellt nach QIAGEN)
EB Puffer	10 mM Tris-Cl (pH 8.5)

#### 2.1.3.4 Gelelektrophorese

5X Stop Puffer (auch Gel-Ladepuffer)	15 % Ficoll 400; 5 % SDS; 0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol FF
10X TBE (Laufpuffer)	121,1 g Tris; 61,8 g Borsäure; 19,6 g

	Na <sub>2</sub> EDTA; auf 2 L mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
Agarosegele	0,6% - 0,8% in 1X TBE
Färbelösung	8-10 Tropfen wässriger Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) in 500 ml dH <sub>2</sub> O
Mass Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas

### 2.1.3.5 Medien

#### *Drosophila*-Standardmedium

LB Medium	25 g/L dH <sub>2</sub> O (autoklaviert)
Agar-Platten	15 g Agar in LB Medium (autoklaviert)
S.O.C. Medium	invitrogen
Carbenicillin	50 µg/ml oder 100µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml

### 2.1.3.6 X-Gal Färbung

10X PBS	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>
Fixierlösung	0,1 M NaCacodylat Puffer (pH 7,3) 0,75 % Glutaraldehyd
Färbelösung	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 10X PBS

	50 µl 1M MgCl <sub>2</sub> 42 ml ddH <sub>2</sub> O
X-Gal Färbelösung	Färbelösung + 1/30 Vol. X-Gal-DMF- Stammlösung (8%ig)
Glycerol	50% und 70% Glycerol in 1X PBS

### 2.1.3.7 Herstellung von RNA Sonden

H <sub>2</sub> O-DEPC	dH <sub>2</sub> O + 0,1% DEPC (Inkubation über Nacht (Abzug) + autoklaviert)
Ethanol-DEPC	70%ig
LiCl-DEPC	4 M
EDTA-DEPC	200 mM

### 2.1.3.8 Sichtbare *in situ* Hybridisierung

H <sub>2</sub> O-DEPC	dH <sub>2</sub> O + 0,1% DEPC (Inkubation über Nacht (Abzug) + autoklaviert)
20X SSC	0,3 M tri-Natriumcitrat und 3M NaCl in H <sub>2</sub> O-DEPC
50ml Hybridisierungspuffer B	25 ml Formamid 12,5 ml 20X SSC 12,5 ml H <sub>2</sub> O-DEPC 50 µl Tween 20
5ml Hybridisierungspuffer A	2,5 ml Formamid 1,25 ml 20X SSC 100 µl ssDNA [10mg/ml] 25 µl tRNA [10mg/ml]

	2,5 µl Heparin [100mg/ml] 1,12ml H <sub>2</sub> O-DEPC
50ml PBTween	2,5 ml 20X PBS-DEPC 47,5 ml H <sub>2</sub> O-DEPC 50 µl Tween 20
100ml AP-Detektionslösung (pH 9,5)	2 ml 5M NaCl 5 ml 1M MgCl <sub>2</sub> 10 ml 1M Tris (pH 9,5) 100 µl Tween 20 82,9 ml dH <sub>2</sub> O

### 2.1.3.9 Antikörperfärbung

PBT	1X PBS 1% BSA 0,3% TritonX
Paraformaldehyd	4%ig
50% Glycerol	in PBS

### 2.1.3.10 Antikörper

1. Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung	2. Antikörper	Spektrum	Verdünnung
α-Inv 4D9	Maus	DSHB	1/4	α-Maus	Cy3	1/250
α-βGal	Huhn	Abcam	1/1000	α-Huhn	Cy5	1/250
α-Elav	Maus	DSHB	1/500	α-Maus	dilight 488	1/500

Tabelle 2.1

### 2.1.3.11 Proteinherstellung und Aufreinigung

LB-Medium mit Glucose	LB + 0,2% Glucose
2X SDS	
IPTG	0,1 M
Column Buffer	20 ml 1 M Tris/Cl pH7,4

11,7 g NaCl  
 2 ml 0,5 M EDTA  
 0,7 ml 2-Mercaptoethanol  
 1 ml 1 M NaN<sub>3</sub>

### 2.1.3.12 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) für EMSA

4% Trenngel

7,5 ml 1X TBE  
 5,47 ml dH<sub>2</sub>O  
 1,5 ml 40% Acrylamid  
 300 µl Glycerin  
 225 µl 10% APS  
 15 µl TEMED

### 2.1.3.13 SDS-PAGE zum Proteinnachweis

10X Elektrophoresepuffer

0,25 M Tris  
 1.92 M Glycin  
 0,035M SDS  
 pH 8,3

4X Sammelgelpuffer

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

4% Sammelgel

3 ml dH<sub>2</sub>O  
 1,25 ml 4X Sammelgelpuffer  
 667 µl 30% Acrylamid  
 50 µl 10% APS  
 5 µl TEMED

4X Trenngelpuffer

1,5 M Tris  
 0,4 % SDS

pH 8,8

10% Trenngel

6 ml dH<sub>2</sub>O  
 3,75 ml Trenngelpuffer  
 5 ml 30% Acrylamid  
 150 µl 10% APS  
 15 µl TEMED

6X Proteinprobenpuffer

10% SDS  
 0,35 M Tris  
 34,4 % Glycerin  
 0,06 % Bromphenolblau  
 10 % Mercaptoethanol

### 2.1.3.14 Western Blot

Methanol

60 %ig

Transferpuffer

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

Coomassie Färbelösung

0,5 % Coomassie Brilliant Blue  
 40 % Methanol  
 10 % Essigsäure

Coomassie Entfärbelösung

40 % Methanol  
 10 % Essigsäure

### 2.1.3.15 EMSA

Elektrophoresepuffer

1X TBE

---

	1 % Glycerin
<i>Annealing Buffer</i>	10 mM Tris (pH 7,9) 50 mM KCl 0,2 mM EDTA
EMSA Puffer	20 mM HEPES 100 mM KCl 1 mM DTT 0,25 mM EDTA 0,01 % NP-40 1 mM MgCl <sub>2</sub> 8 % Glycerol 100 µg/ml BSA 0,1 mg/ml Poly(dI-dC)

#### 2.1.4 Kits

Hi Speed Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN
Fast Plasmid Mini Kit	eppendorf
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Quik Change II XL Site Directed Mutagenesis Kit	stratagene
DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids	Roche
pcR8/GW/TopoTA Cloning Kit	invitrogen
pCR XL Topo Cloning Kit	invitrogen
pEntry/D-Topo Cloning Kit	invitrogen



---

Long Range PCR Kit

QIAGEN

### 2.1.5 Oligonukleotide (Primer)

Alle verwendeten Primer wurden von Herrn Pflugfelder entworfen und von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Im Anhang (5.3) sind alle Primer tabellarisch aufgelistet.

### 2.1.6 Laborgeräte

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

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

#### 2.1.6.1 Mikroskope

Konfokales Laser Mikroskop TCS SP2 (Leica)

Binokular MZ 10F (Leica)

Mikroskop Axioplan 2 imaging (Zeiss)

#### 2.1.6.2 PCR Geräte

RoboCycler® Gradient 40

Stratagene®

Mastercycler Gradient

Eppendorf

#### 2.1.6.3 Gelkammern für Elektrophorese

Elektro 4

Hybaid

Sub Cell® GT

Bio-Rad

Mighty Small II S250/S260

Hoefer



66	<i>I(1)omb<sup>11</sup></i>	X	
91	<i>DocF1B-lacZ</i>	II	von Ingolf Reim, siehe <b>3.2.1.1</b>
96	<i>DocF7-lacZ</i>	III	von Ingolf Reim
104	<i>DocF10-lacZ</i>	A	von Ingolf Reim
116	<i>DocF10-lacZ</i>	A	von Ingolf Reim
120	<i>DocF3 XbaI</i>	X	von Ingolf Reim
127	<i>I(1)omb<sup>D4</sup></i>	X	
139	<i>DocF3-s1-lacZ</i>	A	von Ingolf Reim
146	<i>DocF3-s2-lacZ</i>	A	von Ingolf Reim
158	<i>DocF3-s3-lacZ</i>	A	von Ingolf Reim
162	<i>DocF3-s5-lacZ</i>	A	von Ingolf Reim
191	<i>DocF1A-lacZ</i>		von Ingolf Reim
195	<i>DocF1B-lacZ</i>		von Ingolf Reim, siehe <b>3.2.1.1</b>
196	<i>DocF2-lacZ</i>		von Ingolf Reim
197	<i>DocF3-s4-lacZ</i>	A	von Ingolf Reim
202	<i>DocF3-lacZ</i>	II	von Ingolf Reim
231	<i>DocF5-lacZ</i>	II	von Ingolf Reim
232	<i>DocF6-lacZ</i>		von Ingolf Reim
256	<i>UAS:omb2-17</i>	III	
296	<i>UAS:lacZ</i>	II	
297	<i>UAS:lacZ</i>	III	
339	<i>DocF8A-lacZ</i>		von Ingolf Reim
347	<i>DocF8B-lacZ</i>		von Ingolf Reim
405	<i>DocF9-lacZ</i>	II	von Ingolf Reim
458	<i>DocF11</i>	A	
530	<i>dpp-Gal4 K54/TM6</i>	III	
560	<i>D/V-h-lacZ</i>	X	
752	<i>ap-Gal4/CyO752</i>	II	
758	<i>I(1)omb<sup>282</sup></i>	X	(Sen et al., 2010)
927	<i>mutTBEmirr[1,7kb]-</i>	?	ektopische

	<i>lacZ</i>		Expression, vgl. <i>mirr[1,7kb]-lacZ</i>
1042	<i>l(1)omb<sup>15</sup></i>	X	(Sen et al., 2010)
1107	<i>hh[6,3kb]-1-3-Gal4</i>	III	posteriore Expression
1120	<i>hh[6,3kb]-Gal4</i>	III	posteriore Expression
	<i>inv[5,3kb]-7-1a-lacZ</i>	III	späte Expression in L3
	<i>inv[5,3kb]-2-2-lacZ</i>	III	keine Expression
	<i>mirr[5,6kb]-2-2-lacZ</i>	X	
	<i>mirr[5,6kb]-3-1a-lacZ</i>	III	Mirr ähnliche Expression
	<i>mirr[5,6kb]-4-2-lacZ</i>	III	Mirr ähnliche Expression
	<i>mirr[5,6kb]-6-2-lacZ</i>	III	Mirr ähnliche Expression
	<i>mirr[5,6kb]-7-2-lacZ</i>	?	?
	<i>mutTBE mirr[5,6kb]-1-1-lacZ</i>	X	keine Expression
	<i>mutTBE mirr[5,6kb]-3-2a-lacZ</i>	III	keine Expression
	<i>mutTBE mirr[5,6kb]-3-2b-lacZ</i>	III	keine Expression
	<i>mutTBE mirr[5,6kb]-4-2a-lacZ</i>	III	keine Expression
	<i>mirr[1,7kb]-1-2b-lacZ</i>	III	Mirr ähnliche Expression
	<i>Drop[1,7kb]-Gal4</i>	II, 58A	peripodial
	<i>Drop[4,8kb]-Gal4</i>	II, 58A	peripodiale und posteriore Expression
	<i>retn[5,8kb]-1-1b-lacZ</i>	II	keine Expression

	<i>shf[4,3kb]-1-2a-lacZ</i>	X	keine Expression
	<i>shf[4,3kb]-2-1-lacZ</i>	III	keine Expression
	<i>tenm[5,8kb]-2-1-lacZ</i>	II	reproduzierbares Muster, schwach
	<i>tenm[5,8kb]-3-2-lacZ</i>	X	reproduzierbares Muster, schwach
	<i>tkvB[3kb]-Gal4</i>	II, 53B2	keine Expression
	<i>vvf[6,3kb]-1-1-lacZ</i>	III	keine Expression
	<i>vgQE[1kb]-2-2-Gal4</i>	II, 58A	QE Expression
	<i>mutTBEvgQE[1kb]- 1-1-Gal4</i>	II, 58A	QE Expression
	<i>enhTBEvgQE[1kb]- 1-1-Gal4</i>	II, 58A	?

Tabelle 2.2

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Trägt man DNA-Fragmente auf ein Agarose- oder Polyacrylamidgel auf, lassen sie sich im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Größe auftrennen. Fragmente zwischen 100bp und 20kb lassen sich in Agarosegelen mit einem Agaroseanteil von 0.6% - 2% trennen (Maniatis, 1982). Möchte man aber kleinere Fragmente auftrennen, werden Gele mit bis 5% Agarosenanteil oder Polyacrylamidgele notwendig. In der Regel werden Polyacrylamidgele dazu benutzt DNA von einer Größe mit weniger als 1 kb zu trennen (Maniatis, 1982). Die hier verwendeten Gele wurden mit 1 X TBE-Puffer angesetzt, der auch als Laufpuffer diente. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente im Gel, wurden diese in der Färbelösung, die Ethidiumbromid enthält, „gefärbt“. Dabei interkaliert Ethidiumbromid zwischen den Basen der DNA. Unter UV-Licht lassen sich die DNA-Banden aufgrund der Fluoreszenz des Ethidiumbromids in dieser Wellenlänge sichtbar machen und photographieren.

Von Molekulargewichtsstandards, die zu Beginn mit auf die Gele aufgetragen wurden, ließ sich auf die Größe der zu trennenden DNA-Fragmente schließen.

#### **2.2.1.1 Gelextraktion**

Für manche Klonierungsschritte ist es notwendig, bestimmte DNA-Fragmente aus einem Gemisch zu isolieren. Ein in dieser Arbeit häufig angewendetes Verfahren der Isolierung von DNA ist die Gelextraktion. Dabei wurden DNA Banden, die von Interesse sind, aus einem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN gereinigt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die Agarosepolymere des ausgeschnittenen Gelstückes in einem Puffer (QG), der eine hohe Konzentration eines chaotropen Salzes enthält, gelöst werden und DNA bindende Proteine von den DNA-Fragmenten dissoziieren. Dadurch wird die gewünschte DNA in diesem Gemisch isoliert und kann durch das Binden an eine Silica-Gel-Membran von den übrigen Bestandteilen des Gemisches, die nicht an diese Membran binden, getrennt werden.

### 2.2.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*)

Für den Nachweis von Proteinen in einer Probe (siehe **Abbildung 3.3**) wurden 10%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Bei der SDS-PAGE werden Proteine im elektrischen Feld, ähnlich der Agarose-Gelelektrophorese, nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Dies geschieht, da sich negativ geladene SDS Moleküle (anionische Tenside) proportional zur Größe und somit zum Gewicht der Proteine an diese anlagern und ihnen eine negative Ladung verleihen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel wurden Proteinproben mit einem SDS-Probenpuffer versetzt und auf 95°C erhitzt. Das führte dazu, dass die Proteine denaturieren.

### 2.2.3 Western Blot

Die hier durchgeführten Western Blots dienen dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen spezifischer Größe von einem Polyacrylamidgel auf eine dafür vorgesehene Nylonmembran (Boehringer Mannheim). Dabei wird von nativen Proteinen, die zuvor auf 4%igen Polyacrylamidgelen (ohne SDS, 4°C) aufgetrennt wurden, durch ein halbtrockenes Blotverfahren (Biometra Fastblot B33, 4°C) ein identischer Abdruck auf der Nylonmembran erzeugt. Das halbtrockene Blotverfahren zeichnet sich durch seine Schnelligkeit (30 Minuten bei 300mA) im Transfer der Proteine aus.

Die genaue Vorgehensweise ist der Bedienungsanleitung des Fastblots B33 (Biometra) zu entnehmen.

### 2.2.4 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)

Der EMSA ist eine Methode zur Untersuchung von Protein-DNA oder Protein-RNA Interaktionen. Hier wurden in einem 4% Polyacrylamidgel aufgetrennte und durch einen Western Blot auf eine Nylonmembran transferierte, native Proteine, auf ihre Fähigkeit DNA-Zielsequenzen gebunden zu haben, getestet. In dieser Arbeit sollte mit Hilfe des EMSAs herausgefunden werden, ob MBP-OmbT Fusionsproteine dazu in der Lage sind (siehe **Abbildung 3.4**). Die zu untersuchende DIG (Digoxigenin) markierte Ziel-DNA wurde mit *anti-DIG*-Antikörpern (*alkaline-phosphatase* gekoppelt)

detektiert und in einer Lichtreaktion sichtbar gemacht. Im Fall der DNA-Bindung der Fusionsproteine kommt es während der PAGE im Vergleich zur Kontrollprobe, die nur die markierte DNA enthält, zu einem sogenannten „*Bandshift*“. Das bedeutet, dass man hier neben der ungebundenen DNA-Bande, die man auch in der Kontrolle findet, eine weitere detektiert, die aufgrund des größeren Protein-DNA Komplexes im Polyacrylamidgel langsamer gelaufen ist.

Für die entsprechende Ziel-DNA Probe wurden einzelsträngige DIG markierte Oligonukleotide in einer Reaktion (5min im 100°C Wasserbad, auf RT abkühlen) miteinander *annealed* [10pmol/µl *Annealingbuffer*]. In der anschließenden Bindungsreaktion wurden Fusionsproteine und doppelsträngige Oligonukleotide in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Dazu wurde 500ng Protein erst alleine in 10µl EMSA Puffer für 15 Minuten bei 15°C inkubiert und dann nach Zugabe von 110ng Oligonukleotiden eine weitere Stunde.

### **2.2.5 Präparation von L3 Larven**

In dieser Arbeit wurde die transkriptionelle Aktivität von regulatorischen Genabschnitten in L3 Imaginalscheiben untersucht. Zu diesem Zweck mussten transgene L3 Larven so präpariert werden, dass ihre Imaginalscheiben in direkten Kontakt mit der verwendeten Färbelösung kam. Dies geschieht, indem man sie mit zwei Pinzetten in der Mitte packt und zu einem vorderen und einem hinteren Teil auseinanderreißt. Dabei dürfen die inneren Organe nicht aus den beiden Teilen herausgerissen werden. Als nächstes greift man mit einer Pinzette den vorderen Teil, der Flügel-, Bein- und Augen-Antennen-Imaginalscheiben enthält, mittig, ohne ihn ganz zusammen zu drücken. Mit der Spitze der zweiten Pinzette drückt man dann das Vorderende der Larve von vorne in sie hinein und schließlich durch die halbgeschlossene Spitze der Pinzette, die die Larve hält, hindurch. Dadurch wird die Larvenhälfte umgestülpt und die vorher innenliegenden Imaginalscheiben gelangen nach außen.



### 2.2.6 X-Gal Färbung von L3 Imaginalscheiben

Die unter 2.2.5 beschriebenen, präparierten Larven werden bei dieser Färbemethode erst in Fixierlösung für 15 Minuten auf einem Kippschüttler fixiert. Auf dem gleichen Schüttler spült man sie dann 3 mal für 5 Minuten mit 1X PBS. In der Zwischenzeit wird die X-Gal-Färbelösung bei 37°C für 5 Minuten inkubiert und anschließend 5 Minuten zentrifugiert. Nun werden die Larven über Nacht in der X-Gal-Färbelösung im Dunkeln ohne Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen werden sie dann wie oben beschrieben 1X PBS gespült und bevor sie schließlich in 70% Glycerol/PBS überführt werden noch für mindestens 1 Stunde in 50% Glycerol/PBS inkubiert. Die so gefärbten Imaginalscheiben lassen sich unter einem Binokular bei ca. 50 facher Vergrößerung mit zwei sehr dünnen Nadeln abpräparieren und werden für die Auswertung am Mikroskop eingedeckelt.

### 2.2.7 Herstellung von RNA-Sonden

Durch einen Restriktionsverdau werden cDNA enthaltende Plasmide (EST-Klone) linearisiert und gereinigt. In einer *in vitro* Transkriptionsreaktion unter Verwendung einer T3-, T7- oder SP6-Polymerase und eines *DIG RNA Labelling Mixes* (Roche) wird dann eine antisense RNA hergestellt. Ein nun folgender DNaseI Verdau gefolgt von einer Zugabe EDTA-Lösung zerstört die DNA-Matrize und bringt die Polymerasereaktion zum Erliegen. Eine letzte ethanolische Fällung unter Verwendung von 4M LiCl (statt 3M NaAc) reinigt die hergestellte Sonde, die jetzt im Stande ist in entsprechenden Gewebsregionen an die *in vivo* synthetisierte mRNA zu binden.

Im Folgenden ist eine solche *in vitro* Transkription und anschließende Aufreinigung exemplarisch dargestellt.

14µl Restriktionsverdau eines EST-Klons (~1800ng)

2µl 10X Transkriptionspuffer (Roche)

2µl 10X *DIG Labelling Mix* (Roche)

2µl Polymerase

0,5µl RNase Inhibitor

Inkubation für 2 Stunden bei 37°C.

Zugabe von 2µl DNaseI (Promega)

Inkubation für 15 Minuten bei 37°C.

Zugabe von 2,5µl 4M LiCl-DEPC und 70µl 100% ETOH

Inkubation über Nacht bei -20°C.

Zur Überprüfung der Sonden und zur Bestimmung der geeigneten Verdünnung wurden Tüpfeltests nach dem Protokoll *DIG Luminescent Detection Kit* (Roche) durchgeführt.

### **2.2.8 Sichtbare *in situ* Hybridisierung (*in situ*)**

Für die *in situ* wurden L3 Larven, wie unter 2.2.5 beschrieben, präpariert und ihnen anschließend alle Fettkörper entfernt. Alle weiteren Schritte sind dem folgenden Labor-Protokoll zu entnehmen:

#### **Tag 1:**

- Präparierte Larven für 10 min (bei Imaginalscheiben, für Gehirne 30 min) in 4% Formaldehyd bei RT fixieren
- 1x kurz waschen in MeOH
- Larven in MeOH bei -20°C aufbewahren

*Ab hier alle Lösungen mit DEPC-H<sub>2</sub>O !*

#### **Tag 2:**

- 5 min waschen in 50% MeOH (500µl MeOH / 500µl PBTween)
- 2x 5 min waschen in PBTween
- 20 min Nachfixierung in 1ml PBTween + 140µl 37% Formaldehyd
- 2x 5 min waschen in PBTween
- 5 min waschen in DEPC-H<sub>2</sub>O
- 60 min in 1ml TEA-Puffer (1,2M Triethanolamine, pH 7,0, Sigma) + 2,5µl Acete Anhydrid
- 2x 5 min waschen in PBTween
- *Ab hier ohne schütteln*

- 5 min waschen in PBTween / Hyb B 1:1 (500µl PBTween / 500µl Hyb. B)
- 5 min waschen in Hyb B
- Prähybridisierung für 4 h in Hyb A bei 65°C
- Sonde 1:100 (je nach Sonde, ca. 80µl pro cap ist ausreichend) in Hyb A, 2 min 100°C, sofort auf Eis, dann zu den Larven geben, über Nacht bei 65°C

### Tag 3:

*Sonde aufheben bei -20°C*

- Bei 65°C (mit vorgewärmten Lösungen):
- 15 min Hyb B
- 15 min Hyb B / 25% 2x SSC
- 15 min Hyb B / 50% 2x SSC
- 15 min Hyb B / 75% 2x SSC
- 15 min 2x SSC
- 2x 20min 0,2xSSC

*Ab hier wieder mit schütteln möglich*

Bei RT:

- 10 min waschen in 0,2x SSC / 25% PBTween
- 10 min waschen in 0,2x SSC / 50% PBTween
- 10 min waschen in 0,2x SSC / 75% PBTween
- 10 min waschen in PBTween
- Zugabe von a-dig-AP mouse Fab-Fragments 1:1000 in PBTween (oder a-Fitc-AP 1:500) für 2h bei RT
- 3x spülen, 4x 10' waschen mit PBTween
- 2x 5' mit H<sub>2</sub>O-DEPC waschen
- Färbung mit NBT/BCIP (Roche)
- Färbung unter Bino beobachten
- 3x mit PBTween spülen
- 10 min in Methanol waschen (Abstoppen der Reaktion)
- 3x spülen mit PBTween
- 1x spülen mit PBS
- in 70% Glycerol einbetten

## 2.2.9 Antikörperfärbung

Für die Antikörperfärbung von L3 Imaginalscheiben wurde folgendes Labor-Protokoll verwendet:

- Präparation von L3 Larven wie unter 2.2.5. in eiskaltem PBT/BSA

*Sofern nicht anders angegeben alle weiteren Schritte auf einem Horizontal-Kippschüttler bei RT:*

- Fixierung in 4% Paraformaldehyd
- 3x mit PBT/BSA spülen (ohne schütteln)
- 1h in PBT/BSA waschen
- PBT/BSA ganz entfernen und mit 1. Antikörper ü.N. bei 4°C inkubieren
- 1. Antikörper entfernen (und aufbewahren)
- 3x mit PBT/BSA spülen (ohne schütteln)
- 1h mit PBT/BSA waschen
- PBT/BSA ganz entfernen und 1h mit 2. Antikörper inkubieren (lichtgeschützt)
- 3x mit PBT/BSA spülen (ohne schütteln)
- 1h mit PBT/BSA waschen
- PBT/BSA entfernen und Imaginalscheiben in 50% Glycerol/PBS auf einem Objektträger präparieren und eindeckeln
- bei -20°C bis zu 3 Monate haltbar (kürzer auch bei 4°C)

## 2.2.10 Enzymreaktionen

### 2.2.10.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, mit deren Hilfe sich DNA in genau definierte Stücke schneiden lässt. Sie erkennen spezifische Sequenzen innerhalb der DNA und erzeugen dort oder in deren Nähe Doppelstrangbrüche. Dabei können überhängende oder glatte Enden entstehen, wobei überhängende Enden eine spätere Ligation erheblich erleichtern. In dieser Arbeit wurden ausschließlich solche Enzyme (siehe 2.1.2.1) verwendet, die überhängende Enden innerhalb ihrer Erkennungssequenz produzieren. Die optimalen Reaktionsbedingungen finden sich in den entsprechenden Gebrauchsanweisungen der Hersteller.

Im Folgenden ist ein Standardansatz für einen Restriktionsverdau gegeben, wie er hier gewöhnlich durchgeführt wurde:

< 5 µl	DNA
2 µl	10 X Enzym Puffer
1 µl	Restriktionsenzym

mit dd H<sub>2</sub>O auf 20 µl auffüllen.

### 2.2.10.2 Ligation

Die überhängenden (kohäsiven) Enden einer DNA, die mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten wurde, sind zueinander komplementär. Diese Enden können in einer Ligationsreaktion mit Hilfe einer Ligase (siehe 2.1.2.2) auch wieder zusammengefügt werden. Dadurch wird es möglich, DNA unterschiedlicher Herkunft miteinander zu kombinieren, sofern sie passende Enden besitzen. Das gleiche gilt für DNA, die mit einem Restriktionsenzym glatt geschnitten wurde, so dass „*blunt ends*“ entstehen.

In der Regel wird ein zu klonierendes DNA-Fragment mit einem Vektor in einem molaren Verhältnis von 1.3 bis 1.7 ligiert, um ein ringförmiges DNA Molekül (Plasmid) herzustellen. Nur innerhalb eines solchen Plasmids kann das gewünschte DNA-Fragment von Bakterien, während der Transformation (siehe 2.2.13), stabil aufgenommen und schließlich von diesen in großen Mengen hergestellt werden.

Um eine Selbstligation des Vektors während einer Ligationsreaktion weitgehend zu vermeiden, wird der Vektor vorher mit einer Phosphatase (siehe 2.2.10.3) behandelt. Die Phosphatase bewirkt eine Dephosphorylierung der freien Enden des Vektors und verhindert so deren Religation.

Standardmäßig wurde mit folgendem Ligationsansatz gearbeitet:

ca. 10 µl	DNA aus Restriktionsverdau (davon max. 50ng Vektor DNA)
4 µl	5 X T4 DNA Ligase Puffer (Invitrogen)
1 µl	T4 DNA Ligase (Invitrogen)

mit dd H<sub>2</sub>O auf 20 µl auffüllen.

Inkubiert wurde über Nacht bei 18 °C.

### 2.2.10.3 Dephosphorylierung

Die Phosphatasereaktion wurde ausschließlich mit Plasmiden durchgeführt. Dabei sollten unter Verwendung z.B. der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) oder der Antarctic Phosphatase (AP) die Enden der linearisierten Plasmide dephosphoryliert werden, um deren Religation zu verhindern.

Im Folgenden wird ein Beispiel für die SAP und die AP gezeigt:

#### **SAP:**

20 µl                                      Restriktionsverdauansatz

1 µl                                         SAP

Inkubiert wurde 30 min bei 37 °C.

#### **AP:**

20 µl                                      Restriktionsverdauansatz

1 µl                                         AP

3 µl                                         10 X AP-Puffer

mit dd H<sub>2</sub>O auf 30 µl auffüllen.

Inkubiert wird 30 min bei 37 °C.

Inaktiviert wird 5 min bei 65 °C.

### 2.2.11 Ethanolfällung

Für die weitere Verwendung von DNA, beispielsweise nach einer Enzymreaktion, ist es sinnvoll sie durch eine Ethanolfällung zu reinigen. Dabei wird die DNA Lösung von Salzen und Proteinen befreit. Durch die Zugabe von 1/10 des Volumens an 3 M NaAc Lösung (falls nicht anders angegeben) und dem 2,5 fachen Volumen an Ethanol (abs.) fällt die DNA während der 30 minütigen Inkubation bei -20 °C aus. In einer weiteren 30 Minuten dauernden Zentrifugation bei 4 °C lässt sich die DNA pelletieren. In einem letzten Schritt wird mit 500 ml 70%igem Ethanol zentrifugiert.

Nachdem das Pellet ausreichend getrocknet wurde (ca. 8 min) kann die DNA in 30 µl EB-Puffer (siehe 2.1.3.3) gelöst werden.

### **2.2.12 Phenolextraktion**

Obwohl durch die Ethanolfällung der größte Teil von Salzen und Proteinen aus einer DNA Lösung entfernt werden kann, ist oftmals eine Phenolextraktion notwendig, um eine saubere DNA Lösung für Salz-empfindliche Vorgänge, wie z.B. der Transformation (siehe 2.2.13) von chemokompetenten Bakterienzellen, zu gewinnen. Als erstes gibt man die DNA Lösung auf ein Phase-Lock-Gel®-Cap (Eppendorf). Extrahiert wird durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc, 1 Volumen Phenol und 1 Volumen Chloroform/Isopentanol (24:1). Nachdem man diese Mischung gut gemischt hat wird sie bei Raumtemperatur 5 min lang zentrifugiert. Das Gel in dem verwendeten Reaktionsgefäß trennt die obere, wässrige und DNA-haltige Phase von der organischen, Phenol-haltigen Phase. Mit einer ausgezogenen Pasteurpipette kann man schließlich die DNA-Phase ohne weiteres abnehmen. Um das Phenol sicher aus dieser Lösung zu entfernen wird noch mal mit Chloroform/Isopentanol (24:1) extrahiert und bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Üblicherweise wird jetzt ein letztes Mal ethanolisch gefällt.

### **2.2.13 Transformation**

Bakterien besitzen die Fähigkeit exogene, ringförmige DNA (Plasmide) in ihr Genom zu integrieren (Transformation) und zu replizieren. Die gezielte Transformation von Bakterienzellen ist deshalb für das molekulargenetische Arbeiten ein wichtiges Instrument, um große Mengen Plasmid DNA herzustellen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich auf die Transformation durch Hitzeschock (chemische Transformation) zurückgegriffen. Dafür wurden speziell dafür vorgesehene, chemokompetente Zellen der Firmen Invitrogen, Stratagene oder NEB bezogen. Im folgenden wird Ablauf einer Transformation exemplarisch geschildert.

Nach dem Auftauen der Bakteriensuspension auf feuchtem Eis (30 min) wurde diese mit 2 bis 7 µl Ligationsreaktion inkubiert. Nach weiteren 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 1 min 30 sec bei 42 °C, bei dem die Bakterien die Plasmide

aufnehmen konnten. Als nächstes wurden die Suspension wieder für 3 min auf Eis überführt, anschließend mit SOC Medium (invitrogen) auf 500µl aufgefüllt und schließlich für 1 h auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Nun erfolgte das Ausstreichen von 30-150µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten. Den Agarplatten wurde vorher ein Antibiotikum zugefügt, das alle Bakterien sterben ließ, die nicht das gewünschte Plasmid aufgenommen hatten und somit nicht über das entsprechende Resistenzgen verfügten.

#### **2.2.14 Bakterienkultur**

Für weitere molekulargenetische Arbeiten mit DNA ist es notwendig, diese in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu haben. Transformierte Bakterienkolonien (siehe 2.2.13) wurden deshalb zur Vermehrung in LB Medium über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler kultiviert. Dem LB Medium wurde vorher, entsprechend der Resistenz der Bakterien, Antibiotikum (z.B. 50 µg/ml) zugefügt.

#### **2.2.15 Plasmidpräparation**

Zur Präparation von Plasmiden aus Bakterienzellen hielt ich mich entweder an die Anweisungen der entsprechenden Kits von QIAGEN oder an ein Laborprotokoll von Herrn Pflugfelder (siehe 2.1.3.3). In allen Fällen wurden die Puffer P1, P2 und P3 von QIAGEN benutzt. Der einzige Unterschied der manuellen Methode zu dem Verfahren der Kits besteht darin, dass die DNA nach der alkalischen Lyse der Zellen nicht mit Hilfe von Ionenaustauschersäulchen von den restlichen Bestandteilen der DNA Lösung getrennt wird. Das DNA reinigende Prinzip der manuellen Methode ist die Zentrifugation, bei der weitgehend alle Zellbestandteile von der in Lösung gebrachten DNA getrennt werden. Die manuelle Methode eignete sich besonders für schnelle Tests, wie z.B. die Analyse durch Restriktionsverdau, bei denen nur geringe Mengen an DNA notwendig waren. Allerdings reichte der durch sie gewonnene Reinheitsgrad der DNA auch für anschließende Sequenzierungen aus.



### 2.2.16 Sequenzierungen

Sequenzierungen von Plasmiden bzw. der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte wurden von der Firma *starseq* durchgeführt.

### 2.2.17 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde zur Amplifizierung bestimmter DNA Bereiche verwendet. Die Sequenz solcher DNA Bereiche wurde dabei als Vorlage für die Synthese zweier entgegengerichteter Oligonukleotid Primer benutzt, die das zu amplifizierende DNA Stück flankierten. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** aufgelistet.

Nach der Denaturierung des DNA Doppelstrangs bei einer Temperatur von 94 °C erfolgt das Anlagern der Primer (Annealing) an die Einzelstränge bei einer Temperatur, die sich im Idealfall dadurch berechnen lässt, indem man 5 °C von der Schmelztemperatur der Primer ( $T_M$ ) subtrahiert. Anschließend wird mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase, z.B. der Taq Polymerase (Qiagen), und den dNTPs ein neuer, komplementärer Strang synthetisiert (Elongation bei 72°C). Wiederholt sich ein solcher Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation mehrere Male wird der gewünschte DNA Abschnitt vervielfältigt. Jeder neu synthetisierte DNA Strang kann dabei wiederum als Matrize für einen nächsten dienen.

#### 2.2.17.1 Standard PCR

Polymerase Kettenreaktionen wurden mit den unter 2.1.2.2 aufgelisteten Polymerasen durchgeführt. Die genauen Reaktionsbedingungen finden sich in den *Manuals* der entsprechenden Hersteller. Im Folgenden ist ein Beispiel für einen PCR-Ansatz aufgeführt:

1 µl	DNA [100ng]
1 µl	Forward Primer [20µM]
1 µl	Reverse Primer [20µM]
5 µl	10X Pfu Polymerase Reaction Buffer (Stratagene)

2,5 µl	dNTPs [10mM]
1 µl	Pfu Turbo Polymerase (Stratagene)
38,5 µl	ddH <sub>2</sub> O

Je nach Versuchsziel und verwendetem PCR Gerät wurde das Programm angepasst. Im Folgenden (**Tabelle 2.3**) wird als Beispiel ein Standard PCR Programm für das Gerät Mastercycler Gradient (Eppendorf) angegeben.

Segment	Number of cycles	Temperature	Duration
1	1	95°C <sup>c</sup>	2 minutes
2	30	95°C	30 seconds
		Primer $T_m - 5^\circ\text{C}^d$	30 seconds
		72°C	1 minute for targets $\leq 1$ kb 1 minute per kb for targets $> 1$ kb <sup>e</sup>
3	1	72°C	10 minutes

**Tabelle 2.3** Standard PCR Programm (nach stratagene PfuTurbo® DNA Polymerase Instruction Manual 2006)

### 2.2.17.2 Site-Directed Mutagenesis

Diese Technik kann dazu verwendet werden, bestimmte Sequenzabschnitte eines Vektors so zu mutieren, dass einige wenige Basen durch andere neue ersetzt werden. Handelt es sich um einen proteinkodierenden Abschnitt lassen sich auf diese Weise Aminosäureaustausche erzielen. Dies ist dann sinnvoll, wenn man beispielsweise die Auswirkung bestimmter AS auf die Funktion eines Proteins untersucht (siehe 3.1.4 und 3.1.5). Andererseits kann man genauso fehlerhafte Sequenzen eines Vektors zurück mutagenisieren und somit reparieren.

Anhand der Vektorsequenz des DNA Bereiches, der die zu mutierende Sequenz enthält, wurden zwei „mutagene“ Primer synthetisiert, die beide während der Annealingphase einer PCR an diesen Bereich binden können. Die Primer wurden so entworfen, dass ein gezielter Basenaustausch zur gewünschten Mutation führen musste. Aus der Vervielfältigung der Vektor-DNA mit diesen Primern würde also eine neue, veränderte Plasmid-DNA entstehen. Vor dem weiteren Gebrauch dieser neu

hergestellten Vektor-DNA war es notwendig die Template-DNA, die sich immer noch in dem PCR-Ansatz befand, zu zerstören. Dazu benutzte man DpnI, ein Enzym, das nur methylierte DNA schneidet. Als Folge wurde die Template-DNA, die von Bakterien vervielfältigt und methyliert wurde, nicht aber die, während der PCR amplifizierte DNA geschnitten. Bei der anschließenden Transformation wurde also nur die neu amplifizierte DNA von den Bakterien aufgenommen.

### **2.2.17.3     *Megaprime* PCR**

Die *Megaprime* PCR (Tseng et al., 2008) wurde hier ähnlich der *Site Directed Mutagenesis* (siehe 2.2.17.2) als eine Technik zur Korrektur fehlerhafter Vektorsequenzen verwendet. Im Unterschied zu dieser ermöglichte sie das Ausbessern größerer Sequenzfehler eines Vektors. Voraussetzung war die Herstellung von längeren *Megaprimern* mittels einer PCR, die die fehlerhafte Sequenz korrigieren und somit in einer zweiten PCR selbst als mutagene *primer* fungieren konnten. Amplifiziert wurden diese *Megaprimer* aus einem zweiten Klon, der die zu reparierende Sequenz fehlerfrei enthielt. Das Verfahren ist auch unter der Bezeichnung *restriction free cloning* bekannt (Bryksin and Matsumura, 2010; Unger et al., 2010).

Die von Unger et al. weiterentwickelte *Megaprime* PCR Strategie ist in dieser Arbeit dazu angewandt worden zwei entfernt voneinander liegende, fehlerhafte Sequenzabschnitte eines Vektors auszubessern. Dazu wurden zwei *Primer*-Paare so entworfen, dass sie jeweils zur fehlerfreien Amplifizierung eines der beiden Abschnitte genutzt werden konnten. Beide Amplifikate sind schließlich nacheinander in zwei PCRs als *Megaprimer* für die „Remutagenese“ des Vektors eingesetzt worden.

### **2.2.17.4     *Pool* PCR**

Die *Pool* PCR wurde dazu benutzt, aus einem Pool von Bakterienkolonien, einen positiven Klon zu identifizieren, dessen aufgenommenes Plasmid die gewünschten Bestandteile enthielt.

Zur Vorbereitung wurden mehrere Kulturen mit jeweils 10 Bakterienkolonien beimpft. Bei 80 Kolonien ergibt das 8 Bakterienkultur-Pools. Zeitgleich wurden alle gepickten Kolonien zusätzlich auf eine in viele nummerierte Felder unterteilte Agarplatte ausgestrichen. Dadurch ließ sich später jeder Kolonie, die zur Beimpfung eines Bakterienkultur-Pools verwendet wurde, genau ein neu gewachsener Klon auf den Feldern der Agarplatte zuordnen. Mit Hilfe der manuellen Minipräparationsmethode wurde daraufhin die Plasmid DNA der Bakterienkultur-Pools gereinigt. Die daraus resultierenden Plasmid-DNA-Pools konnten nun einer PCR unterzogen werden. Die *primer* für diese PCR wurden so gewählt, dass sie die Insertionsstelle eines neu eingefügten oder manipulierten DNA-Stückes auf den Plasmiden flankierten. Dadurch ließ sich nach einer PCR auf einem Agaroesegel feststellen, ob eines der amplifizierten Produkte der erwarteten Größe des DNA-Stückes entsprach. Dies ergab einen Hinweis darauf, ob sich das gesuchte Plasmid, innerhalb des untersuchten Plasmid-DNA-Pools befand. Wenn dem so war, ließ sich von dem Plasmid-Pool auf den entsprechenden Bakterienkultur-Pool und von dort auf die Kolonien, die zur Beimpfung dieses Pools benutzt wurden, schließen. Dank der oben beschriebenen Agarplatte konnten nun alle Klone des Pools einzeln analysiert und somit ein positiver isoliert werden.

Die Pool-PCR Methode eignete sich besonders dann, wenn es notwendig war eine sehr große Zahl Klone hinsichtlich eines gewünschten Ligationsereignisses zu untersuchen. Die Notwendigkeit ergab sich in einem solchen Fall daraus, dass die Transformationen sowohl der Ligations- als auch der Kontroll-Ligations-Reaktion viele Kolonien ergeben hatte und deshalb die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Klon als sehr gering eingeschätzt werden musste.

### **2.2.18 Herstellung von *enhancer-reporter* Konstrukten für die Transgenese**

Zur Keimbahntransformation von *Drosophila* wurden zwei verschiedene *enhancer-reporter* Vektorsysteme benutzt. Das erste basiert auf der herkömmlichen P-Element Insertion mithilfe des Vektors *pH-Pelican* (Barolo et al., 2000), dessen *lacZ* Gen unter der Kontrolle des Hsp70 Promotors steht (). Vor der Klonierung eines solchen *pH-Pelican* Konstruktes mussten die in einer PCR zuvor hergestellten DNA-Fragmente

subkloniert werden. Dies geschah immer mithilfe des *Topo XL* Vektors (*invitrogen*, 2.1.4), unter Verwendung geeigneter Restriktionsschnittstellen.

Als zweites wurde der *Gateway (invitrogen)* kompatible *Destination* Vektor *pBPGUw (addgene)* für die Integration in das Genom verwendet. Dieser Vektor enthält statt eines Reportergens eine *Gal4* Kasette, die von einem *Drosophila synthetic Core Promotor* kontrolliert wird. Ein Vorteil des *pBPGUw* gegenüber dem *pH-Pelican* ist, dass er eine gerichtete Integration in das Genom vermittelt, die auf einer Rekombination zwischen Erkennungssequenzen des Vektors (*attB*) und eines dafür vorgesehenen Fliegenstammes (*attR-Linie*) beruht. Ein weiterer Vorteil ist die restriktionsfreie Klonierung der zu untersuchenden DNA-Fragmente. Dies betrifft sowohl die Aufnahme des PCR-Produkts durch den hier verwendeten Subklonierungsvektor *pCR8/GW/Topo/TA (invitrogen, 2.1.4)*, als auch den anschließenden Klonase katalysierten Transfer des Fragments in den *Destination* Vektor.

### **2.2.19 Transgenese**

Die Herstellung transformanter Fliegen mittels Mikroinjektionsverfahren wurde von den Firmen *Rainbow Transgenic Flies* und *BestGene* durchgeführt.

### **2.2.20 Fliegenhaltung**

*Drosophila* wird auf Standardnährböden in Plastikröhrchen gehalten, die durch luftdurchlässige Stopfen verschlossen sind. Die Lagerung von Stammsammlungen erfolgt bei 18°C und die von Kreuzungen bei 25°C. Die Generationszeit von Fliegen bei 25°C beträgt in der Regel 10-11 Tage, bei einer Haltung auf 18°C kann mit einer Verdopplung der Generationszeit gerechnet werden. Kontaminationen des Futterbreis und der Gläschen mit Milben und Schimmelpilzen lassen sich durch regelmäßiges Umsetzen auf neue Gläschen verhindern. Dies sollte bei 25°C alle 2 Wochen und bei 18°C alle 3-4 Wochen geschehen.



F1-Generation:

$w\ omb[D4]/w\ h-lacZ; CyO/II$        $FM7c/Y; CyO/II, \dots$

2)  $w, omb[D4]/w, h-lacZ; CyO/II$     X       $FM7c/Y; CyO/II$

F1-Generation:

$w, omb[D4]-h-lacZ/FM7c$  (rekombinant)

$w/FM7c$  (reziprok rekombinant)

$w, omb[D4]/FM7c$  (parental)

$h-lacZ/FM7c$  (parental)

3) Orangene Weibchen werden einzeln mit  $FM7c/Y$  verkreuzt.

a)  $h-lacZ/FM7c$       X       $FM7c/Y$

F1-Generation:  $h-lacZ/Y$  (lebensfähige  $B^+$  Männchen)

b)  $w, omb[D4]-h-lacZ/FM7c$     X       $FM7c/Y$

F1-Generation:  $FM7c/Y$  (keine lebensfähigen  $B^+$  Männchen)

### 2.2.21.3 Identifikation transgener Fliegen

Embryonen, die dem herkömmlichen P-Element Mikroinjektionsverfahren unterzogen wurden (im Weiteren als G0 Fliegen bezeichnet), werden nach dem Schlüpfen mit  $w$  Fliegen (weißäugig) verkreuzt. In der F1-Generation erkennt man transgene Fliegen an ihrer orangenen bis roten Augenfarbe, die auf das in P-Elementen enthaltene *white* ( $w$ ) Gen zurück zu führen ist. Zur Bestimmung der Lokalisation des P-Elementes und zur Herstellung stabiler Stämme werden diese Tiere dann balanciert (2.2.21.4)

### 2.2.21.4 Balancer-Kreuzungen

Balancerchromosomen sind Chromosomen, die die Möglichkeit zur Rekombination mit ihren homologen Chromosomen aufgrund künstlich eingefügter Inversionen verloren haben. Sie tragen rezessiv letale Merkmale, sodass nur heterozygote Tiere überleben können. Zur Bestimmung der P-Element Insertion werden transgene Fliegen mit Fliegen von Stämmen verschiedener Balancerchromosomen gekreuzt. In





**Abbildung 2.1 Balancerkreuzungen mit X-, II.- und III.-chromosomalen Balancern.** Rotäugige Tiere haben eine rote Beschriftung. Rot markierte F1 Generationen stellen stabile Stämme dar.

### 2.2.22 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Office-Anwendungen	MS-Office 2007
Graphikbearbeitung	Adobe Illustrator CS4
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS4
Sequenzanalyse	FinchTV
Sequenzabgleich ( <i>Alignment</i> )	NCBI/Blast
Sequenzformatierung	Readseq (BCM Search Launcher)
Proteinsequenzanalyse	ExpASy
Restriktionsanalyse	NEB Cutter 2.0
Flybase	<a href="http://flybase.org/">http://flybase.org/</a>
Interactive Fly	<a href="http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm">http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/</a>

### 3 Ergebnisse und Diskussion

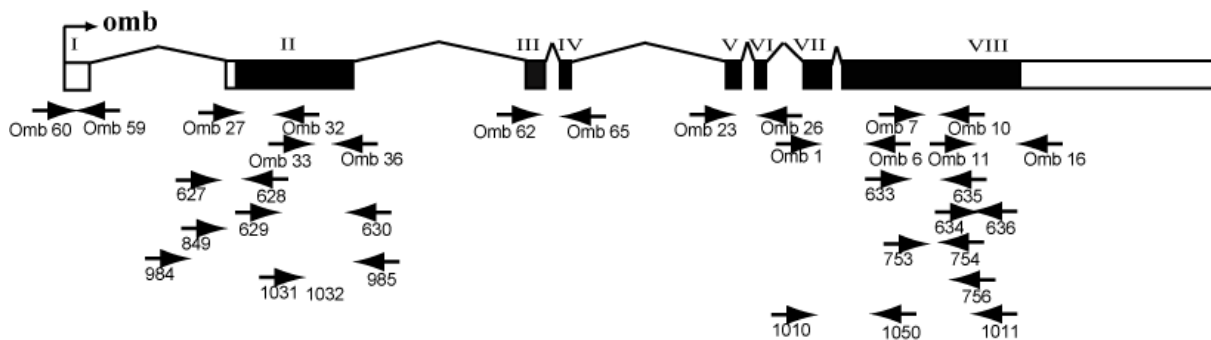
#### 3.1 Null Mutationen in Omb

##### 3.1.1 Phänotypische Charakterisierung neuer *omb* Allele

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden durch zwei Untersuchungen vier neue *omb* Mutationen isoliert. Zum ersten wurden sie in einem Komplementationstest darauf geprüft, ob sie die Fähigkeit verloren hatten das regulatorische Allel *In(1)omb<sup>H31</sup>* zu kompensieren. Dies begründet sich in der Beobachtung, dass in *I(1)omb/In(1)omb<sup>H31</sup>* Transheterozygoten die Bildung von 10 Interneuronen der optischen Loben blockiert ist (Pflugfelder et al., 1990). Es handelt sich hier um Rieseneurone des horizontalen und vertikalen Systems (HS und VS) der Lobula Platte. Die zweite Untersuchung basierte auf der Verstärkung des Flügelphänotyps des hypomorphen *omb<sup>bi</sup>* Allels in Kombination mit den im Folgenden charakterisierten *omb* Nullallelen. Die *omb<sup>bi</sup>* Mutante ist durch eine Fusion der longitudinalen Venen an der Basis des Flügels charakterisiert.

##### 3.1.2 Identifizierung molekularer Läsionen in den *I(1)omb* Allelen

Zur Charakterisierung der molekularen Defekte in drei (*I(1)omb<sup>12</sup>*, *I(1)omb<sup>282</sup>*, *I(1)omb<sup>15</sup>*) bis dahin nicht untersuchten *omb* mutanten Fliegenstämmen wurde genomische DNA von hemizygoten Larven isoliert und die gesamte mRNA kodierende Region der *omb* Transkriptionseinheit amplifiziert. Dies schloss auch Exon/Intron Grenzen mit ein (**Abbildung 3.1**).



**Abbildung 3.1 omb** Transkriptionseinheit und Amplifikations-*primer*. Exons sind mit römischen Zahlen markiert und werden durch dünne Linien verbunden. Ausgefüllte Balken symbolisieren die kodierende Region. (nach Sen 2010)

Zur leichteren Sequenzierung der amplifizierten DNA wurde diese vorher in den *pCR-XL-Topo* Vektor subkloniert (2.1.4). Aus der Analyse dieser Sequenzen ergab sich, dass alle mutanten Fliegenstämme Mutationen enthalten, die zu einem veränderten Protein führen. Die Allele *l(1)omb<sup>12</sup>*, *l(1)omb<sup>282</sup>* kodieren *missense*-Mutationen und *l(1)omb<sup>15</sup>* ist eine *nonsense*-Mutation, die zu einem verkürzten Protein führt. Zusammen mit zwei früher entdeckten Mutationen (Poeck et al., 1993) sind demnach nun 6 molekulare Defekte bekannt, die zu einem Omb Funktionsverlust führen (**Tabelle 3.1**).

Mutante	Aminosäure-position	Position relativ zur T-Box	Mutation	Typ	Literaturhinweis
<i>l(1)omb<sup>D4</sup></i>	310	-19	A310fs16X	Frameshift	Poeck 1993
<i>l(1)omb<sup>282</sup></i>	347	19	E347K	Missense	Diese Arbeit
<i>l(1)omb<sup>12</sup></i>	355	27	R355K	Missense	Diese Arbeit
<i>l(1)omb<sup>3198</sup></i>	395	67	W395X	Stop	Poeck 1993
<i>l(1)omb<sup>13</sup></i>	508	180	A508V	Missense	Sen 2010
<i>l(1)omb<sup>15</sup></i>	599	+83	Q599X	Stop	Diese Arbeit

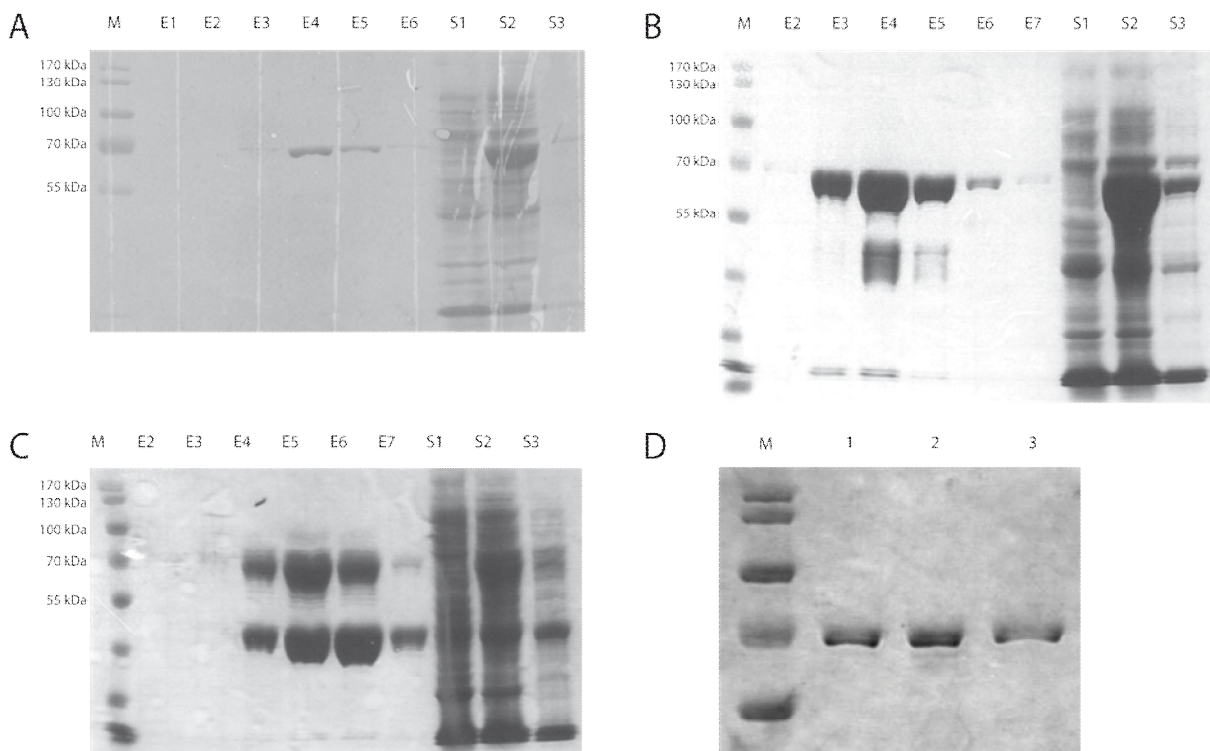
**Tabelle 3.1 Die T-Box von Omb reicht von Aminosäureposition 329 bis 516.** Zum besseren Vergleich mit Mutationen in anderen Tbx Proteinen sind die Positionen der Mutationen in Spalte 3 relativ zur T-Box wiedergegeben. Plus und Minus Zeichen deuten dabei auf die N- bzw. C-terminale Lage relativ zur T-Box hin. Alle anderen Positionsnummern geben die Lage innerhalb der T-Box relativ zu deren Startpunkt wieder. (nach Sen 2010)

### 3.1.3 *Missense* Mutationen liegen in konservierten Bereichen von Omb

Die zwei hier vorgestellten *missense* Mutationen liegen innerhalb der T-Box und betreffen hochkonservierte Aminosäuren, die nicht nur in T-Box Proteinen aller Drosophiliden sondern auch in menschlichen Tbx Proteinen zu finden sind (**Abbildung 3.2 A und B**). Das gleiche gilt für eine dritte *missense* Mutation (Sen et al., 2010), A508V des Allels *l(1)omb<sup>13</sup>*, die als einzige am Ende der T-Domäne liegt.



entsprechenden Punktmutationen in die *omb* Sequenz eingebaut und diese als MBP-Fusionsproteine (*Maltose-Binding-Protein*) exprimiert. Während die Herstellung und Aufreinigung des wildtypischen Fusionsproteins und die der beiden mutanten Varianten E347K (nicht gezeigt) und R355K (**Abbildung 3.3 B**) gelang, konnte die Isolation des für Q599X kodierenden Fusionsproteins (**Abbildung 3.3 C**) nicht beendet werden. Der Grund dafür ist der, dass MBP-OmbTC<sup>Q599X</sup> offensichtlich zu stark prozessiert wurde. In diesem Fall musste man davon ausgehen, dass sich auch ein wildtypisches MBP-OmbT Fusionsprodukt in dem Eluat befand, dessen mutanter C Terminus einfach „wegprozessiert“ wurde. Damit war die Probe unbrauchbar.

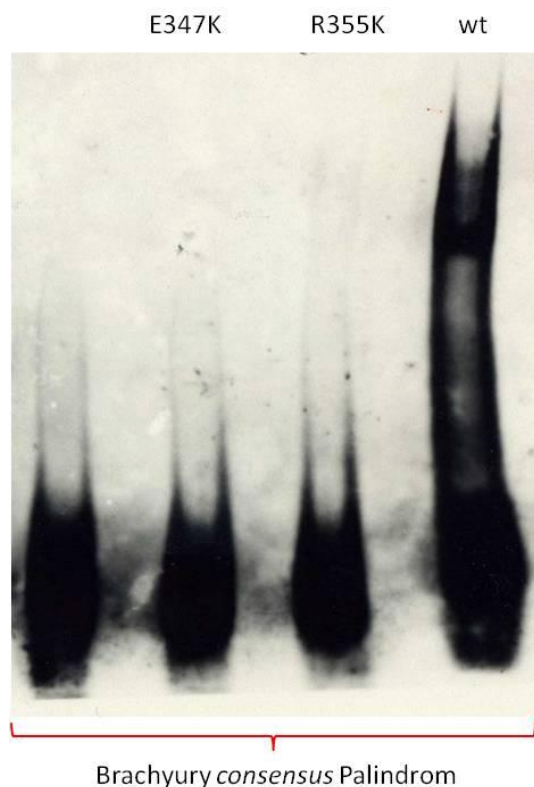


**Abbildung 3.3 Isolation von MBP-OmbT Fusionsproteinen. A-D** Coomassie gefärbte 10%-SDS-Polyacrylamidgels mit MBP-OmbT Protein Fraktionen. **A-C** Spur M Marker (*Unstained Molecular Protein Marker, Fermentas*, Molekulargewicht in kDa), E1-E7 Proteineluate, S1 unbearbeiteter Zellextrakt, S2 induzierte Zellen, S3 sonifizierter Zellüberstand nach Zentrifugation. **D** gereinigte MBP-OmbT Proteine. M Marker, 1 MBP-OmbT-E347K, 2 MBP-OmbT-R355K, 3 MBP-OmbT-wt. **A** Aufreinigung des wildtypischen MBP-OmbT Proteins. Während des 4. und 5. Eluationsschrittes (Spur E4, E5) wird am meisten Protein von der verwendeten Maltose Säule geschwemmt. **B** Aufreinigung des mutanten R355K MBP-OmbT Proteins. Ein Sternchen markiert die Proteinbanden, die möglicherweise nach einer Prozessierung des Fusionsproteins entstehen. **C** Aufreinigung des mutanten Q599X MBP-OmbT Proteins. Dieses Protein (\*) ist größer (> 66 kDa) als die

Fusionsproteine in A und B, da es zusätzlich einen Teil des C-Terminus von Omb enthält, in dem sich die Stop Mutation befindet.

### 3.1.5 *Missense* Mutationen in Omb-T verhindern die DNA Bindung

Aufgrund der Lage der hier beschriebenen Punktmutationen innerhalb der T-Domäne, ergab sich die Frage nach deren Auswirkung auf das Bindungsverhalten der OmbT Fusionsproteine mit deren Erkennungssequenz *in vitro*. Um dies zu klären, wurde ein *Electrophoretic Mobility Shift Essay* (EMSA) durchgeführt, bei dem die Bindungseigenschaften der verschiedenen Fusionsproteine an die Sequenz des Brachyury Palindroms verglichen wurden. Wie man in **Abbildung 3.4** sehen kann, verlieren die mutanten Varianten gegenüber dem wildtypischen (wt) Protein ihre Affinität zu dieser Zielsequenz, denn es konnte kein Bandshift detektiert werden.



**Abbildung 3.4** EMSA zum Nachweis des DNA-Bindungsverhalten verschiedener MBP-OmbT Fusionsproteine. Die Mutationen E347K und R355K in Omb-T verhindern einen Bandshift wie er durch das Binden des wildtypischen (wt) Fusionsproteins an das Brachyury *consensus* Palindrom zustande kommt (Pfeilspitze). Die erste Spur enthält nur das Palindrom.

### 3.1.6 Diskussion: Neue *omb* Mutationen und ihre Auswirkung auf die Funktion des Proteins

Zur Identifizierung molekularer Läsionen im *omb* Locus der verschiedenen lethalen Allele wurden die entsprechenden genomischen DNA Fragmente anfangs direkt nach einem Amplifikations- und Gelreinigungsschritt sequenziert. Es zeigte sich jedoch bald, dass die Sequenzierungsergebnisse dieser Proben nicht dem hohen Qualitätsstandard entsprach, der für eine zuverlässige Identifizierung von Fehlern notwendig ist. Aus diesem Grund wurden von da an alle Amplifikate vor der Sequenzierung in den *pCR-XL-Topo* Vektor subkloniert, was zu deutlich besseren Resultaten führte. Durch die Sequenzanalyse von mindestens zwei Klonen eines Amplifikats konnten von nun an tatsächliche Mutationen erkannt und „falsch-positive“ Mutationen ausgeschlossen werden.

In *vitro* konnte gezeigt werden, dass die in der T-Domäne lokalisierten *missense* Mutationen E347K und R355K die Bindung eines MBP-OmbT Proteins an die Brachyury Zielsequenz verhindern (**Abbildung 3.4**). Dies und die Tatsache, dass die Mutationen hochkonservierte Aminosäuren betreffen (**Abbildung 3.2**) lassen den Schluss zu, dass es sich hier um Reste handelt, die für die Funktion der DNA Erkennung des Proteins essentiell sind (Ng and Henikoff, 2006). Für die Stop Mutation Q599X innerhalb des C-Terminus konnte nicht gezeigt werden, ob sie einen Einfluss auf das Bindungsverhalten des Fusionsproteins hat, da es bei dem Aufreinigungsversuch zu einer starken Prozessierung des Fusionsproteins kam (**Abbildung 3.3 C**). Dadurch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich neben dem erwarteten Produkt auch ein kleineres wildtypisches MBP-OmbT Fragment in der Probe befand, welches alle Resultate in Frage gestellt hätte. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass der C-Terminus nicht für die DNA-Bindung erforderlich ist (Pflugfelder et al., 1992b), so bleibt die Bedeutung von Q599X diesbezüglich offen. Naheliegender ist, dass die c-terminale Deletion die Funktion von Omb in anderer Weise beeinträchtigt. Experimente, in denen Domänen von Omb mit denen von Org-1 ausgetauscht wurden, deuten klar auf den C-Terminus als den Teil, der dem Protein seine charakteristische Eigenschaft verleiht (Porsch et al., 2005). Von Tbx2/3 weiß man, dass der C-terminale Teil sowohl Repressor als auch Aktivator Domänen enthält und für die Unterdrückung der zellulären Seneszenz verantwortlich ist

(Carlson et al., 2001; Lingbeek et al., 2002). Daneben ist der C-Terminus von Tbx4/5 als notwendig für die Interaktion mit Nkx2-5 und LMP-4 beschrieben worden (Hiroi et al., 2001; Krause et al., 2004).



### 3.2 Potentielle Zielgene von Omb

Eine bioinformatische Suche nach Zielgenen von Omb innerhalb des *D. melanogaster* Genoms, die von Hüseyin Binbas und G. Pflugfelder (Binbas, 2009) durchgeführt und weiterentwickelt worden war, lieferte einen potentiellen Kandidatenkreis von vielen tausend Genen. Durch den Ausschluss von Genen, die keine Rolle bei der Entwicklung der Flügelimaginalscheibe spielten und deren TBEs nach phylogenetischen Konservierungskriterien keine Funktion zu haben schienen (Emberly, 2003; Siggia, 2005), ließ sich dieser Kreis eingrenzen. Im Folgenden werden die Erkenntnisse beschrieben, die sich aus der Untersuchung der Regulation einiger dieser Gene bzw. Genabschnitte durch Omb ergaben. Im Wesentlichen wurden dafür selbsthergestellte oder zur Verfügung gestellte *enhancer-trap* oder *enhancer-reporter* Stämme im wildtypischen und *omb* mutanten Hintergrund analysiert. Die *In Situ Hybridisierungstechnik* wurde zum Nachweis der Zielgenexpression bei Omb Verlust durchgeführt. Zum genaueren Nachweis der Bindungseigenschaften des Transkriptionsfaktors Omb an bestimmte Zielsequenzen dienten EMSA Tests.

Die im Folgenden vorgestellten Gene sind alphabetisch geordnet.

#### 3.2.1 *Dorsocross 2 (Doc2)*

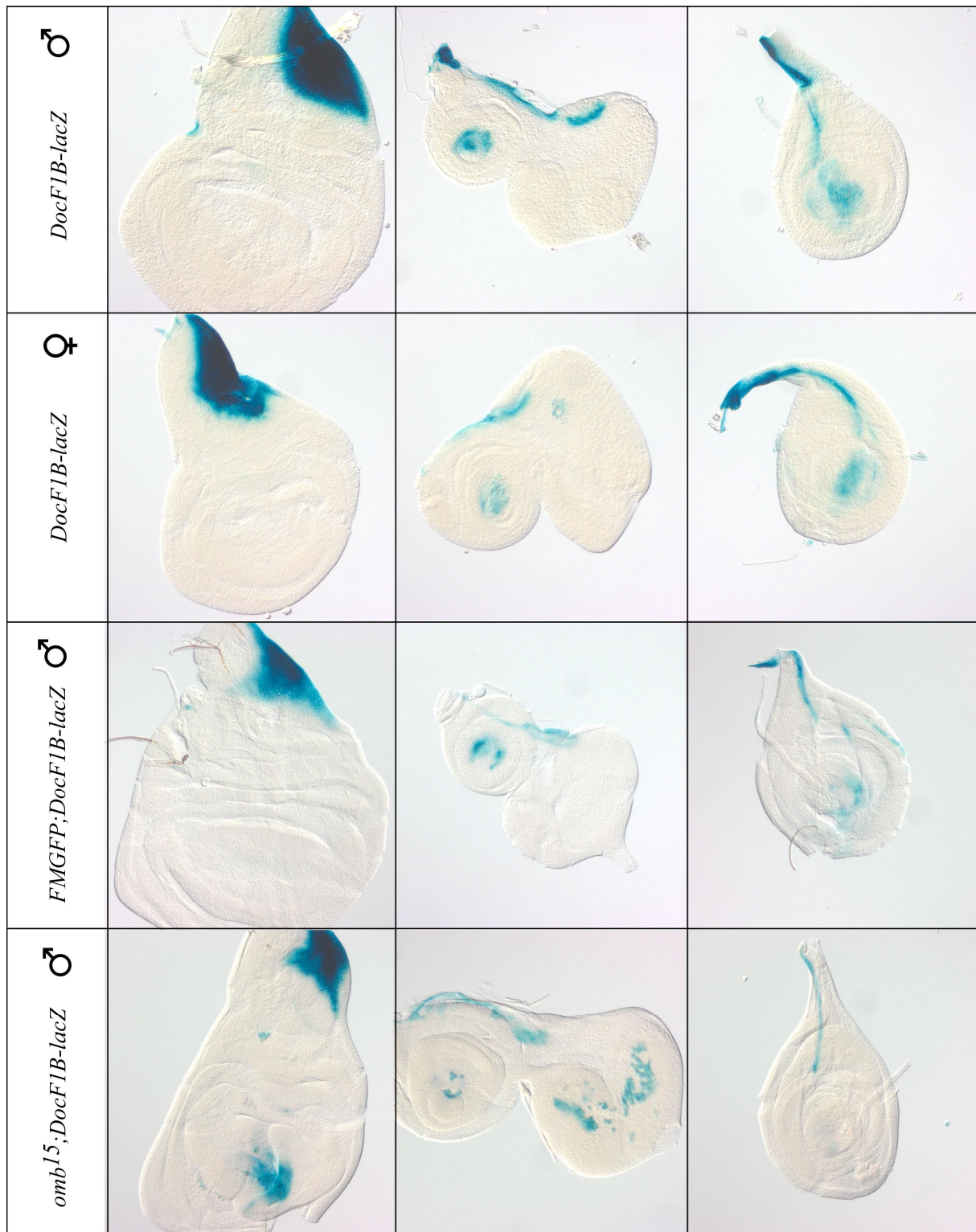
Die geclustert vorliegenden Gene *Doc1*, *Doc2* und *Doc3* kodieren für drei eng verwandte Transkriptionsfaktoren der T-Domänen Proteinfamilie (**Abbildung 3.5**). Phylogenetisch lassen sie sich der Tbx6 Unterfamilie zuordnen, zu der auch das menschliche Tbx6 gehört. Die *Doc* Gene werden sehr ähnlich exprimiert und ihre Funktion scheint dabei redundant zu sein (Hamaguchi et al., 2004; Reim et al., 2003). Bei einer Suche nach Dpp-abhängigen Aktivierungselementen (AEs) innerhalb des *Drosophila* Genoms wurde ein Cluster von vier solcher Bindestellen im *Doc* Locus gefunden (Weiss et al., 2010). Vier entsprechende *AE-Reporter* (**Abbildung 3.5 C**) zeigten Aktivität in Imaginalscheiben und ihre Muster spiegelten Aspekte des endogenen Expressionsmuster wieder. Die Expression von *Doc2* in der L3 Flügelimaginalscheibe ist im zentralen Bereich der *pouch* komplementär zu der von *omb* (**Abbildung 3.5**), weist darüber hinaus aber auch Überlappungen auf. Es



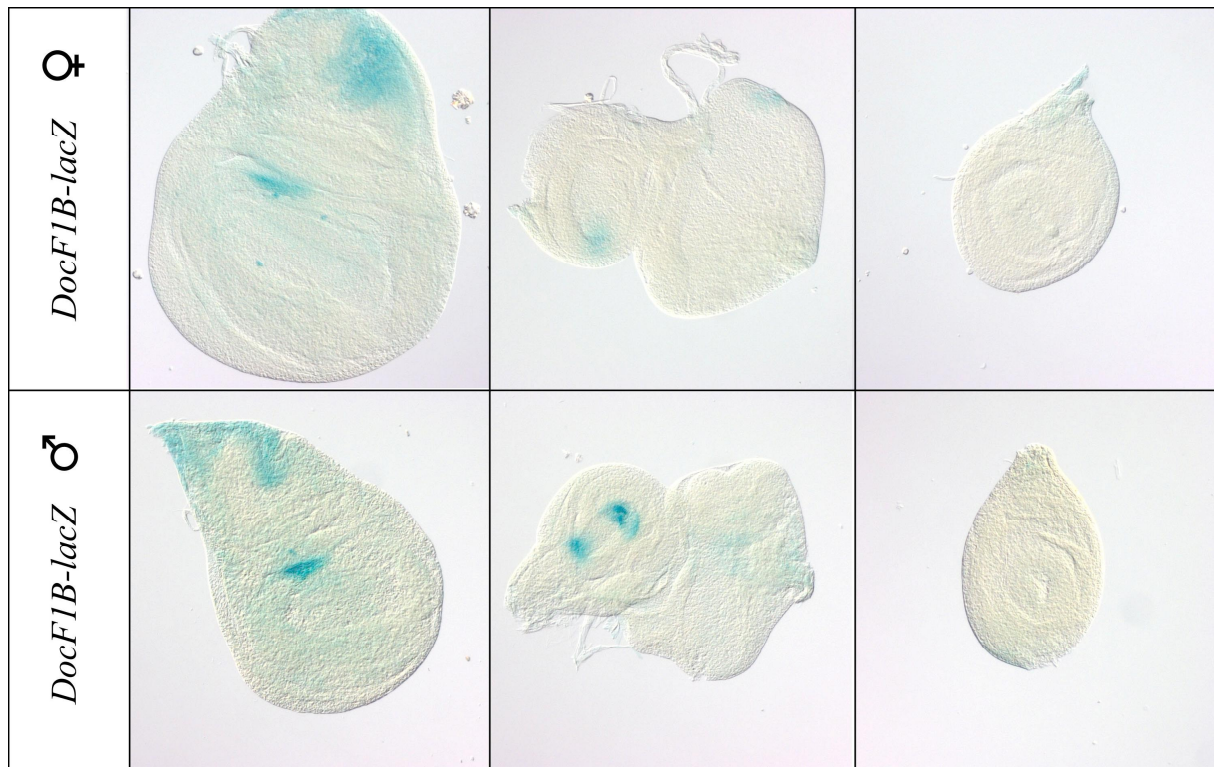
### 3.2.1.1 DocF1

Auf transgene Fliegenstämme wie z.B. DocF1A (**Abbildung 3.5 C**), deren Imaginalscheiben bereits im genetisch wildtypischen Hintergrund keine Färbung aufwiesen, wird im Folgenden nicht mehr eingegangen. Überraschenderweise zeigt DocF1B (Stamm 191) - transgen für die invertierte Sequenz von *DocF1A* - Expression in den Imaginalscheiben (**Abbildung 3.6**). Innerhalb des *DocF1 enhancers* konnte eine potentielle TBE (AAGTGTGAAA) mit einem Wert (*score*) aus einer *Positional Weight Matrix* (PWM) von 6,19 identifiziert werden, die in allen zwölf *Drosophila* Spezies konserviert ist. Die Flügelscheiben des Stammes 191 zeigten eine intensive *lacZ* Expression im posterioren Teil des dorsalen Notums. Bein- und Antennenscheiben waren leicht im Bereich der distalen Segmente gefärbt. Bei genauerem Hinsehen kann man jedoch erahnen, dass es sich hier nicht um eine Färbung des Hauptepithels, sondern um gefärbte Adepithelialzellen handelt. Darüber hinaus konnte eine Expression in der Peripodialmembran im Bereich der Scheibenperipherie nachgewiesen werden. Die Kombination von DocF1B mit dem *I(1)omb<sup>15</sup>* Allel hatte eine Aktivierung des *lacZ* Transgens im zentralen Bereich der Flügelpouch zur Folge. Allerdings handelte es sich dabei um eine Expression, die vor allem in Regionen ektopischer Falten beobachtet wurde, welche durch den *omb* Verlust verursacht werden (Shen, 2008; Umemori et al., 2007). Es ist demnach nicht auszuschließen, dass es sich bei der hier gefundenen Aktivierung um einen sekundären Effekt des *omb* Verlusts handelt.

Eine zweite Linie von DocF1B (Stamm 195, nicht gezeigt) zeigte eine ähnliche wenngleich schwächere Färbung wie Stamm 191. Im Fall des Stammes 195 wurde nicht auf Omb Abhängigkeit getestet.



**Abbildung 3.6 X-Gal Färbung von L3 Imaginalscheiben des Stammes 91 (*DocF1B-lacZ*).** 1. und 2. Reihe:  $+/+;DocF1B-lacZ/DocF1B-lacZ$ . 3. Reihe:  $FMGFP/Y;DocF1B-lacZ/+$ . 4. Reihe:  $l(1)omb^{15}/Y;DocF1B-lacZ/+$ . Die Flügelscheiben zeigten eine deutliche Färbung im posterioren Teil des dorsalen Heminotums. In  $omb^{15}$  zeigte der *enhancer* Aktivität im Bereich ektopischer Falten innerhalb der *pouch*. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)



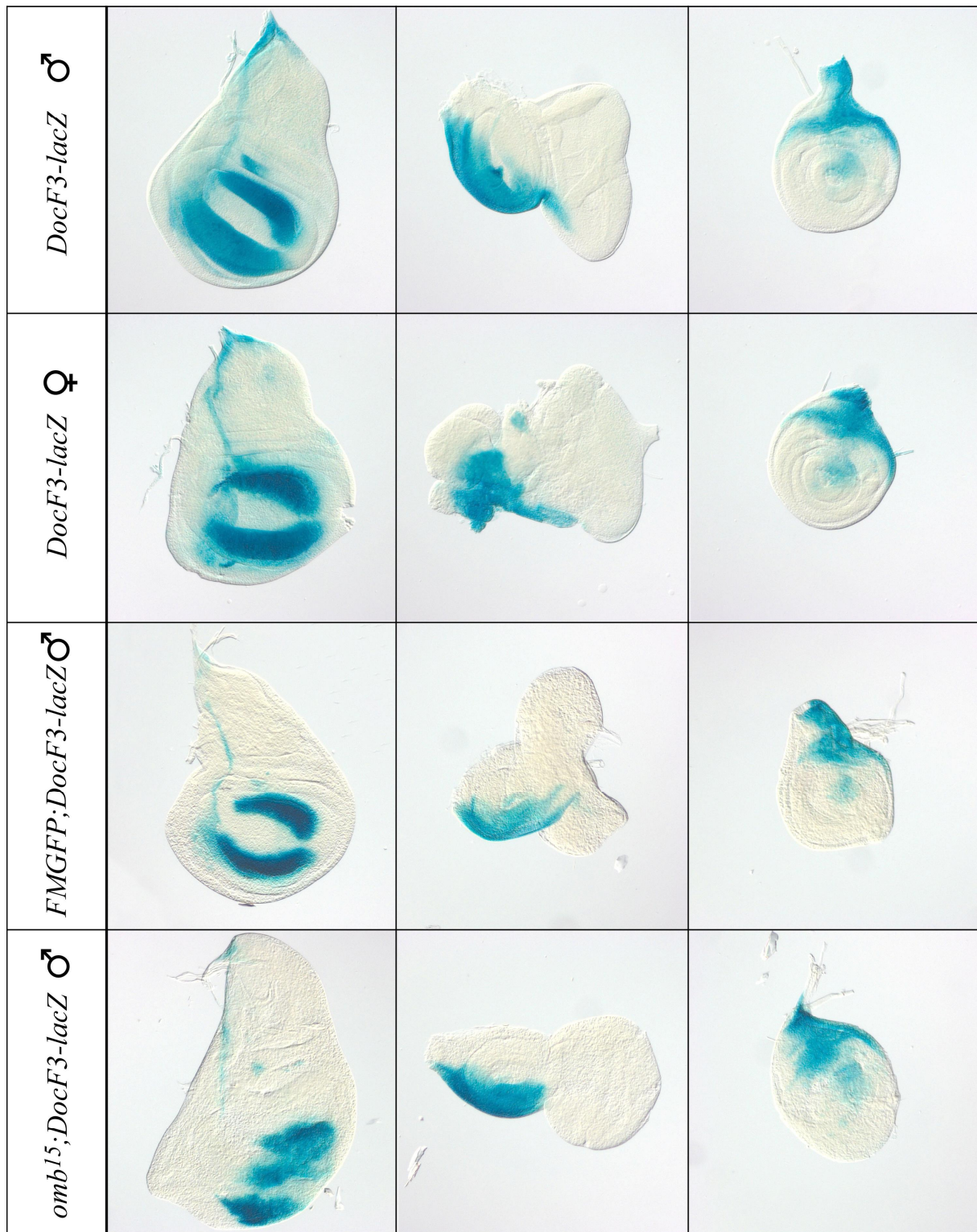
**Abbildung 3.7 X-Gal Färbung von L3 Imaginalscheiben des Stammes 195 (*DocF1B-lacZ*).** 1. und 2. Reihe:  $+/+;DocF1B-lacZ/DocF1B-lacZ$ . Die Flügelscheiben zeigen eine schwache aber reproduzierbare Färbung des bereits in Stamm 91 (*DocF1B-lacZ*) gefundenen Musters. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

### 3.2.1.2 *DocF3*

In der Flügelimaginalscheibe wird *Doc* vor allem im dorsalen und ventralen Kompartiment der *pouch* in zwei halbmondförmigen Streifen und in kleineren Domänen in der dorsalen *hinge* und der posterioren Notum Region exprimiert. Die Expression in der Beinscheibe beschränkt sich auf den Bereich der zukünftigen „Körperwand“ und auf proximale Beinsegmente (Reim et al., 2003).

In der Insertionslinie 202, welche transgen für den *DocF3 enhancer* ist, fand sich ein *lacZ* Muster in den Imaginalscheiben, das dem von *Doc* sehr ähnlich war (vgl. **Abbildung 3.8** mit **Abbildung 3.5 A**). Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich in *omb* mutanten Flügelscheiben eine Ausdehnung der *lacZ* Expression im Zentrum des zukünftigen Flügelblattes. Dagegen schien die Färbung in anterioren Bereichen verloren gegangen zu sein. Dies und die Tatsache, dass sich im Bereich des *DocF3 enhancers* zwei „hochwertige“ TBEs (TBE 24: AGGTGTGAGC, PWM-Wert: 10,25

und TBE 25: CTTACACCCC, PWM-Wert: 9,23) befinden, legen eine Regulation durch Omb nahe.



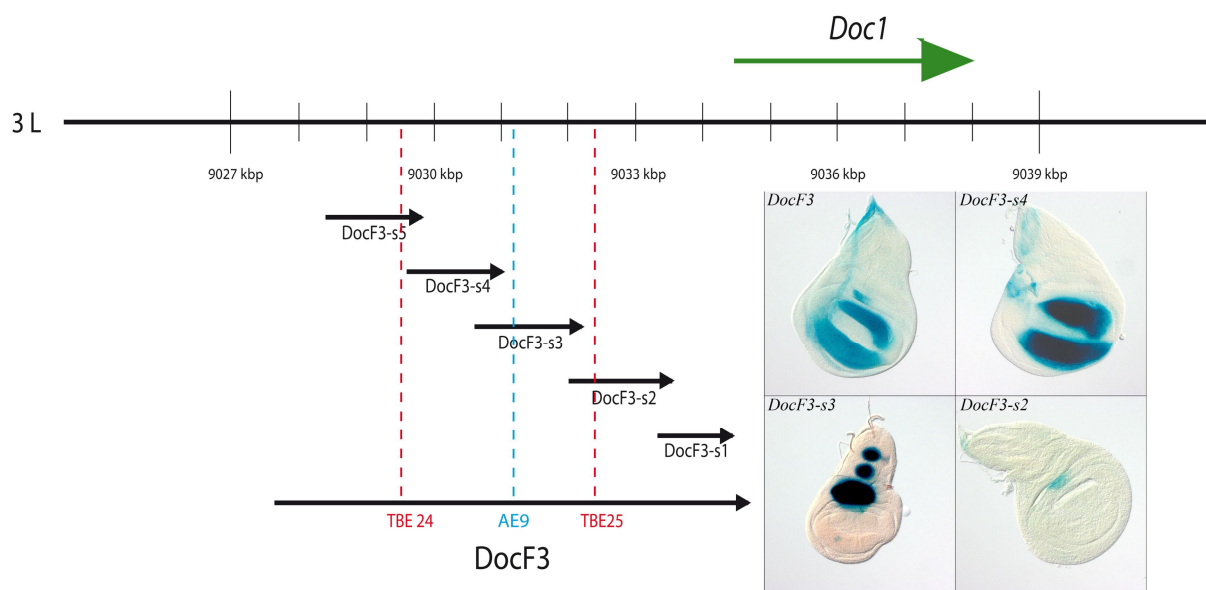
**Abbildung 3.8 X-Gal Färbung von L3 Imaginalscheiben des Stammes 202 (*DocF3-lacZ*).** 1. und 2. Reihe: *+/+;DocF3-lacZ/DocF3-lacZ*. 3. Reihe: *FMGFP/Y; DocF3-lacZ/+*. 4. Reihe: *l(1)omb<sup>15</sup>/Y;DocF3-lacZ/+*. In den ersten drei Reihen wurden wildtypische Imaginalscheiben gefärbt. In

*l(1)omb<sup>15</sup>* mutanten Flügelscheiben zeigte sich eine zentrale Ausbreitung der *reporter*-Gen Expression in der *pouch* im Vergleich zum Wildtyp. Im anterioren Kompartiment schien ein Teil der halbmondförmigen Färbung verloren gegangen zu sein. Alle vier Flügelimaginalscheiben zeigen Reste einer trachealen Expression. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

Um die für die Färbung regulatorisch relevante Sequenz genauer bestimmen zu können, wurden überlappende Subfragmente des *DocF3 enhancers* analysiert (**Abbildung 3.9**).

### 3.2.1.3 DocF3-s4

Die Färbung der transgenen *DocF3* Sublinien ergab, dass eine davon, *DocF3-s4* (Stamm 197), ein *pouch* Muster erzeugen konnte, welches dem von *DocF3* am nächsten kam (vgl. **Abbildung 3.8** und **Abbildung 3.10**).

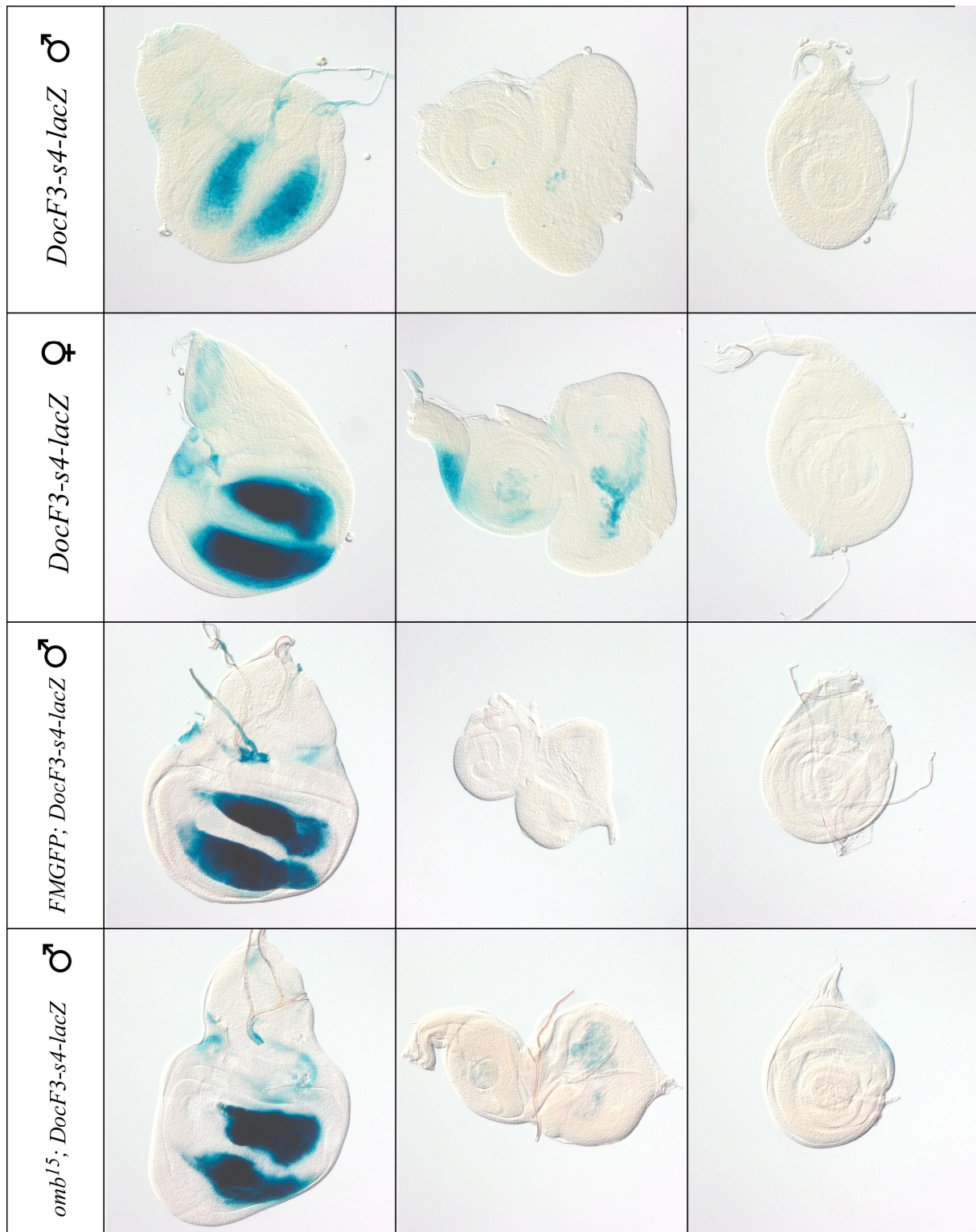


**Abbildung 3.9 Lage der *DocF3* Subfragmente (*DocF3-s1* – *DocF3-s5*) relativ zu *Doc1*.** Die roten Linien markieren die Position der beiden TBEs innerhalb des *DocF3*-Fragments bzw. in den Subfragmenten *DocF3-s2* und *DocF3-s4*. In *DocF3* und *DocF3-s3* befindet sich ein *Dpp*-abhängiges Aktivierungselement (gestrichelte blaue Linie) (Weiss et al., 2010). Für die aktiven *enhancer* ist jeweils ein Beispiel des Expressionsmusters in Flügelscheiben wiedergegeben (siehe Kapitel).

Damit ließ sich ein transkriptionell aktiver Bereich eingrenzen, der für dieses *Doc* typische Expressionsmuster mitverantwortlich ist. Aus **Abbildung 3.9** wird jedoch deutlich, dass ausgerechnet das *DocF3-s4* Fragment keine der beiden TBEs enthält,

die nach bisheriger Auffassung für eine Regulation durch Omb in Frage kommen könnten. Um dieses Fragment dennoch auf Omb Abhängigkeit zu testen wurden auch hier Tiere dieses Stammes mit dem *I(1)omb<sup>15</sup>* Nullallel (Stamm 1042) gekreuzt und L3 Larven der F1 Generation untersucht. Schließlich konnte man aufgrund der weitgehend gleichen X-Gal Färbung von wildtypischen und mutanten Flügelscheiben nicht von einer Regulation des *DocF3-s4 enhancers* durch Omb sprechen (**Abbildung 3.10**). Der in DocF3 (Stamm 202) beobachtete Effekt konnte hier nicht reproduziert werden. In bisher unveröffentlichten Antikörperfärbungen von Dr. Jie Shen zeigte sich, dass die Expression von *Doc* während der Larvalentwicklung sehr dynamisch ist. Im späten L3 Stadium beispielsweise nahm die wildtypische Expression von *Doc* drastisch zu. Es ist demnach möglich, dass die in *I(1)omb<sup>15</sup>* beobachtete zentrale Expansion der *lacZ* Expression in Flügelscheiben (**Abbildung 3.8** 4.Reihe) auf eine natürliche Hochregulierung des *enhancers* zurück zu führen ist. Die in DocF3 enthaltene Enhanceraktivität in Bein- und Augenantennenimaginalscheibe ist in dem s4-Subklon nicht mehr vorhanden.





**Abbildung 3.10 X-Gal ÜN Färbung von L3 Imaginalscheiben des Stammes 197 (*DocF3-s4-lacZ*).**

1. und 2. Reihe:  $+/+; \text{DocF3-s4-lacZ}/\text{DocF3-s4-lacZ}$ . 3. Reihe:  $\text{FMGFP}/Y; \text{DocF3-s4-lacZ}/+$ . 4. Reihe:  $l(1)\text{omb}^{15}/Y; \text{DocF3-s4-lacZ}/+$ . In den ersten drei Reihen wurden wildtypische Imaginalscheiben gefärbt. Die durch den *DocF3-s4 enhancer* aktivierte *lacZ* Expression entsprach in der *pouch* der von *DocF3-lacZ* (Stamm 202).  $l(1)\text{omb}^{15}$  mutante Flügelscheiben zeigten keine signifikante Abweichung

vom Wildtyp. Alle Flügelimaginalscheiben zeigen tracheale Expression. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

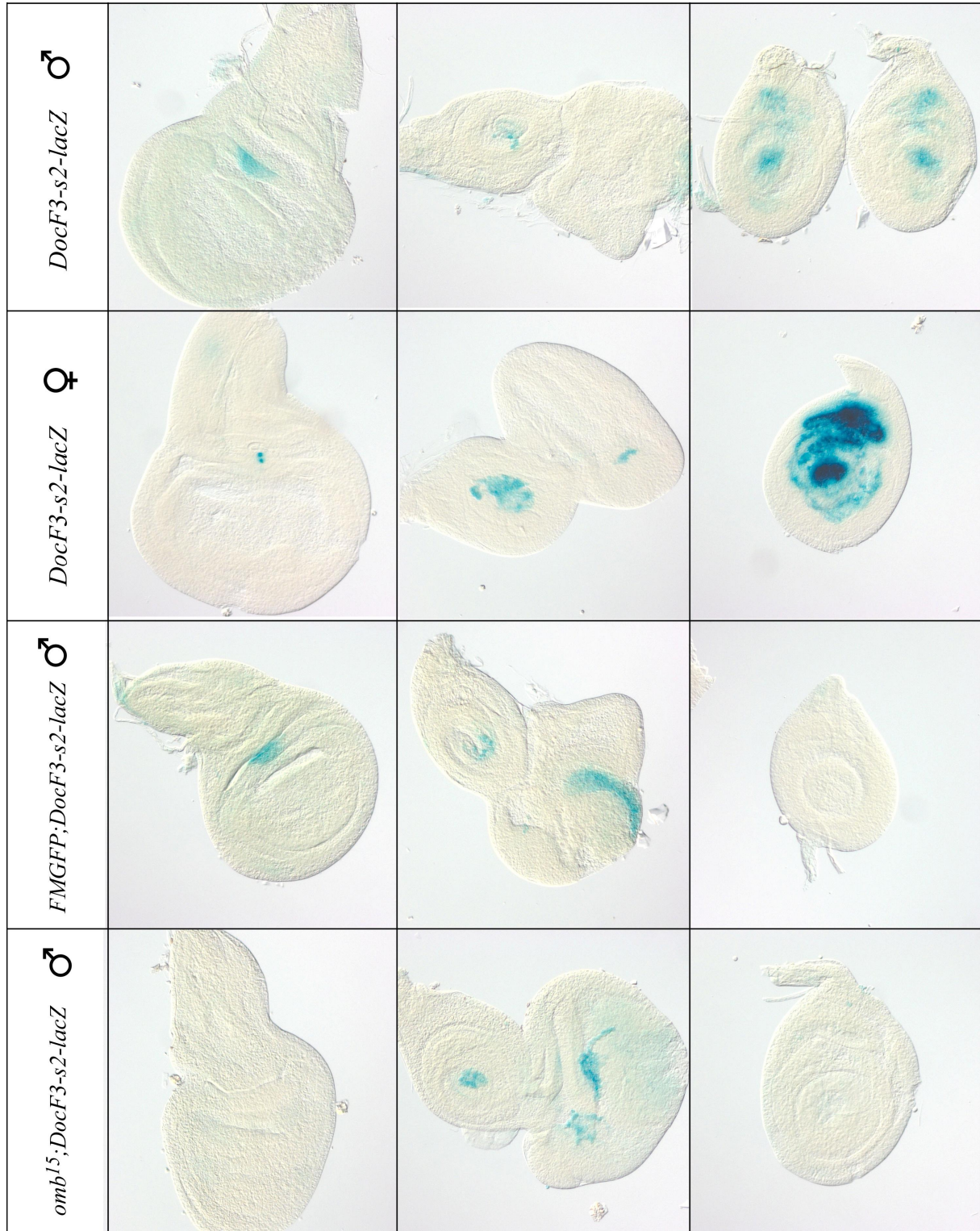
#### 3.2.1.4 DocF3-s2

Neben der beobachteten transkriptionellen Aktivität des DocF3-s4 Fragments in Imaginalscheiben konnte noch für zwei weitere Subfragmente eine solche Eigenschaft festgestellt werden. Diese Fragmente zeigten *enhancer-lacZ* Expressionsmuster, die anderen für *Doc* publizierten Expressionsdomänen und denen in DocF3 Larven gefundenen Mustern glichen. Das *DocF3-s2-lacZ* Subfragment (Stamm 146) zeigte Aktivität in distalen und dorsal-proximalen Beinsegmenten der Beinscheiben. Die Expression in Männchen war so schwach, dass sie in heterozygoten Tieren nicht mehr nachweisbar war (**Abbildung 3.11**). Eine proximale *Doc* Expression in L3 Beinscheiben wurde auch von Reim et al. (2003) beschrieben. Zudem konnte beobachtet werden, dass die Färbungen von männlichen Beinscheiben viel schwächer ausfiel als von weiblichen, was auf einen Sexualdimorphismus hindeuten konnte. Auf die Regulation durch Omb ergab sich kein Hinweis. Daher ließ sich nicht sagen, ob die darin befindliche TBE 25 (CTTCACACCC, PWM-Wert: 9,23) hinsichtlich der Regulation des hier untersuchten *enhancers* durch Omb eine Rolle spielt.

#### 3.2.1.5 DocF3-s3

In Stamm 158 (*DocF3-s3-lacZ*) wurde eine *lacZ* Expression in drei punktförmigen Domänen der *hinge*- und Notum-Region gefunden. In allen präparierten Scheiben zeigte die Expression in der *hinge* Region die stärkste Ausprägung (**Abbildung 3.12**). Diese Expression war in dem Ausgangsfragment DocF3 nicht vorhanden. Das Färbemuster kommt daher wahrscheinlich durch das Abtrennen cis-reprimierender Sequenzen bei der Subklonierung zustande. Allerdings ist das Doc-Protein im Zentrum der dorsalen *hinge*-Region stark exprimiert (**Abbildung 3.5 A**). Es ist denkbar, dass es sich bei *DocF3-s3* um den für diese Expression notwendigen *enhancer*-Bereich handeln könnte, dessen Aktivität stark Kontext-abhängig wäre. Wie man in **Abbildung 3.12** (4. Reihe) erkennen kann, zeigte sich in *omb* mutanten

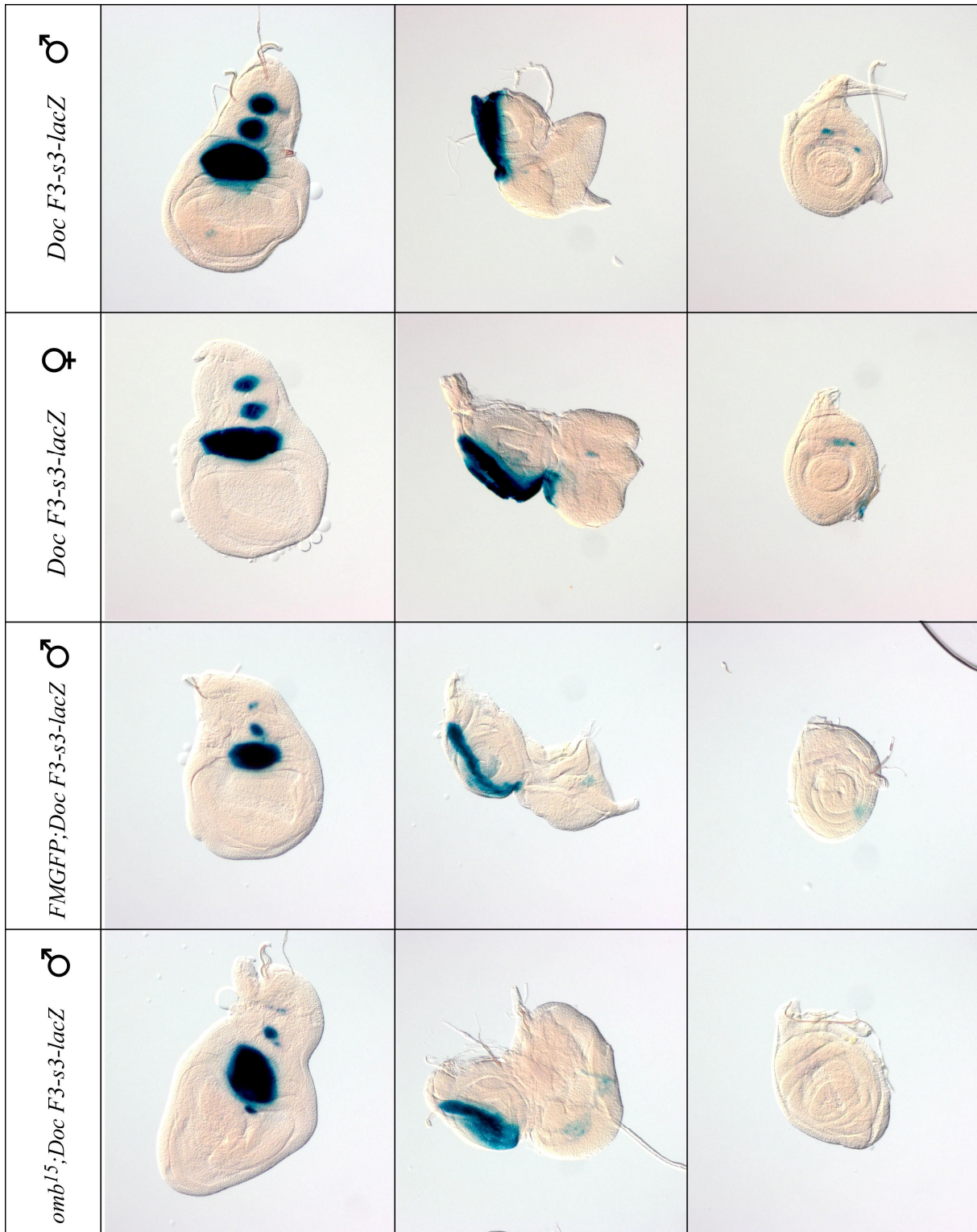
Flügelscheiben keine Veränderung des wildtypischen *lacZ* Expressionsmusters. Es kann daher angenommen werden, dass Omb keinen Einfluss auf die Aktivität dieses *enhancers* besitzt.



**Abbildung 3.11 X-Gal ÜN Färbung von L3 Imaginalscheiben des Stammes 197 (*DocF3-s2-lacZ*).**

1. und 2. Reihe: +/+; *DocF3-s2-lacZ/DocF3-s2-lacZ*. 3. Reihe: *FMGFP/Y;DocF3-s2-lacZ/+*. 4. Reihe:

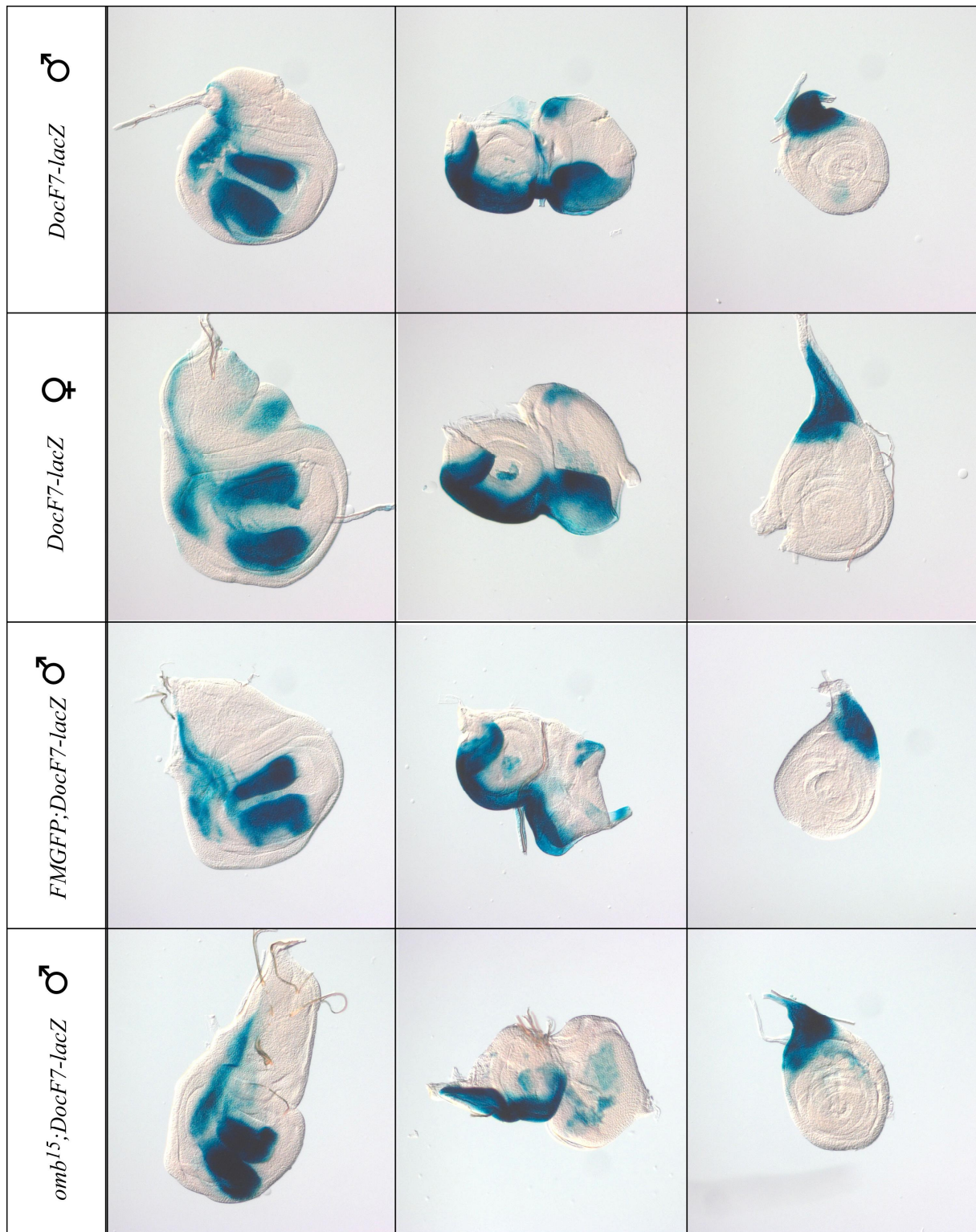
*l(1)omb<sup>15</sup>/Y;DocF3-s2-lacZ/+*. In den ersten drei Reihen wurden wildtypische Imaginalscheiben gefärbt. Ein für *Doc* typisches Muster ist die in Beinscheiben gefundene dorsal-proximale *lacZ* Expression (1. und 2. Reihe) nicht aber die zusätzlich erkennbare zentrale Domäne. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)



**Abbildung 3.12 X-Gal ÜN Färbung von L3 Imaginalscheiben des Stammes 197 (*DocF3-s3-lacZ*).** 1. und 2. Reihe: +/+; *DocF3-s3-lacZ/DocF3-s3-lacZ*. 3. Reihe: *FMGFP/Y;DocF3-s3-lacZ/+*. 4. Reihe: *l(1)omb<sup>15</sup>/y;DocF3-s3-lacZ/+*. In den ersten drei Reihen wurden wildtypische Imaginalscheiben gefärbt. Die im Bereich der *hinge* Region gefundene *lacZ* Expression ist Teil des endogenen *Doc* Musters. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

### 3.2.1.6 DocF7

Mit dem *DocF7-lacZ* Transgen (Stamm 96 und 99) wurde neben *DocF3-lacZ* ein weiterer *enhancer* Bereich identifiziert, der in der Flügelimaginalscheibe das bekannte *Doc* Muster zeigte. Wie man in **Abbildung 3.13** (Stamm 99 nicht gezeigt) erkennen kann, fanden sich auch hier gegenüberliegende Domänen im dorsalen und ventralen Kompartiment der *pouch*. Die in Augenantennen- und Beinimaginalscheiben gefundenen Muster zeigten ebenfalls Übereinstimmung mit denen aus **Abbildung 3.8**. Möglicherweise handelt es sich bei dieser regulatorischen Region um eine Duplikation, was auch als Ursache für die Entstehung des *Doc* Clusters selbst angenommen wird. Die in *DocF7* gefundenen TBEs 10 (CTTGACACCA, PWM-Wert: 6,56) und 11 (AAGTGTGAAA, PWM-Wert: 9,06) waren gut und sehr gut konserviert. Trotz dieser Daten konnte in *l(1)omb<sup>15</sup>* Scheiben keine Veränderung des im Wildtyp gefundenen Musters entdeckt werden.



**Abbildung 3.13 X-Gal ÜN Färbung von L3 Imaginalscheiben des Stammes 96 (*DocF7-lacZ*).** 1. und 2. Reihe: +/+; *DocF7-lacZ/DocF7-lacZ*. 3. Reihe: *FMGFP/Y;DocF7-lacZ/+*. 4. Reihe: *l(1)omb<sup>15</sup>/Y;DocF7-lacZ/+*. In den ersten drei Reihen wurden wildtypische Imaginalscheiben gefärbt. In allen Genotypen wurde das gleiche *Doc* typische Muster gefunden. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

### 3.2.1.7 Diskussion

Bisher wurde *Doc* vor allem im Zusammenhang mit der Entstehung der Amnioserosa und des dorsalen Ekto- und Mesoderms in *Drosophila* Embryonen diskutiert. Hier zeigte sich, dass es *downstream* von Dpp exprimiert wird und wahrscheinlich ein direktes Ziel von Dpp ist (Hamaguchi et al., 2004; Reim et al., 2003). Eine entscheidende Funktion konnte auch bei der Bildung der myocardialen und pericardialen Zelltypen nachgewiesen werden (Reim and Frasch, 2005). Die Frage, welche Rolle *Doc* bei der Entwicklung der Flügelimaginalscheibe spielt, ist bisher weitgehend ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass eine ektopische Expression von *Doc* zu einer Repression von *Wg* führen kann (Reim et al., 2003).

Mit der Expressionsanalyse der für diese Arbeit von Herrn Reim zur Verfügung gestellten *enhancer-reporter* Linien konnten mehrere *enhancer* identifiziert werden, die für die Aktivierung der verschiedenen endogenen *Doc* Domänen in der Flügelimaginalscheibe verantwortlich zu sein scheinen.

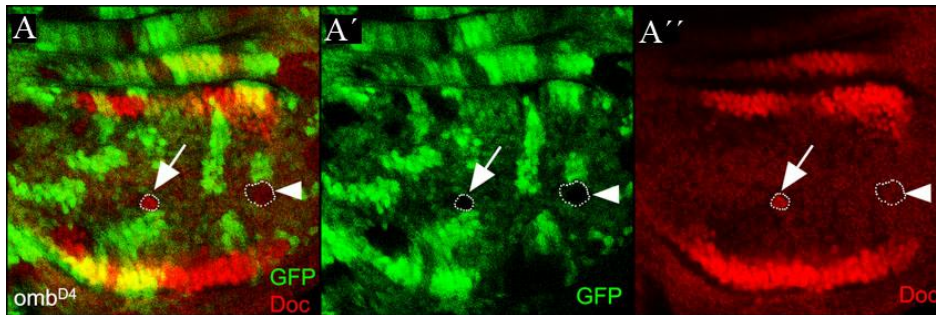
#### 3.2.1.7.1 DocF1B Enhancerfragment

In Flügelimaginalscheiben induzierte der DocF1B *enhancer* eine Reporterexpression in einem Teil des dorsalen Notums nahe der A/P Kompartimentsgrenze. Dabei handelt es sich um einen Bereich, in dem auch endogene *Doc* Expression nachgewiesen wurde (Reim et al., 2003). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Aktivität in der Notumregion eine biologische Funktion des *enhancers* darstellt.

Soweit bekannt ist, wird *omb* nicht im Bereich des Notums exprimiert. Eine Notwendigkeit von *Omb* für die Aktivierung von DocF1B erscheint somit unwahrscheinlich. Dafür spricht auch, dass ein *omb* Verlust auf die Aktivität im Notum keinen Einfluss hatte.

In *omb*<sup>0</sup> zeigte sich jedoch eine Aktivierung von DocF1B in zentralen Bereichen der Flügelpouch. Damit ergibt sich die Möglichkeit, dass *Omb* als negativer Regulator fungiert und in der *pouch* ein notales Schicksal unterdrückt. Daten aus einer bisher unveröffentlichten Zellklonanalyse deuten ebenfalls daraufhin, dass *Omb* die Expression von *Doc* unterdrücken kann (Dr. Jie Shen unveröffentlicht). Hier zeigte sich, dass in *omb*<sup>D4</sup> Klonen nahe der A/P Grenze *Doc* hochreguliert wurde, in anderen Bereichen jedoch nicht (**Abbildung 3.14**).

In DocF1B wurden insgesamt vier potentielle TBEs gefunden (5.4), die wahrscheinlich *in vitro* aufgrund ihres scores von mindestens 6,02 von Omb gebunden werden würden. Diese Annahme begründet sich in der Tatsache, dass eine TBE aus einem *in vitro* SELEX-Experiment mit dem niedrigsten score von 4,46 in einem *bandshift* Experiment von Tbx6 noch erkannt wurde (White and Chapman, 2005). Zudem ist wenigstens TBE31 (score 6,19) in DocF1B in allen Drosophiliden konserviert, was zusammen für ihre Funktionalität und eine Regulation durch Omb oder ein anderes Tbx Protein sprechen könnte. Um ihre Relevanz für die Regulation von DocF1B zu testen, könnte eine Mutation zu einer „low score site“ (vgl. 3.2.5.2) hilfreich sein.



**Abbildung 3.14** *omb*<sup>D4</sup> Zelloklonalanalyse. A, A', A'' Zelloklone (Pfeile) im Zentrum der Flügelpouch, denen eine *omb* Funktion fehlt (Verlust von GFP), zeigen eine Expression von *Doc*. Anterior ist links und dorsal ist oben. (Dr. Jie Shen unveröffentlicht)

Gegen eine direkte Regulation durch Omb spricht, dass eine Aktivierung von DocF1B immer im Bereich ektopischer Falten gefunden wurde, die man gewöhnlich in *omb*<sup>0</sup> beobachten kann (Shen, 2008; Umemori et al., 2007). Ein *omb* Verlust führt zu drastischen Veränderungen der Zellschicksale, was u.a. eine Dorsalisierung ventralen Gewebes nach sich ziehen kann (del Alamo Rodriguez et al., 2004). Es ist somit denkbar, dass die Aktivierung des notalen DocF1B *enhancers* innerhalb der *pouch* nichts anderes als ein Effekt der eintretenden Dorsalisierung während dieses Stadiums ist.

### 3.2.1.7.2 DocF3 und DocF7 Enhancerfragmente

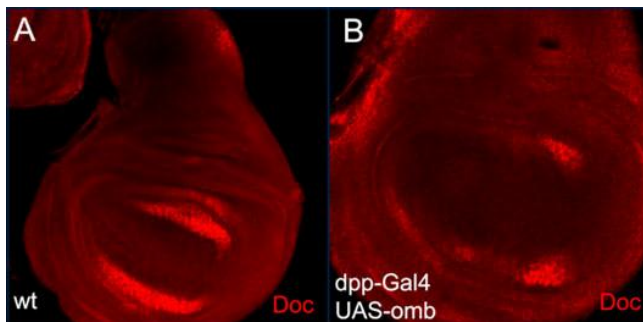
Die in DocF3 und DocF7 Larven gefundene Reporter-gen-Expression spiegelt die endogene Expression in der Flügelpouch wieder. Deshalb ist es auch für diese



*enhancer* wahrscheinlich, dass sie für das Expressionsmuster der endogenen Doc Gene verantwortlich sind. Das Vorliegen zweier Flügelenhancer mit der gleichen Wirkung geht vermutlich auf ein Duplikationsereignis von einem gemeinsamen Vorfahren zurück, das nach Meinung von Reim et al. (2003) Teil der Entstehung des *Doc* Clusters gewesen ist.

Die Expression von *omb* ist im Zentrum der *pouch* mit der von *Doc* teilweise komplementär bzw. überlappend. Auch wenn dies als Hinweis auf eine Regulation durch Omb verstanden werden kann, zeigte die Expressionsanalyse beider *pouch-enhancer* und schließlich der Subfragmente von DocF3, dass es sich nicht um Omb regulierte Sequenzen handelt. Das ist bemerkenswert, da eine Überexpression von *omb* mit Dpp-Gal4 die Expression von *Doc* in der *pouch* unterdrücken konnte (Dr. Jie Shen unveröffentlicht, **Abbildung 3.15**). Denkbar wäre, dass Omb hier nur als nicht-DNA-gebundener Corepressor wirkt.

Wie bereits gezeigt werden konnte, unterliegt die Expression von *Doc* einer starken zeitlichen Abhängigkeit. So fand Dr. Jie Shen in späten L3 Stadien eine fast ubiquitäre Expression im Hauptepithel von Flügelimaginalscheiben. Zusammen mit seinem Ergebnis aus **Abbildung 3.15** führt dies zu der Annahme, dass es vielleicht doch einen Einfluss von Omb gibt, der erst in späten Stadien aktiviert wird.



**Abbildung 3.15 Überexpression von *omb*.** **A** Wildtypische *Doc* Expression. **B** Expression von *omb* mit Dpp-Gal4 führt zu einer Reduktion von *Doc* in Zellen nahe der A/P-Grenze. Anterior ist links und dorsal ist oben. (Dr. Jie Shen unveröffentlicht)

Das Ergebnis der *enhancer*-Analyse zeigt auch, dass die potentiellen in DocF7 und DocF3 gefundenen TBEs (5.4), trotz ihrer teilweise guten Konservierung und/oder *scores*, keine Bedeutung für die Kontrolle durch Omb haben können. Folglich sind phylogenetische Konservierungskriterien und hohe *scores* potentieller TBEs kein verlässlicher Hinweis auf deren Funktionalität. Hier muss angemerkt werden, dass

Doc als T-Box Faktor selbst eine Affinität zu den angesprochenen TBEs haben könnte und somit eine Autoregulation möglich wäre. Daneben wurden in DocF7 und DocF3 potentiell Dpp-abhängige Aktivierungselemente gefunden (Weiss et al., 2010), die für eine direkte Regulation durch Dpp sprechen. Ein Beweis dafür muss aber noch erbracht werden. Auf die mögliche Bedeutung von AE9 für die Aktivierung von *Doc* wird im nächsten Kapitel eingegangen.

### 3.2.1.7.3 DocF3 Subfragmente

Mit der Analyse der Subfragmente konnten mehrere aktive Bereiche des DocF3 *enhancers* isoliert werden. Bei DocF3-s2 handelt es sich vermutlich um einen *Beinenhancer*, der für die endogene Expression in proximalen Teilen notwendig ist. Trotz einer Coexpression mit *omb* lässt sich über einen Einfluss nichts sagen, da sich eine DocF3-s2 getriebene Expression in heterozygoten Kontrollarven nicht nachweisen ließ. Es ist aber naheliegend, dass ein solcher Einfluss nicht existiert, da ein *omb* Verlust auch keine Auswirkung auf das größere DocF3 Fragment hatte.

DocF3-s3 zeigte eine Aktivität in der dorsalen *hinge*, die für einen Teil der endogenen Expression verantwortlich sein könnte aber nicht in DocF3 Larven gefunden wurde. Damit scheint das Subfragment und auch das größere DocF3 Fragment möglicherweise weiteren cis-regulatorischen Einflüssen zu unterliegen, die in ihrer Gesamtheit erst das endogene Muster erzeugen können, hier aber aufgrund der Isolation der Fragmente verloren gingen. Auch hier ist die überlappende Expression mit *Omb* in der *hinge* Region offensichtlich aber unerheblich, da für *Omb* kein Einfluss nachgewiesen werden konnte und darüber hinaus eine geeignete Bindestelle fehlt.

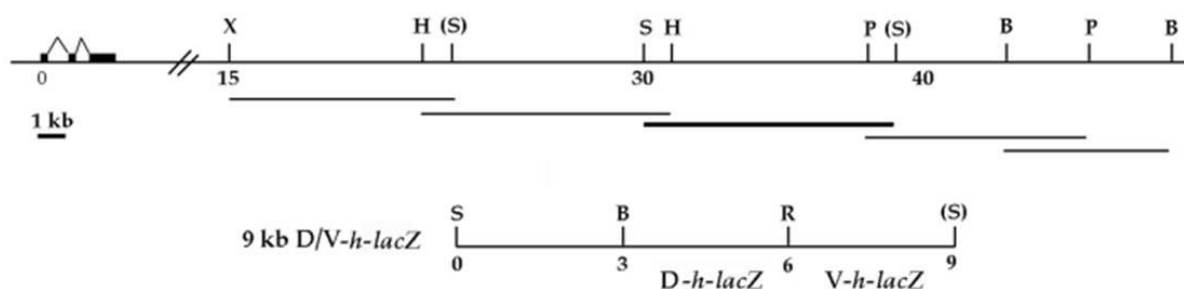
Stattdessen wurde im Bereich der DocF3 Subfragmente ein Aktivierungselement (AE9) gefunden (**Abbildung 3.9**), das möglicherweise direkt von Dpp reguliert wird (Weiss et al., 2010). Ein 2 kb großes AE9-*enhancer*-Fragment, das mit DocF3-s3 sowie einem Teil von DocF3-s4 überlappt, konnte in der *pouch* ein Doc-ähnliches Muster erzeugen. DocF3-s4, von dem gezeigt wurde, dass es dieses Muster auch induziert, enthält das Aktivierungselement aber nicht. Wie man in **Abbildung 3.9** sieht, liegt AE9 im Bereich von DocF3-s3. Daraus kann man schließen, dass AE9 für die Aktivierung des DocF3 *pouch-enhancers*, im Gegensatz zu dem was Weiss und

Kollegen vermutet haben, nicht erforderlich ist. Es könnte aber sein, dass es für die Aktivierung von DocF3-s3 notwendig ist.

Dennoch ist es möglich, dass Dpp einen Einfluss auf die endogene *pouch* Expression von *Doc* hat. Im Bereich von DocF7 wurde ebenfalls ein Aktivierungselement gefunden (AE7) (Weiss et al., 2010). Eine Überprüfung von AE7, beispielsweise durch eine Mutation, ist aber noch nicht erfolgt.

### 3.2.2 *hairy (h)*

In den Beinen von *Drosophila* sind Gruppen kleiner mechanosensorischer Borsten in longitudinalen Reihen angeordnet. Das dabei entstehende Muster hängt von der räumlich periodischen Expression des Gens *hairy* und der proneuralen Gene *achaete (ac)* und *scute (sc)* ab. Die *ac/sc* Expressionsdomänen werden dabei durch den Repressor Hairy begrenzt (Kwon et al., 2004; Orenic et al., 1993). *hairy* wird in der Beinimaginalscheibe in einem räumlich begrenzten Streifen entlang der dorsoventralen Achse exprimiert. Hays et al. beschrieben ein neun Kilobasen großes *enhancer* Element, das diese Expression kontrolliert und in dem mehrere *upstream* Signale unter anderem von Dpp, Wg und Hh integriert werden (Hays, 1999). Dieses Element enthält einen dorsalen (D-*h*) und einen ventralen *enhancer* (V-*h*) (**Abbildung 3.16**), die die Expression in den entsprechenden Domänen in der Beinscheibe kontrollieren.



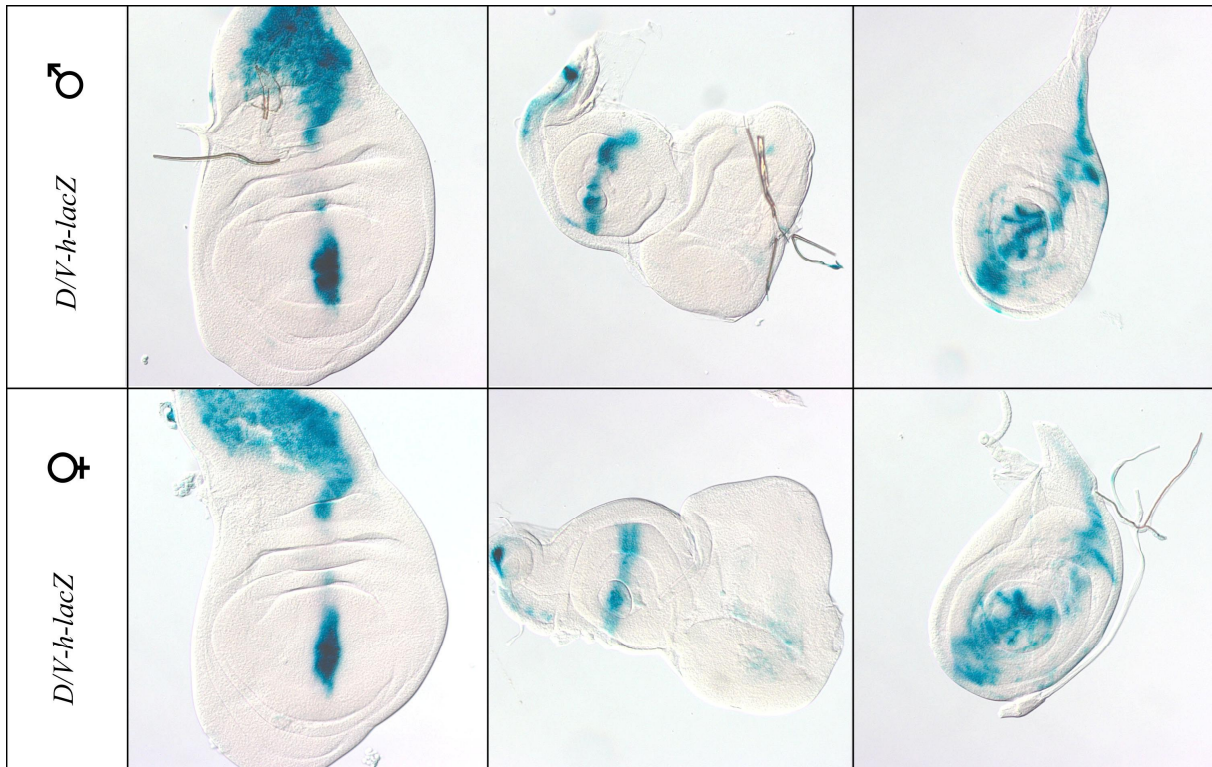
**Abbildung 3.16 Karte des D/V-*h-lacZ* enhancer 30 kb downstream der *h* Transkriptionseinheit.**

In der zweiten Reihe der Abbildung befindet sich eine detailliertere Karte des 9 kb großen D/V-*h* Elements ((Hays, 1999). Großbuchstaben stehen für Restriktionsschnittstellen, z.B. S für Sall (S in Klammern: artifizielle Schnittstelle).

Während auch Hairy Domänen in der Augen-Antennenscheibe entdeckt wurden, ist über eine Expression in der larvalen Flügelimaginalscheibe, bis auf eine Expression in der Notum Region, die nach anterior abnimmt (Usui et al., 2008) nichts bekannt.

### **3.2.2.1 D/V-h[9kb]**

In einer von T. Orenic zur Verfügung gestellten *enhancer-reporter* Linie, die den *D/V-h-lacZ* (9 kb) *Beinenhancer* trägt, wurde eine bis jetzt nicht beschriebene Expressionsdomäne in der Flügel*pouch* und der Antennenscheibe gefunden. Wie man in **Abbildung 3.17** erkennen kann, erstreckte sich die *pouch*-Domäne entlang der A/P Kompartimentsgrenze. Die in der Antennenscheibe gezeigte Expression verlief in einem Streifen entlang der A/P Achse. Die Expression in der Beinimaginalscheibe dagegen wurde in der Literatur schon gut untersucht und ließ sich hier reproduzieren. In Anbetracht der Überlappung der Domänen von *Omb* und von *D/V-h-lacZ* in der Flügel*pouch* und der dorsalen Beinscheibe war eine Interaktion nicht auszuschließen und sollte daher analysiert werden. Um das X-chromosomale *D/V-h-lacZ* mit einem *omb* Nullallel zu kombinieren, mussten die entsprechenden Stämme gekreuzt und die Nachfolgeneration auf ein positives Rekombinationsereignis untersucht werden (siehe 2.2.21.2). Aus zeitlichen Gründen konnte dieses Experiment leider nicht mehr beendet werden.



**Abbildung 3.17 X-Gal ÜN Färbung von L3 Imaginalscheiben des Stammes 560 (*D/V-h-lacZ*).** 1. und 2. Reihe: *D/V-h-lacZ*<sup>+/+</sup>. Die Expression in der Flügelpouch erstreckt sich entlang der A/P Grenze. Während das Muster in den Beinscheiben typisch für *D/V-h* ist, konnte in der Antennenscheibe ein bis jetzt nicht beschriebenes Muster entdeckt werden. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

### 3.2.2.2 Diskussion

In der Beinimaginalscheibe wird *h* entlang der A/P Kompartimentsgrenze exprimiert. Hays und Kollegen (1999) konnten zeigen, dass für diese Expression Signale von Hh, Dpp und Wg integriert werden müssen. Der hier untersuchte *D/V-h-lacZ enhancer* enthält die für diese Regulation notwendigen cis-regulatorischen Elemente und zeigt deshalb wie erwartet die beschriebene Expression in Beinimaginalscheiben. Die Tatsache, dass außerdem in Flügelscheiben eine Expression nahe der A/P Grenze gefunden wurde, die offensichtlich sowohl im dorsalen als auch im ventralen Kompartiment liegt, deutet daraufhin, dass der *enhancer* hier auch Einflüssen aus A/P und D/V Musterbildungsmechanismen unterliegen könnte. In *invected* wurde ein Omb-abhängiger *enhancer* identifiziert, dessen Expressionsmuster in der Flügelimaginalscheibe Ähnlichkeit mit dem hier

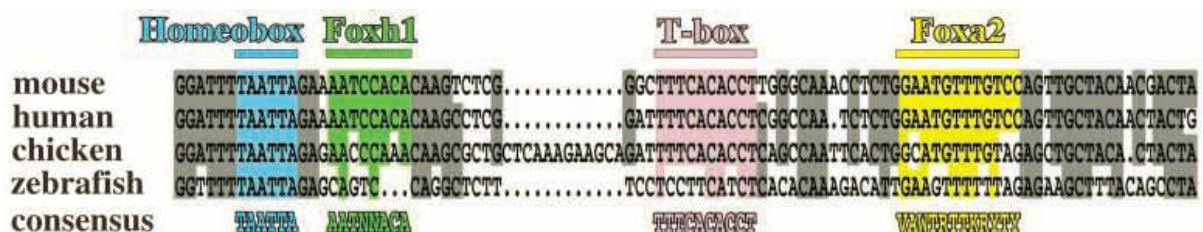
beschriebenen aufweist. Ob dies Gemeinsamkeiten in der Regulation widerspiegelt muss durch weitere Untersuchungen gezeigt werden.

### 3.2.3 hedgehog (*hh*)

Hh wird in Zellen des posterioren Flügelscheibenkompartiments sezerniert und induziert als *short-range* Signal die Musterbildung der zentralen Flügelregion (Burke and Basler, 1997; Mullor et al., 1997). Dabei ist es nur in A-Zellen aktiv, da sein Rezeptor Ptc nicht in Zellen des P-Kompartiments exprimiert wird. Die Bindung an Ptc führt schließlich zur Aktivierung von Cubitus interruptus (Ci) in A-Zellen nahe der A/P Grenze und damit zur Transkription von Hh Zielgenen ((Lum and Beachy, 2004)), wie z.B. *dpp*. In Augenscheiben wird *hh* am posterioren Rand exprimiert und ist an der Initiation der Morphogenetischen Furche (MF) beteiligt. Daraufhin induziert es die Differenzierung anteriorer Zellen zu Photorezeptorzellen (Roignant and Treisman, 2009). Photorezeptorzellen beginnen dann mit der Expression von *hh* und können so ihrerseits weiter anterior gelegene Zellen veranlassen, sich zu differenzieren (Heberlein, 1995).

#### 3.2.3.1 *hh*[6,2kb]

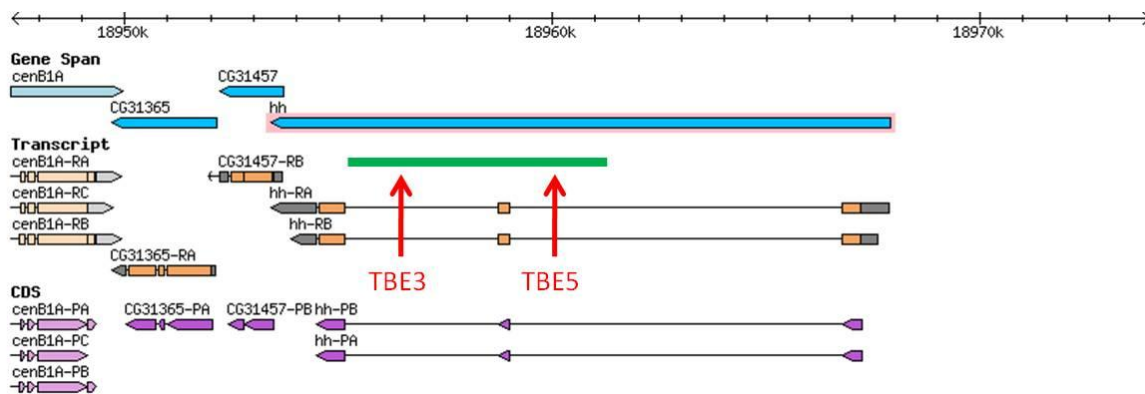
Im Gen *hh* wurden 2 TBEs gefunden, die aufgrund ihres relativ hohen PWM Werts von 8,46 (TBE 3) und 9,66 (TBE 5) und ihrer fast vollständigen Konservierung in allen Drosophiliden auffallen. TBE 5 war besonders interessant, da eine TBE der gleichen Sequenz und eine benachbarte Homeodomän Bindestelle auch in dem Säuger Homolog *shh* konserviert sind (**Abbildung 3.18**).



**Abbildung 3.18** Alignment einer Homologieregion von Vertebraten *hh* Genen. Konservierte Sequenzen sind grau markiert. DNA Erkennungssequenzen stimmen mit den Konsensus Sequenzen für Homeobox (blau), Foxh1 (grün), T-Box (pink) und Foxa2 (gelb) überein. Die TBE und die

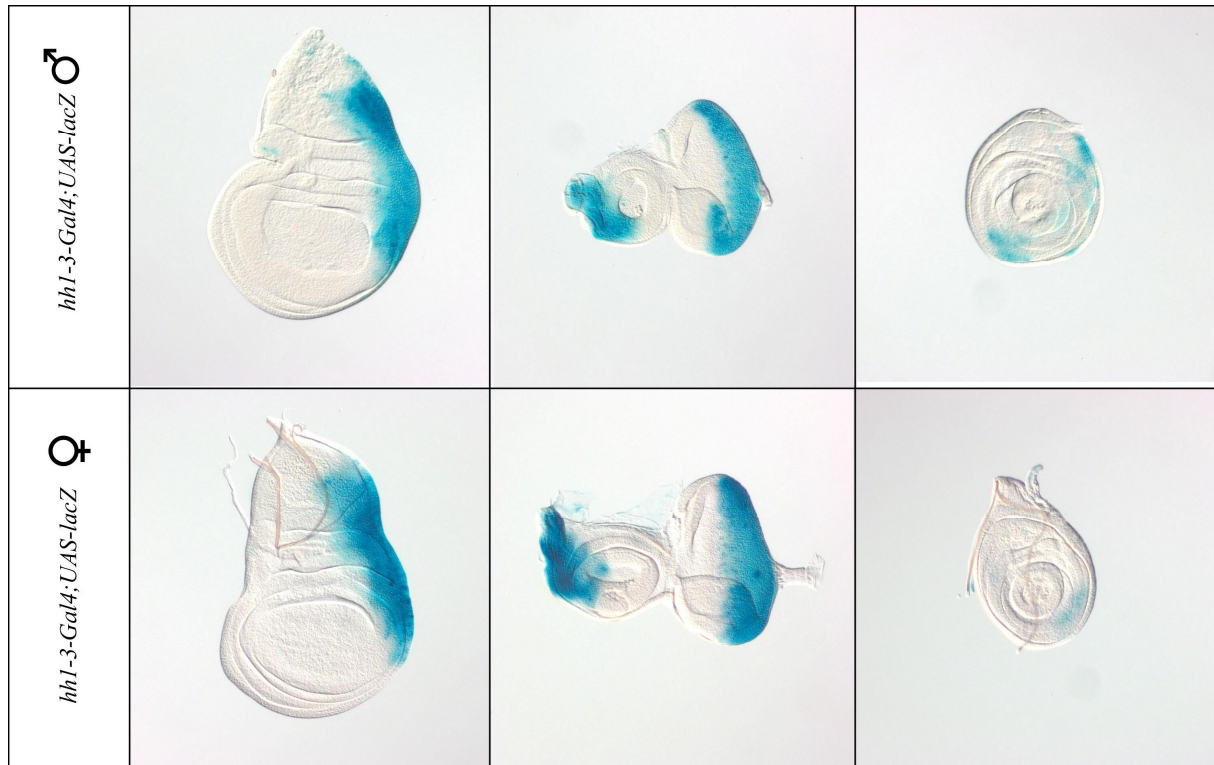
Homeobox Bindestelle wurden auch im *Drosophila hh* Gen gefunden. (Abbildung nach Jeong et al. 2003).

Es konnte nachgewiesen werden, dass diese beiden Bindestellen Teil eines für die Maus wichtigen *shh enhancers* sind (Jeong and Epstein, 2003). Die Spezies übergreifende Homologie dieses *enhancers* und der Nachweis seiner Funktionalität in der Maus gaben einen Hinweis darauf, dass es sich hier auch um einen in *Drosophila* wichtigen regulatorischen Bereich für *hh* handeln könnte. Aus diesem Grund wurde ein 6,2 kb großer Bereich, der die bereits erwähnten TBEs 3 und 5 enthält (**Abbildung 3.19**), in einen *enhancer-reporter* Vektor (*pBPGUw*, 2.2.18) kloniert und transgen gemacht.



**Abbildung 3.19 Genkarte des *hh*-Locus (blau) mit Transkripten auf Chromosom 3R.** Der grüne Balken symbolisiert das klonierte 6,2 kb *enhancer* Fragment, das das 2. Intron, das 2. Exon und Teile des 1. Introns umfasst. Die roten Pfeile weisen auf das Vorhandensein zweier konservierter TBEs mit hohen PWM-Werten (TBE3: 8,46 und TBE5: 9,66).

Die Auswertung der Stämme 1107 und 1120 ergab jeweils gleiche Färbungsmuster in Flügel- und in Augenantennenscheiben (**Abbildung 3.20**). Flügelscheiben zeigten eine Färbung in einem dorsalen Streifen am posterioren Rand. Augen- und Antennenscheiben waren an ihren posterioren Rändern durchgehend gefärbt. Eine Kombination mit dem *l(1)omb<sup>15</sup>* Allel, um heraus zu finden, ob ein Omb Verlust eine Veränderung der transkriptionellen Aktivität verursachen kann, ist bislang noch nicht zufriedenstellend analysiert worden. Die Färbung eines Teils der endogenen Hh Domäne in Flügelscheiben zeigt, dass es sich bei *hh[6,2kb]* um einen Teil des *hh*-Flügel*enhancers* handeln kann. Offensichtlich besitzt dieser *enhancer* zusätzlich eine Funktion bei der Aktivierung der Hh Domäne in der Augenantennenscheibe.



**Abbildung 3.20 X-Gal ÜN Färbung von L3 Imaginalscheiben des Stammes 1107 und 1122 (*hh[6,2kb]-Gal4*).** 1. Reihe: Stamm 1122 (*+/+;UAS-lacZ;hh1-3-Gal4*). 2. Reihe: Stamm 1107 (*+/+;UAS-lacZ;hh1-3-Gal4*). Sowohl in Flügel- als auch in Augenantennenscheiben sind dorsale Strukturen gefärbt. Nur in Augenscheiben erstreckt sich diese Färbung über die gesamte D/V Ausdehnung der Scheibe. (nach F. Eichinger) (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

### 3.2.3.2 Diskussion

Die Expression des *hh[6,2kb]-lacZ* Transgens zeigt, dass dieser *enhancer*-Bereich das Potential hat, die endogene Expression in der Augenscheibe und einem Teil der endogenen Domäne der Flügelscheibe zu induzieren. Da das 3' Ende des Fragments bereits Teil des dritten Exons ist, könnte es sein, dass die fehlende für die Aktivierung der gesamten Hh-Flügelscheibendomäne notwendige Sequenz *upstream* in Intron 1 liegt.

*Upstream* von *hh[6,2kb]* wurde ein Augen-spezifischer *enhancer* mit Bindestellen für den ETS-Domänen Faktor Pointed gefunden, die für die Regulation dieses *enhancers* notwendig sind. Dieser *enhancer* mit einer Minimalgröße von 203 bp ist, in Übereinstimmung mit dem endogenen Expressionsmuster in allen Photorezeptorzellen außer R8 aktiv (Rogers et al., 2005). Ob dies auch für den hier



beschriebenen *enhancer* gilt, wurde noch nicht untersucht. In *hh* Intron 1 wurden zwei Sine Oculis (SO) Bindestellen beschrieben, von denen eine (SO1) im 203 bp *enhancer*, die andere (SO2) im 6,2 kb Fragment liegt. SO1 ist für die Enhanceraktivität essentiell (Pauli et al., 2005; Rogers et al., 2005). SO2 könnte für die Augenexpression von *hh[6,2kb]* verantwortlich sein. Überraschenderweise zeigte aber *hh<sup>fse</sup>* (*hh<sup>furrow stops early</sup>*), ein weiteres von Rogers und Kollegen hergestelltes Fragment, nur eine schwache Expression in 2 von 7 transgenen Linien. Dieses Fragment überlappt fast vollständig mit der ersten Hälfte des 6,2 kb Fragments, in der SO2 und TBE5 liegen. Das bedeutet, dass der restliche Teil von *hh[6,2kb]* Sequenzen enthalten muss, die für die Expression posterior der morphogenetischen Furche erforderlich sind. Ob *hh* im Auge durch zwei redundante *enhancer* kontrolliert wird, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die TBE der Maus (**Abbildung 3.18**), deren Sequenz mit der von TBE5 übereinstimmt, ist für eine Repression von *shh* in der ventralen Mittellinie des rostralen Diencephalon erforderlich (Jeong and Epstein, 2003). Es ist somit vorstellbar, dass TBE5 in *Drosophila* bei der Regulation von *hh* eine ähnliche Funktion besitzt. Dass Omb zumindest in der Augenimaginalscheibe der entscheidende Faktor für diese Repression sein könnte, dafür sprechen zwei Befunde. Erstens hemmt Omb die retinale Differenzierung und zweitens führte eine ektopische *omb* Expression am posterioren Rand zur Repression von *hh-lacZ* (Pflugfelder, unveröffentlicht).

### 3.2.4 *invected (inv)*

Selektorgene wie *inv* werden schon früh in den Vorläuferzellen exprimiert, aus denen später ein Kompartiment entsteht. Sie kontrollieren aber nicht nur die Bildung einer solchen Zelllinie sondern sorgen durch ihre ständige Expression auch für den Erhalt ihres Zellschicksals. Beides hat zur Folge, dass diese Zellen eine Kompartiment-spezifische Identität bekommen und sich nicht mit Zellen eines anderen Kompartiments vermischen (Blair and Ralston, 1997). Im Fall von *inv* betrifft dies posteriore Zellen. *inv* kodiert für einen Homeobox Transkriptionsfaktor, der dem von *En* sehr ähnlich ist und selektiert posteriores Schicksal (Coleman et al., 1987). *En/Inv* ermöglicht die Expression von *hh* in posterioren Zellen und kontrolliert gleichzeitig die

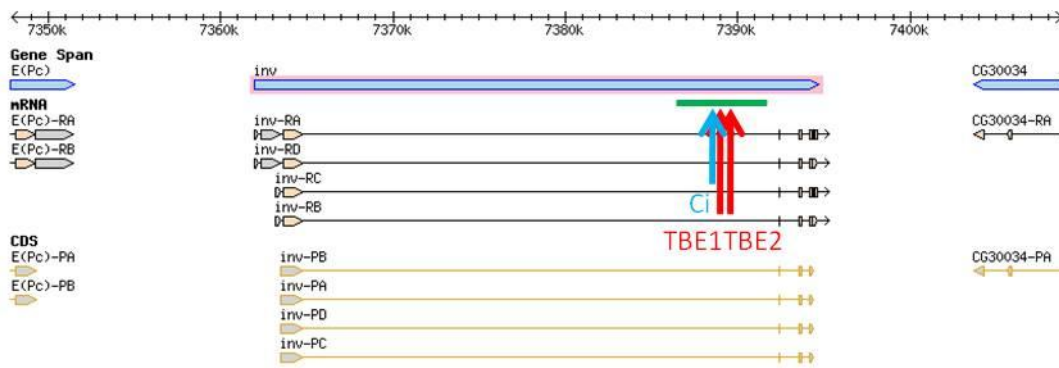
Hh Signaltransduktion indem es den Transkriptionsfaktor Ci reprimiert. *Inv* und *en* sind benachbarte Gene, die konvergent transkribiert werden. Die *en* Transkriptionseinheit liegt etwa 15 kb *downstream* der von *inv*. *Inv* Mutanten sind lebensfähig und phänotypisch normal mit Ausnahme eines kleinen Defektes der vorderen Quervene (*anterior crossvein*, ACV). Dagegen sind *en* Mutanten embryonal lethal. *En/inv* Doppelmutanten zeigen einen stärkeren Phänotyp als *en* Mutanten. Im Embryo zeigen beide Gene die gleiche Expression, die unter der Kontrolle gemeinsamer Regulationselemente steht (Gustavson et al., 1996). Die Rolle von *En* und *Inv* in der Flügelentwicklung sind nicht äquivalent. Ektopische Expression von *En* in A bewirkt die ektopische Aktivierung von *hh* und die Ausbildung eines ektopischen Organisators, während ektopische Expression von *Inv* das Schicksal von A-Zellen zu P respezifiziert. Eine P zu A Transformation erfordert den Verlust beider Gene (Simmonds et al., 1995).

In der Flügelentwicklung ist *En* bis zur Mitte des dritten Larvenstadiums auf das P Kompartiment beschränkt, dehnt seine Expression dann aber auf benachbarte Zellen des A Kompartiments aus (Blair, 1992). *Inv* hat eine ähnliche Verteilung (Guillen et al., 1995). Es ist allerdings nicht bekannt, ob *Inv* im späten L3 Stadium ebenfalls anterior expandiert. *En* Expression in A steht unter negativer Kontrolle von Groucho (de Celis and Ruiz-Gomez, 1995). Die späte anteriore Expression von *En* scheint notwendig zu sein, um in einem schmalen Streifen von A-Zellen *polyhomeotic* (*ph*) zu aktivieren, das seinerseits die ektopische A-Expression von *hh* unterdrückt (Maschat et al., 1998).

#### **3.2.4.1 *inv*[5,3kb]**

In einem 5,3 kb großen intronischen Sequenzabschnitt der *inv* Transkriptionseinheit wurde ein *high-score* TBE Cluster gefunden, dessen Expression in Flügelimaginalscheiben untersucht und auf Omb Abhängigkeit getestet wurde (**Abbildung 3.21**). Nach ersten X-Gal Färbungen stellte sich heraus, dass alle unabhängigen transformanten Fliegenlinien dieses Konstruktes keine oder nur eine sehr schwache Reporterexpression im wildtypischen Hintergrund aufwiesen. Da aber für *en/inv* eine späte Expression in der Flügelpouch anterior der A/P Grenze

gefunden wurde (Blair, 1992), wurde das *inv* Fragment auch in späten L3 Stadien untersucht.



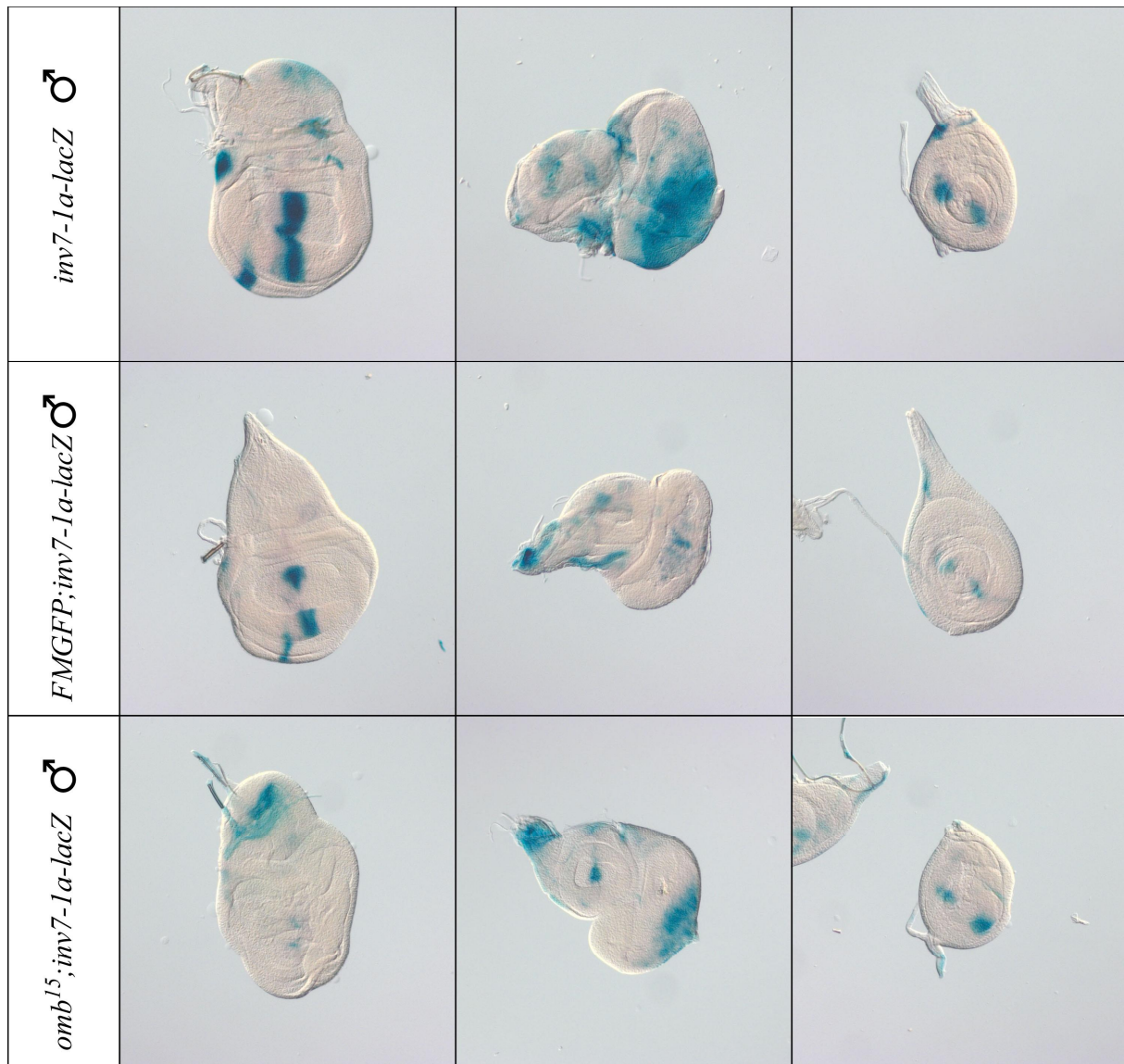
**Abbildung 3.21 Genkarte des *inv*-Locus mit Transkripten auf Chromosom 2R.** Der grüne Balken symbolisiert das klonierte 5,3 kb *enhancer* Fragment aus intronischer Sequenz. Die roten Pfeile weisen auf das Vorhandensein zweier konservierter TBEs mit hohen PWM-Werten (TBE1: 9,66 und TBE2: 8,39). 200 bp *upstream* von TBE1 wurde eine gut konservierte Ci (blau) Bindestelle gefunden (Kornberg et al., 2010).

Tatsächlich zeigte die Analyse von homozygoten Tieren des Stammes *inv7-1a* im späten L3 Stadium (>100 h nach Eiablage) eine deutliche Expression in Flügelscheiben entlang der A/P Grenze, in der ventralen *Pleura/hinge* Region und in einer anterioren Domäne der dorsalen *hinge*. Die Position der letzteren Domäne legt nahe, dass hier Zellen an der A/P-Grenze am Übergang zur Peripodialmembran gefärbt sind (**Abbildung 3.22**). Daneben konnte nur noch in Beinscheiben ein reproduzierbares Muster aus zwei punktförmigen Domänen entdeckt werden. Im Vergleich zum Wildtyp konnte in *omb* mutanten Tieren keine Färbung der Flügelscheiben mehr beobachtet werden (**Abbildung 3.22** 3. Reihe). Dies kann bedeuten, dass durch den *Omb* Verlust eine Aktivierung dieses Fragmentes ausbleibt.

Die punktförmige Expression in den Beinimaginalscheiben blieb dagegen in *l(1)omb* erhalten.

Reduktion oder Verlust der posterioren *omb* Expression bewirkt in der Flügelimaginalscheibe die Ausbildung einer Falte entlang der A/P Grenze (Shen, 2008). Es ist daher denkbar, dass das Verschwinden der anterioren *inv-lacZ* Expression ein indirekter Effekt des *Omb*-Verlustes im posterioren Kompartiment ist. Es sollte überprüft werden, ob die selektive Reduktion der *omb* Expression in P

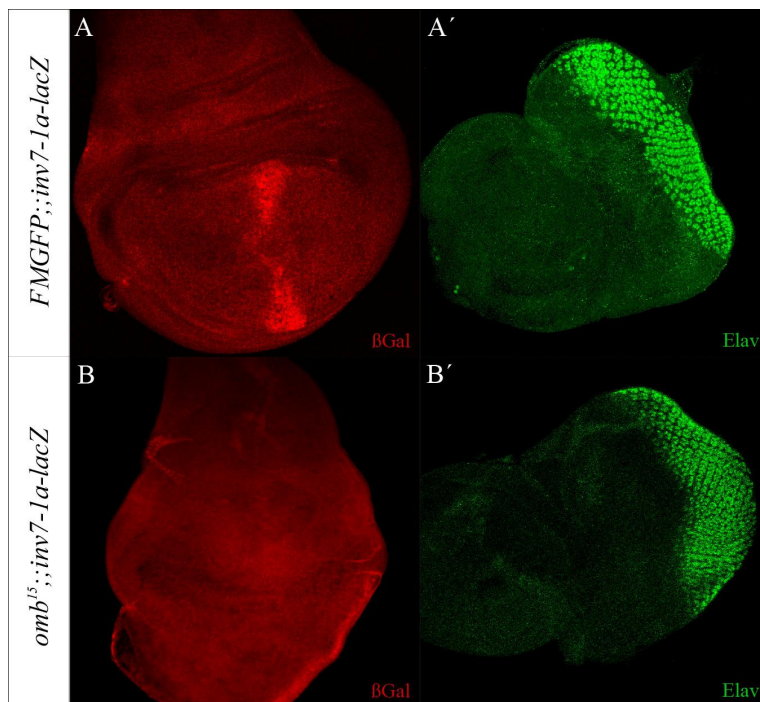
ebenfalls zu einem Verlust der anterioren *inv-lacZ* Expression führen kann. Umgekehrt, sollte die Wirkung von *ptc>omb*-RNAi untersucht werden. Erst dann macht auch eine Mutation der TBEs Sinn, um einen direkten Einfluss von Omb zu untersuchen.



**Abbildung 3.22 X-Gal ÜN Färbung von Imaginalscheiben des Stammes *inv7-1a-lacZ* im späten L3 Stadium.** 1. Reihe: *+/+; inv7-1a-lacZ/inv7-1a-lacZ*. 2. Reihe: *FMGFP/Y; inv7-1a-lacZ/+*. 3. Reihe: *I(1)omb<sup>l5</sup>/Y; inv7-1a-lacZ/+*. Das im Wildtyp gefundene Streifenmuster in der Flügelpouch verschwand in *omb<sup>0</sup>*. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

Der Expressionsverlust des *inv7-1a-lacZ* Transgens warf die Frage auf, ob es sich bei den hier präparierten Scheiben um das gleiche Stadium handelte, wie bei den Kontrollscheiben. Aufgrund der langsameren Entwicklung der *I(1)omb* Larven gibt

das chronologische Alter der Tiere keinen verlässlichen Hinweis auf das Entwicklungsstadium. Man kann daher nicht mit Sicherheit sagen, ob die fehlende Expression des Transgens auf einen *omb* Verlust zurück zu führen war oder ob es aufgrund des frühen Stadiums einfach noch nicht zu einer Aktivierung des spät regulierten *enhancers* kam. Um dies klären zu können, wurden neben Antikörperfärbungen an Flügelscheiben auch Färbungen von Photorezeptoren in Augenscheiben zur Bestimmung des Alters durchgeführt.

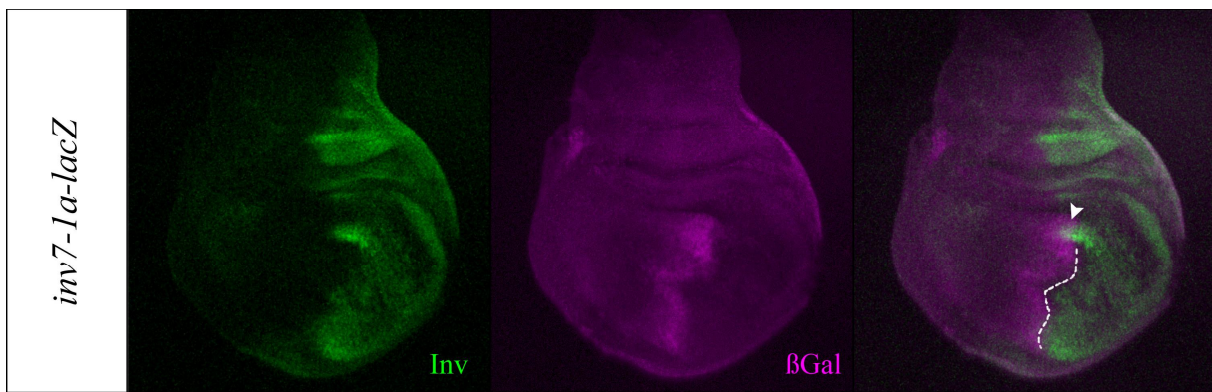


**Abbildung 3.23** *lacZ* Expression in L3 Flügelimaginalscheiben und *elav* Expression in Augenimaginalscheiben des Stammes *inv7-1a-lacZ*. In **A,A'** (*FMGFP/Y;;inv7-1a-lacZ/+*) und **B,B'** (*(1)omb<sup>15</sup>/Y;;inv7-1a-lacZ/+*) sind jeweils Scheiben einer Larve zu sehen. **A** und **B** zeigen eine anti- $\beta$ Gal Färbung und **A'** und **B'** eine anti-Elav Färbung der Photorezeptoren. Die wildtypische *lacZ* Expression in **A** taucht in *omb* mutanten Flügelscheiben (**B**) des gleichen Entwicklungsstadiums nicht auf. Anterior ist links und dorsal ist oben.

Für die Färbung der Photorezeptoren wurde der monoklonale Maus AB  $\alpha$ -Elav verwendet. Zum Nachweis der *inv7-1a-lacZ* Expression diente der monoklonale Huhn AB  $\alpha$ - $\beta$ Gal. (2.1.3.10) Auf diese Weise war es möglich, wildtypische Scheiben einer L3 Larve mit Scheiben einer *omb* Larve des gleichen Entwicklungsgrades zu vergleichen. Wie man in **Abbildung 3.23** erkennen kann, konnte die Expression von *inv7-1a-lacZ* in der *omb* Flügelscheibe im Vergleich zur wildtypischen des gleichen

Stadiums nicht detektiert werden. In beiden Fällen wurden sieben Photorezeptorreihen in den Augenscheiben gezählt. Damit ließ sich das Fehlen des *inv7-1a-lacZ* Musters eher einem *omb* Verlust zuschreiben als einer Inaktivität des *enhancers* zu diesem Zeitpunkt der larvalen Entwicklung. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass *Omb* bei der Regulation des *inv7-1a enhancers* eine aktivierende Funktion übernimmt.

Abschließend konnte durch eine  $\alpha$ -*Inv*/ $\alpha$ -*lacZ* (2.1.3.10) Doppelfärbung gezeigt werden, dass *inv7-1a-lacZ* in einem Zellstreifen entlang der A/P Grenze exprimiert wird (**Abbildung 3.24**).



**Abbildung 3.24** *lacZ* und *inv* Expression in einer L3 Flügelimaginalscheibe des Stammes *inv7-1a-lacZ*.  $\alpha$ -*Inv* und  $\alpha$ - $\beta$ Gal Doppelfärbung. *lacZ* wird in einem anterioren Zellstreifen nahe der A/P Grenze exprimiert. Anterior ist links und dorsal ist oben. Die gestrichelte Linie symbolisiert die A/P Grenze. Die Pfeilspitze deutet auf einen Bereich, an dem *inv* und *lacZ* koexprimiert werden.

### 3.2.4.2 Diskussion

Es ist möglich, dass die von Blair (Blair, 1992) beschriebene späte *en/inv* Expression auf die Aktivität des hier gefundenen *enhancer* Bereichs zurück zu führen ist. Allerdings ist es interessant, warum zum gleichen Zeitpunkt nicht auch die endogene, anteriore *inv* Expression detektiert werden konnte. Eine Erklärung ist, dass hier nur ein Teil des eigentlichen *enhancers* kloniert wurde und dadurch *silencer* Elemente verloren gegangen sind, die normalerweise erst zu einem noch späteren Zeitpunkt eine Aktivierung zugelassen hätten. Demnach müsste sich in späteren L3 Flügelimaginalscheiben eine Überlappung der Expression von *inv* und *inv7-1a* zeigen lassen können. Tatsächlich konnte bereits an einem L3 Präparat an einer Stelle eine Coexpression innerhalb des zukünftigen Flügelblattes beobachtet werden

(**Abbildung 3.24** Pfeilspitze). Um dies zu bestätigen sind weitere Färbungen an späten L3 Larven notwendig.

Wiewohl hier nicht untersucht, legt die Expression von *inv[5.3]-lacZ* in der Flügelimaginalscheibe nahe, dass sie unter positiver Kontrolle von Hedgehog (Hh) steht. Für zwei bekannte Hh Zielgene in der Flügelimaginalscheibe, die ein ähnliches Expressionsmuster wie *inv[5.3]-lacZ* in der *pouch* aufweisen, *dpp* und *knot*, wurde gezeigt, dass der Hh-Signalinput zur Aktivierung nicht ausreicht, und dass akzessorische Faktoren notwendig sind (Vestigial für *dpp* und Ataxin-2 Binding Protein 1 für *knot*, (Hepker, 1999; Shashidhara and Usha, 2010)). Eine ähnliche Beobachtung wurde für das Gen *Impl2* gemacht, dessen Hh-abhängige Expression in der Tracheenentwicklung den bHLH-PAS Transkriptionsfaktor Trachealess benötigt (Kornberg et al., 2010).

Biehs et al. (Kornberg et al., 2010) suchten mittels der DamID Methode nach mutmaßlichen Zielgenen von Cubitus interruptus (Ci, der DNA-bindende Effektor des Hh Signalweges). Die gebundenen DNA-Regionen wurden danach auf mögliche Ci Bindungsstellen untersucht. Eine stark konservierte Ci Bindungsstelle befindet sich 200 bp *upstream* von TBE1.

Schon die Arbeit von Hidalgo und Kollegen (Hidalgo, 1994) zeigte, dass *en/inv* nicht nur die Funktion hat Zellen eine posteriore Identität zu verleihen. *En/inv* ist außerdem für die korrekte Musterbildung des Flügelsaums erforderlich. Hier verhindert es die Bildung innervierter Borsten zwischen der dritten und vierten longitudinalen Vene. Diesen Phänotyp beobachtet man auch, wenn *omb-RNAi* in diesem Bereich exprimiert wird (*dpp>omb-RNAi* oder *ptc>omb-RNAi*, Pflugfelder, unveröffentlicht), so dass eine fehlende *inv*-Aktivierung in diesen Genotypen für den Phänotyp verantwortlich sein könnte. Für *en* wurde eine späte anteriore Expression beschrieben (Blair, 1992; Hidalgo, 1994). Aufgrund der hier gefundenen Ergebnisse besteht die Möglichkeit, dass *inv* ebenfalls spät in einem anterioren Streifen exprimiert wird und so einen Teil zu dieser Funktion beiträgt. Dies sollte zum einen durch einen Proteinnachweis bestätigt werden. Zum anderen müsste gezeigt werden, ob die von Hidalgo beschriebene Transformation posteriorer Borsten zu anterioren durch eine exogene Zugabe von *inv* gerettet werden kann.

Omb scheint auch für das Segregationsverhalten von A-Zellen im Zentrum der *pouch* verantwortlich zu sein. Das zeigen omb- Klone anterioren Ursprungs nahe der A/P Grenze, die sich innerhalb des P-Kompartiments platzieren und sich dort nicht mit P-Zellen vermischen (Shen and Dahmann, 2005). Ob auch *inv* in A-Zellen für ein solches Verhalten wichtig ist, wurde noch nicht untersucht. *En-/inv*- doppelmutante Klone wiesen zumindest teilweise ein ähnliches Segregationsverhalten auf (Blair and Ralston, 1997).

Interessant im Zusammenhang mit der oben beschriebenen späten Aktivierung von *inv*[5,3kb] ist der Befund einer Untersuchung zur Abhängigkeit des *en* Promotors von weit entfernten *enhancer* Elementen (Kassis et al., 2009). Für diesen Test wurden P-Element Insertionen des *en* Promotors mit unterschiedlichen Abständen zu den bekannten *en enhancer* Elementen erzeugt. Die Insertion *P[enHSP1]+28kb* liegt im ersten Intron von *inv* und gleichzeitig innerhalb des *inv*[5,3kb] Fragments. Sie zeigte eine Reporter-gen Expression in einem Teil *en*-exprimierender Zellen in der *pouch*, die erst spät aktiviert wurde. Es lässt sich nur spekulieren, ob bei dieser Aktivierung cis-regulatorische Sequenzen des *inv*[5,3kb] Fragments eine Rolle gespielt haben. Von Kassis und Kollegen wird dagegen eine Kommunikation mit den *en-enhancer* Elementen präferiert, die mindestens 20 kb entfernt *upstream* der *en* Transkriptionseinheit vermutet werden.

### 3.2.5 *mirror* (*mirr*)

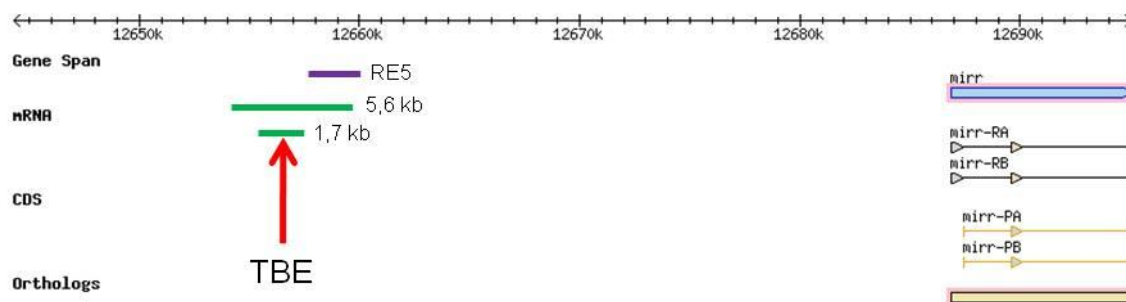
Das *Drosophila* Gen *mirr* kodiert für einen Homeobox Transkriptionsfaktor und gehört neben *araucan* und *caupolican* zum *iroquois* Komplex (Iro-C). Es konnte gezeigt werden, dass *mirr* für die Bildung der Alula und für einen Teil der sensorischen Notum-Borsten notwendig ist (Kehl et al., 1998). In *mirr* Mutanten werden diese Teile des Flügels nicht ausgebildet. In Flügelimaginalscheiben wird *mirr* im Heminotum, der ventralen Pleura, der Alula und der L1 Vene exprimiert. Die Expression in der Alula scheint für die späte Aktivierung von *dpp* in L3 Larven notwendig zu sein (Foronda et al., 2009). Durch eine Interaktion mit dem Gen *msh*, dessen Expression komplementär ist, findet eine Festlegung der Grenze zwischen Körperwand und Flügel statt (Villa-Cuesta and Modolell, 2005). Eine klonale Analyse deutet daraufhin, dass eine Aposition von Iro-C exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen zu



deren räumlichen Trennung führt und dies eine Faltenbildung des Epithels begünstigen kann, wie sie z.B. an der *notum/hinge* Grenze stattfindet (Villa-Cuesta et al., 2007). Ein ähnliches Phänomen ist von *omb* bekannt. Experimente bei denen das *Omb* Level in Zellen des P-Kompartiments nicht aber in denen des A-Kompartiments reduziert wurde führen zu einer Faltenbildung entlang der A/P Grenze (Shen, 2008).

### 3.2.5.1 *mirr*[5,6kb]

In einer Distanz von etwa 30 kb *upstream* der *mirr* Transkriptionseinheit wurde ein 5,6 kb großer nichtkodierender, genomischer DNA Bereich ausgewählt, der auf eine Regulation durch *Omb* untersucht wurde. Der Hinweis auf dieses Fragment ergab



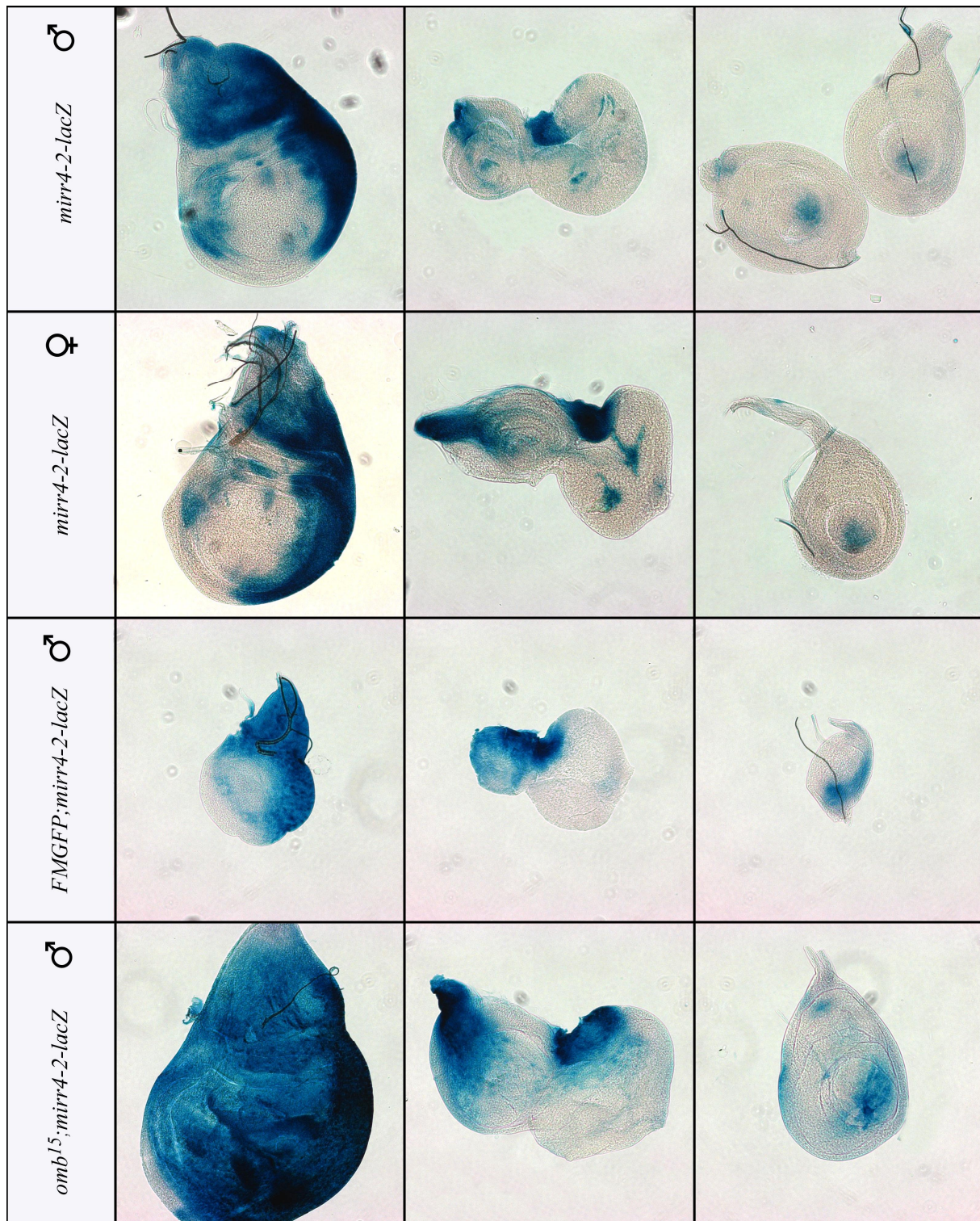
**Abbildung 3.25 Genregion des *mirr*-Locus mit Transkripten auf Chromosom 3L.** Der obere und untere grüne Balken symbolisiert ein kloniertes 5,6 kb und 1,7 kb *enhancer* Fragment aus nichtkodierender Sequenz 30 kb *upstream* von *mirr*. Der rote Pfeil weist auf das Vorhandensein einer voll konservierten TBE. Im Bereich des 5,6 kb Fragments wurde ein regulatorisches Element (RE5, lila) gefunden, das in Flügelscheiben aktiv ist, dessen Expressionsmuster aber nur wenig mit dem von *Mirr* übereinstimmt.

sich aus der Entdeckung einer in allen *Drosophiliden* konservierten TBE (**Abbildung 3.25**). Die Untersuchung von L3 Larven des Stammes *mirr4-2*, die das 5,6 kb Fragment transgen enthalten, zeigte eine *lacZ* Expression in den Flügelscheiben mit großer Ähnlichkeit zum endogenen *Mirr* Muster (**Abbildung 3.26**). Auch die bekannte Expressionsdomäne in der Augenscheibe konnte mit diesem Fragment reproduziert werden. Die Entdeckung einer derart „abgelegenen“ *cis*-regulatorischen Sequenz von *mirr* war ein Hinweis darauf, dass die Suche nach TBEs zu funktionell relevanten *enhancern* führen kann. In *omb* mutanten Flügelscheiben wurde eine erweiterte Expression von *mirr4-2-lacZ* gefunden, die sich zum Teil über die gesamte Scheibe

ausdehnte (Ausnahme: ventrale anteriore Pleura). Diese Daten deuten auf eine Repression des hier gefundenen *mirr* Flügelenhancers durch Omb.

### 3.2.5.2 *mirr*[1,7kb]

Als nächstes wurde aus dem oben beschriebenen 5,6 kb *enhancer*, zur genaueren Bestimmung seiner Ausdehnung, ein kleineres Subfragment (1,7 kb) ausgewählt, kloniert und schließlich transgen gemacht. Die Analyse dieses *enhancer reporters* ergab ein Muster, das mit dem des 5,6 kb *enhancers* vergleichbar war (**Abbildung 3.27**). In *omb*<sup>15</sup> Flügelscheiben schien die Intensität der Färbung deutlich zu zunehmen. Alle Expressionsdomänen (s.o.) waren davon betroffen. Außerdem schien es, als ob sich die Expression sowohl von dorsal als auch von posterior in Richtung der dorsalen *hinge* Region ausbreitete. Ein Fehlen dieser Region als Ursache könnte dafür in Frage kommen, lässt sich aber nur mit entsprechenden *hinge* Markern überprüfen. Ventral zeigte sich ebenfalls eine Expansion der *lacZ* Expression. Dabei handelt es sich um eine Domäne, die sich in der Nähe der wildtypischen *omb* Expression in der Pleura befindet. Das hier gefundene Muster unterschied sich quantitativ stark von dem in *omb* mutanten Scheiben des Stammes *mirr4-2* (**Abbildung 3.26**). Im Vergleich zu anderen transformanten Stämmen des 5,6 kb Fragments (z.B. *mirr3-1* (nicht gezeigt)) war dieser Unterschied jedoch deutlich geringer. Qualitativ stehen diese Ergebnisse in Einklang mit der Annahme, dass Omb reprimierend auf den untersuchten *enhancer* wirkt.

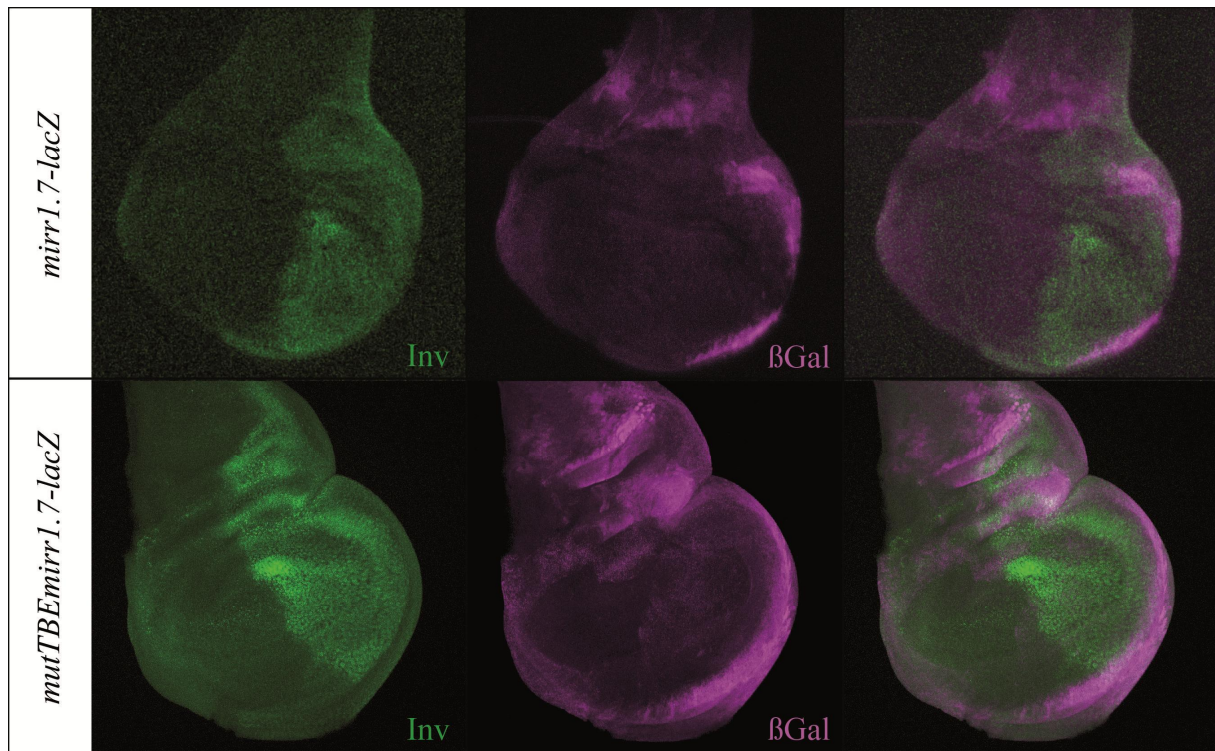


**Abbildung 3.26 X-Gal ÜN Färbung von Imaginalscheiben des Stammes *mirr4-2-lacZ*.** 1. und 2. Reihe: *+/+;;mirr4-2-lacZ/mirr4-2-lacZ*. 3. Reihe: *FMGFP/Y;;mirr4-2-lacZ/+*. 4. Reihe: *I(1)omb<sup>15</sup>/Y;;mirr4-2-lacZ/+*. In *omb<sup>0</sup>* zeigte sich eine drastische Überexpression des Transgens, die die gesamte Scheibe einnahm. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)



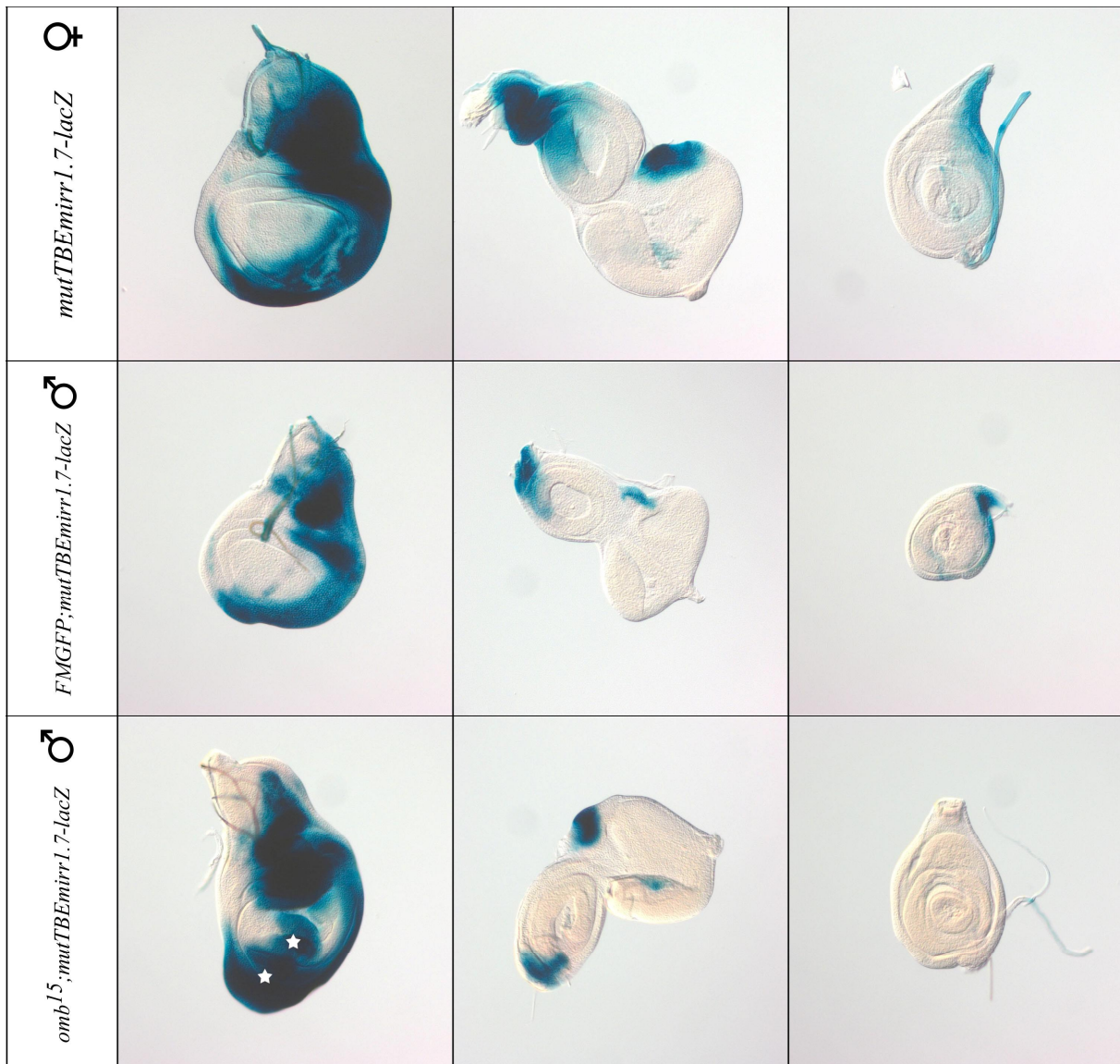
**Abbildung 3.27 X-Gal ÜN Färbung von Imaginalscheiben des Stammes *mirr1,7-lacZ*.** 1. und 2. Reihe: *+/+;mirr1,7-lacZ/mirr1,7-lacZ*. 3. Reihe: *FMGFP/Y;mirr1,7-lacZ/+*. 4. Reihe: *I(1)omb<sup>15</sup>/Y;mirr1,7-lacZ/+*. In *omb<sup>0</sup>* zeigte sich eine Expansion der Expressionsdomänen im Notum, in der Alula und der ventralen Pleura. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

Wie bereits erwähnt wurde, befindet sich eine voll konservierte TBE innerhalb der untersuchten *mirr* Fragmente. Um die Relevanz dieser Bindestelle in Bezug auf die Regulation des *enhancers* durch Omb zu testen, wurde ihre Sequenz TCACACTT innerhalb des 1,7 kb Subfragments mit Hilfe einer mutagenen PCR (2.2.17.2) zu TCAGGCTT mutiert. Die ausgetauschten Basen betreffen dabei die Kernsequenz CAC. Das so hergestellte *mutTBE<sub>mirr</sub>1.7* Fragment wurde anschließend analog zu den vorangegangenen Fragmenten kloniert (*pH-Pelican*, 2.2.18) und zur Transgenese von *Drosophila* Embryonen benutzt. Die Erwartung an diesen *enhancer* war, dass aufgrund der mutierten TBE eine Bindung von Omb verhindert werden kann und sich dadurch eine Veränderung seiner Aktivität bewirken lässt. Diese sollte ähnlich derer sein, wie sie für die beiden wildtypischen TBE Fragmente im *omb* mutanten Hintergrund festgestellt wurde. Tatsächlich konnte in *mutTBE<sub>mirr</sub>1.7-lacZ* Flügelscheiben ein ähnlicher Effekt beobachtet werden. Es zeigte sich eine deutlich intensivierte Färbung der Expressionsdomänen im Heminotum, der Alula und der ventralen Pleura und eine Expansion dieser Domänen in anteriores Gewebe der dorsalen und der ventralen *hinge* Region (**Abbildung 3.28**, **Abbildung 3.29**). Zusätzlich weitete sich die Expression auch auf ventrale Bereiche der *pouch* aus. Nur ein Teil dieser Effekte lässt sich durch eine zellautonome Repression des *enhancers* durch Omb erklären, da *omb* im Notum nicht exprimiert wird. Daher sollte untersucht werden, ob auch nach der Mutation der TBE noch eine repressive Wirkung durch Omb bestand.

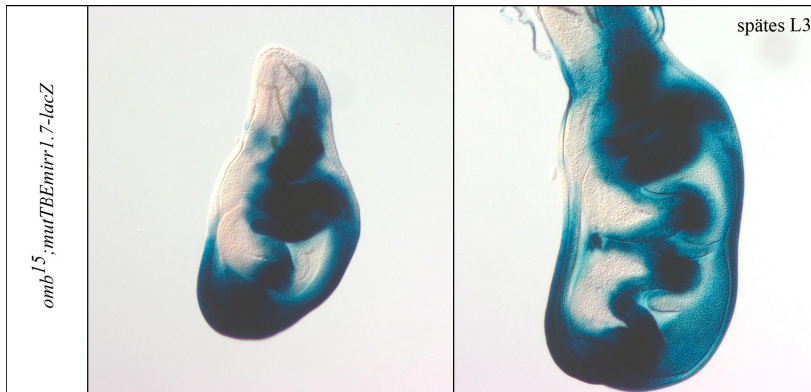


**Abbildung 3.28** Auswirkungen der TBE Mutation auf die Expression von *mirr1.7-lacZ* in L3 Flüglimaginalscheiben.  $\alpha$ -Inv und  $\alpha$ - $\beta$ Gal Doppelfärbung. Die Mutation der TBE bewirkt eine ektopische Expression des Transgens. Teile dieser Expression erstrecken sich bis ins anteriore Kompartiment. Anterior ist links und dorsal ist oben.

Hierzu wurde das *mutTBEmirr1.7* Fragment auf Omb Abhängigkeit getestet. Trotz der morphologischen Veränderungen in *omb<sup>0</sup>* wurde ein Phänotyp gefunden, der dem oben beschriebenen weitgehend gleicht. Zusätzliche Färbungen im Bereich der ventralen *pouch*- und *pleura*-Region können mit einer partiellen Dorsalisierung und Überproliferation (del Alamo Rodriguez et al., 2004; Umemori et al., 2007) erklärt werden (**Abbildung 3.29** Sternchen) und sind wahrscheinlich nicht Folge einer Hochregulierung durch den Verlust von Omb. Übereinstimmend damit wurde in späten L3 Stadien ein ventrales Muster gefunden, das womöglich ein Spiegelbild des dorsalen Kompartiments ist (**Abbildung 3.30**). Zusammen deutet dies daraufhin, dass die Repression des *mirr enhancers* durch Omb vornehmlich durch die hier untersuchte TBE vermittelt wird.



**Abbildung 3.29 X-Gal ÜN Färbung von Imaginalscheiben des Stammes *mutTBEmirr1,7-lacZ*.** 1. Reihe: *+/+;;mutTBEmirr1,7-lacZ/mutTBEmirr1,7-lacZ*. 2. Reihe: *FMGFP/Y;;mutTBEmirr1,7-lacZ/+*. 3. Reihe: *l(1)omb<sup>15</sup>/Y;;mutTBEmirr1,7-lacZ/+*. Die Expressionsdomänen im Heminotum, der Alula und der ventralen Pleura sind deutlich verstärkt und expandieren in anteriores Gewebe. Die Kombination mit dem *omb<sup>0</sup>* Allel zeigt, ungeachtet der in diesem Genotyp typischen morphologischen Veränderungen (Sternchen), den gleichen Phänotyp. (nach F. Eichinger) (Von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)



**Abbildung 3.30 X-Gal ÜN Färbung: Auswirkung von  $omb^{15}$  auf die Expression von  $mutmirr1,7-lacZ$  unterschiedlicher Stadien.** 1. und 2. Bild:  $l(1)omb^{15}/Y;;mutTBEmirr1,7-lacZ/mutTBEmirr1,7-lacZ$ . Die zusätzliche Färbung im Bereich der ventralen *pouch* und *pleura* Region ist wahrscheinlich das Ergebnis von expandierendem Gewebe und eines Dorsalisierungseffekts in  $omb^0$ , der im späten L3 Stadium deutlicher wird. (nach F. Eichinger)

### 3.2.5.3 Diskussion

Mit der Expressionsanalyse des *mirr[5,6kb]* und des *mirr[1,7kb]* Transgens konnte ein *enhancer* identifiziert werden, der dem endogenen *mirr* Muster in Flügelscheiben zum Teil entspricht. Ein Omb Verlust hatte eine ektopische Aktivierung des *enhancers* in Omb-*hinge* Domänen zur Folge. Das spricht dafür, dass Omb die Expression von *mirr* in Flügelscheiben durch seinen Einfluss auf einen cis-regulatorischen Bereich kontrolliert.

Den Iro-C Genen spricht man eine Selektorgen-ähnliche Rolle zu, da ihre Expression während des L2 Stadiums für die Spezifizierung der zukünftigen Notumregion essentiell ist. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass früh induzierte *Iro-C* Klone die Identität der dorsalen *hinge* annehmen (Diez del Corral et al., 1999). Von einer *omb* Expression in der Notumregion ist bisher nichts bekannt. Dagegen übernimmt Omb eine entscheidende Rolle bei der Bildung der zukünftigen Flügelgelenksregion. Das Hypomorph  $omb^{bi}$ , dessen Polymorphismus innerhalb eines dorsalen *hinge-enhancers* liegt (Abassi, 2007; Sivasankaran et al., 2000), zeigt einen Phänotyp, bei dem alle longitudinalen Venen in diesem Bereich fusioniert sind. Aufgrund dieser unterschiedlichen Funktionen und der komplementären Expression könnte man annehmen, dass sich die Gene *mirr* und *omb* antagonistisch zueinander verhalten und so zu einer Notum-*hinge* Grenze beitragen.



Die Vermutung, dass es sich bei *mirr* um ein direktes Ziel von Omb handeln könnte, wurde durch die Mutationsanalyse der einzigen potentiellen TBE erhärtet. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Mutation der repressive Einfluss von Omb auf das *mirr*[1,7kb] Fragment aufgehoben wurde und ein ähnliches *lacZ* Muster erzeugt werden konnte wie in der *omb* Mutante. Dieses Ergebnis weist erstmals auf eine TBE vermittelte Interaktion zwischen Omb und einer regulatorischen Zielsequenz. Ob Omb tatsächlich an die Sequenz der *mirr* TBE bindet, ist noch nicht gezeigt worden und könnte mithilfe von EMSA Versuchen *in vitro* untersucht werden (vgl. *vgQE*, 3.2.13.3).

In einer Arbeit von Letizia und Kollegen wurden bei der Suche nach cis-regulatorischen Elementen fünf aktive Elemente (RE1-5) gefunden, die eine Aktivität in Imaginalscheiben und im Embryo zeigten (Letizia et al., 2007). Das dem *mirr* Locus nächstgelegene Element, RE5, überlappt beinahe vollständig mit dem 3' Ende des hier untersuchten *mirr*[5,6kb] Fragments (**Abbildung 3.25**). Im Gegensatz zu diesem konnte es nur in einer *Mirr*-Domäne, der *Alula*, *lacZ* Expression induzieren (Letizia et al., 2007). Die Analyse von *mirr*[1,7kb] zeigte, dass es Sequenzen *upstream* von RE5 gibt, die Reporterexpression in der *Alula* und in weiteren *Mirr*-Domänen treiben können.

*Iro-C* und *msh* reprimieren sich wechselseitig (Villa-Cuesta and Modolell, 2005). Interessanterweise wurden auch in *msh* konservierte TBEs identifiziert. Dies wird im nächsten Kapitel besprochen.

### **3.2.6 muscle-segment-homeobox (*msh*/Drop)**

Das Gen *msh* kodiert für einen Homeobox Transkriptionsfaktor mit einem Engrailed typischen Repressormotif und wird im Embryo in dorsalen Zellen des Neuroektoderms und in Muskel-Vorläuferzellen exprimiert (DAlessio and Frasch, 1996; Isshiki et al., 1997; Lu et al., 2000). In der Flügelscheibe wird es durch die Aktivität von *ap*, dem dorsalen Selektorgen, kontrolliert. *msh* verleiht bestimmten Strukturen des Flügels, wie den dorsalen Randborsten und den Flügelvenen, ihre dorsale Identität (Milan et al., 2001). Seine stärkste Expression liegt in der Flügelscheibe im Bereich der dorsalen *hinge* Region und grenzt dort unmittelbar an

die Domäne der Iro-C Gene. Wie in Kapitel 3.2.5 bereits erwähnt wurde konnte gezeigt werden, dass sich die Gene *msh* und Iro-C gegenseitig reprimieren und so zur Bildung einer Grenze zwischen Körperwand und Flügel beitragen. Ein klonaler Verlust von *msh* in der *hinge* Region beeinträchtigt die Entwicklung der späteren Flügelgelenkregion. Eine Expression von *msh* konnte auch in Augenantennen- und Beinscheiben nachgewiesen werden (Lu et al., 2000).

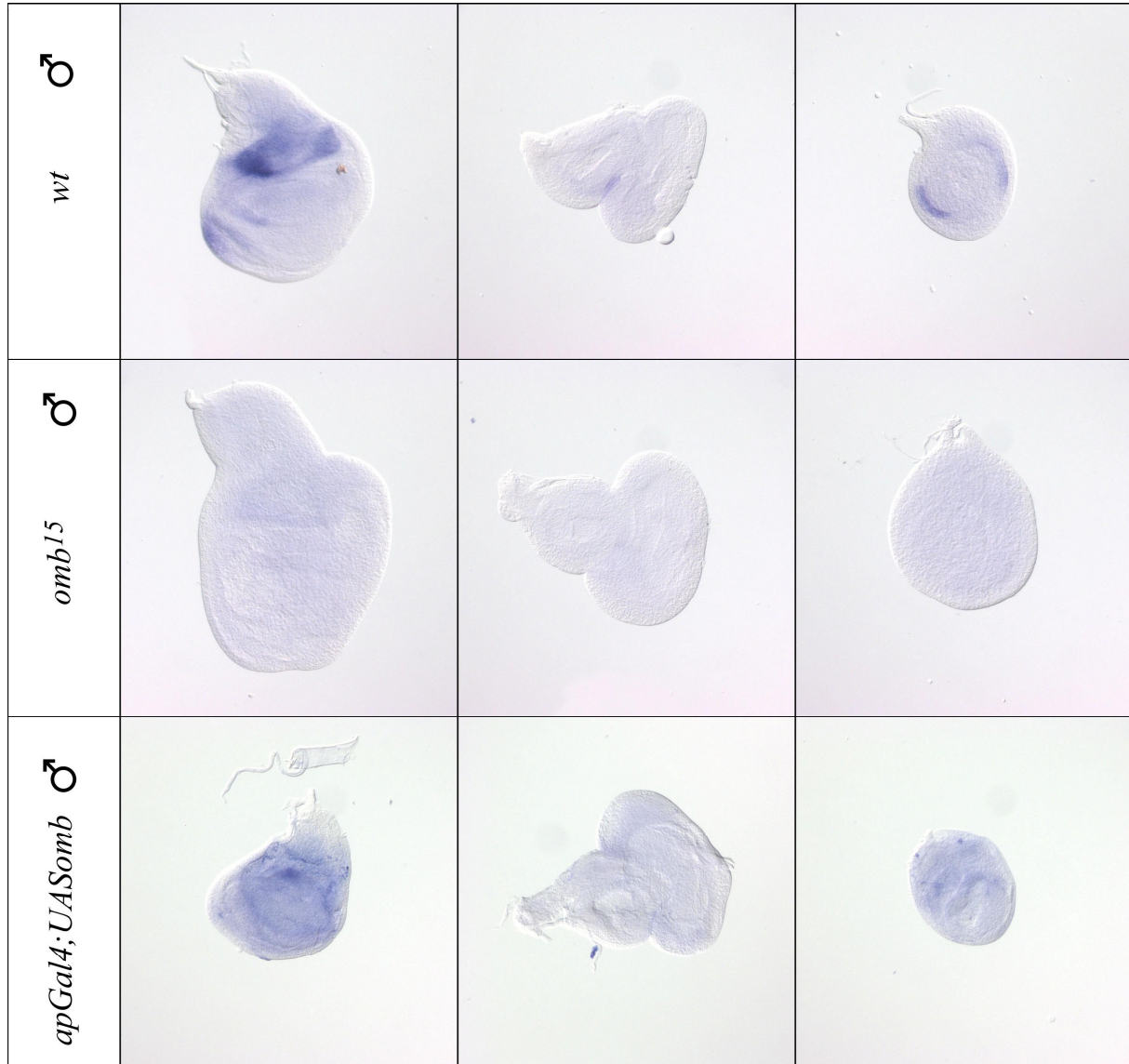
### 3.2.6.1 Omb reguliert *msh*

Aufgrund der gemeinsamen Expression von *omb* und *msh* in der dorsalen *hinge* und wegen seiner konservierten TBEs (*upstream* und intronisch) wurde *msh* als mögliches Zielgen von Omb in Betracht gezogen. Um einen ersten Hinweis zur Beantwortung dieser Frage zu erhalten, wurde die Expression von *msh* mittels der *in situ* Hybridisierungstechnik visualisiert und die Auswirkung eines *omb* Verlusts auf dieses Muster untersucht.

Wie man in **Abbildung 3.31** erkennen kann, ließ sich das bekannte *msh* Expressionsmuster mit Hilfe einer *antisense* RNA Probe (2.2.7) in Flügel- und Beinscheiben reproduzieren. In der Flügelscheibe bestand das Muster aus der bereits erwähnten Expression in der dorsalen *hinge*, einer schwachen Domäne am anterioren Flügelrand und einer Domäne in der ventralen Mesopleura. Eine sehr schwache Expression war auch im dorsalen Kompartiment der *pouch* zu sehen. In den Beinscheiben fand sich ein Muster aus zwei konzentrischen Halbkreisen. Desweiteren konnte eine schwache halbkreisförmige Färbung im ventralen Teil der Antennenscheibe entdeckt werden. Eine *msh*-RNA konnte in *omb* mutanten Imaginalscheiben dagegen nicht mehr detektiert werden. Omb scheint demnach für eine Aktivierung von *msh* notwendig zu sein.

Um dies erneut zu überprüfen wurde die Auswirkung einer ektopischen *omb* Expression auf die Expression von *msh* untersucht. Mit Hilfe von *apGal4* wurde die Expression von *omb* im dorsalen Flügelkompartiment induziert (**Abbildung 3.31**). Der Nachweis der *msh*-RNA ergab ein Muster das dem von *ap* entspricht. Damit konnte ein weiterer Hinweis auf die Aktivierung von *msh* durch Omb erbracht werden.

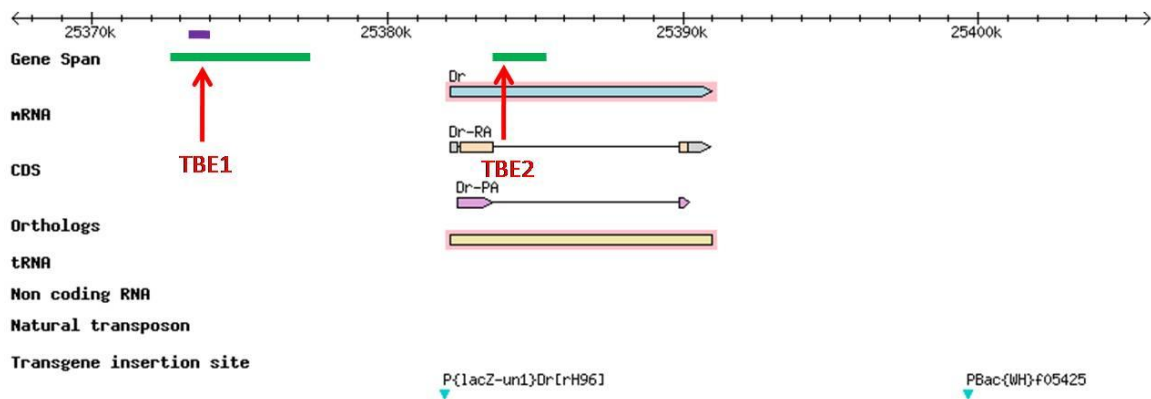
Allerdings muss erwähnt werden, dass trotz der hier scheinbar hoch spezifischen *msh*-RNA Sonde auch Scheiben präpariert wurden deren Muster teilweise stark variierte.



**Abbildung 3.31 Omb reguliert die *msh* Expression.** 1. Reihe:  $w^{118}/w^{118}$ , 2. Reihe: *FMGFP/Y*, 3. Reihe: *omb<sup>15</sup>/Y*. Visualisierung der *msh* Expression in L3 Imaginalscheiben durch *in situ* Hybridisierung mit einer *msh antisense* RNA Sonde. In *omb<sup>15</sup>* Scheiben ist keine *msh* Expression detektierbar. Die *in situs* in der 2. und 3. Reihe wurden parallel durchgeführt. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

### 3.2.6.2 *msh*[4,8kb]

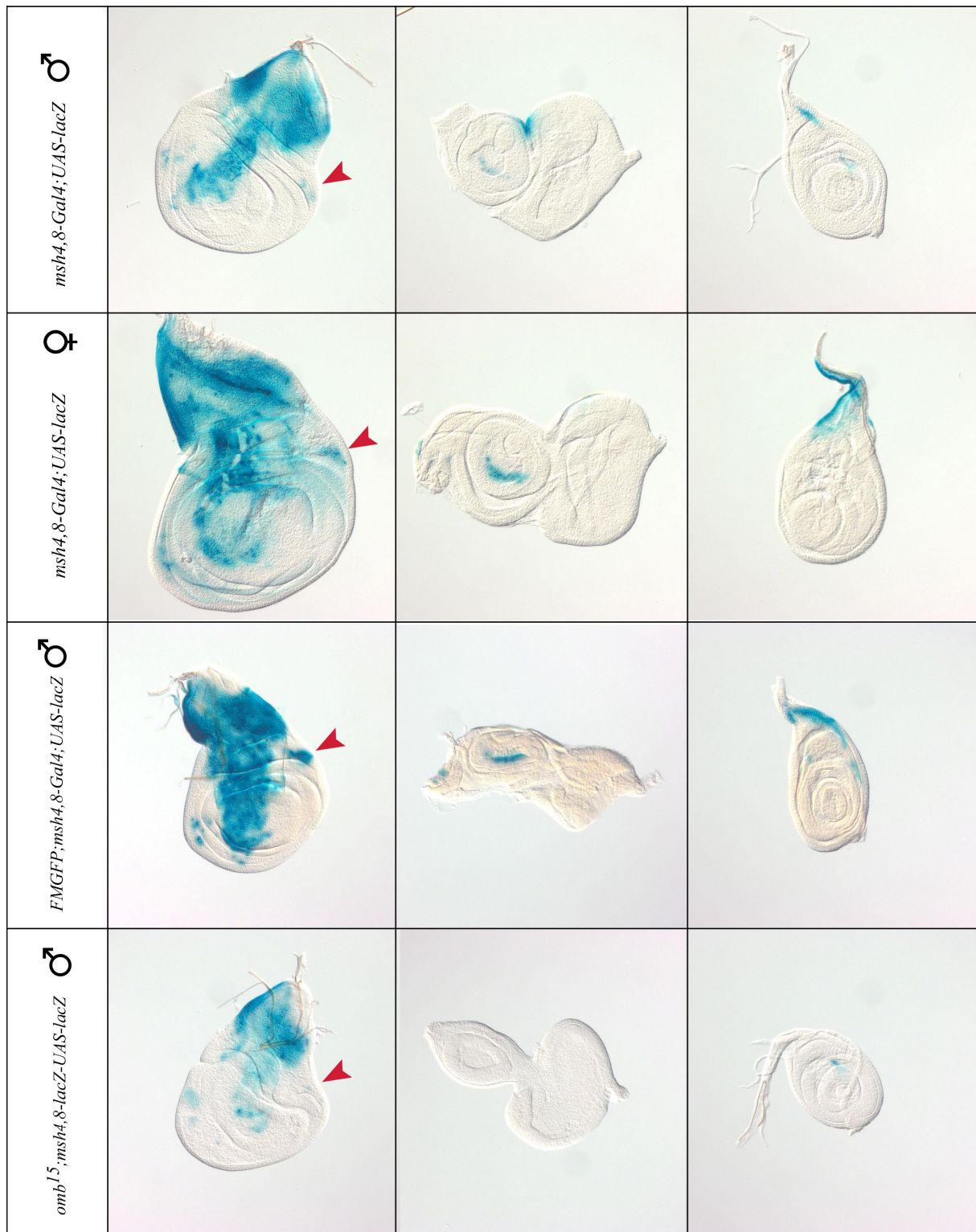
Um einen direkten transkriptionellen Einfluss von Omb auf *msh* zu testen, wurde in der genomischen Region der *msh* Transkriptionseinheit nach einem möglichen TBE-*enhancer* gesucht. Der ausgewählte Bereich liegt etwa 8,3 kb *upstream* von *msh* und enthält eine in 9 von 12 *Drosophila* Spezies konservierte TBE (GAGTGTGAAA) mit einem score von 8,16 (**Abbildung 3.32**).



**Abbildung 3.32 Genregion des *Dr/msh* Locus mit Transkripten auf Chromosom 3R.** Die grünen Balken symbolisieren das klonierte 4,8 kb *enhancer* Fragment aus nichtkodierender Sequenz 8,3 kb *upstream* von *msh* und das 1,6 kb Fragment aus intronischer Sequenz. Die roten Pfeile weisen auf das Vorhandensein gut konservierter TBEs. TBE1 liegt auch innerhalb des minimalen Elementes *msh2a* (lila Balken), das für die Neuroektoderm Expression von *msh* notwendig ist (Von Ohlen et al., 2009).

Nach der Klonierung dieses Fragments in einen Gal4-*enhancer reporter* Vektor (*pBPGUw-Drop4,8*, 2.2.18) und der Transgenese von *Drosophila* wurde seine transkriptionelle Aktivität durch Xgal Färbung von Imaginalscheiben analysiert (**Abbildung 3.33**). Das Färbemuster entsprach bis auf eine Ausnahme nicht dem gefundenen *msh* Muster aus **Abbildung 3.31**. So konnte nur die halbkreisförmige, ventrale Domäne in Antennenscheiben reproduziert werden. Durch eine intensive Färbung der Peripodialmembran in Flügelscheiben, die das restliche Flügepithel zentral überlagerte, wurde die Auswertung anderer eventuell gefärbter Bereiche erschwert. Dennoch wurde im Wildtyp im posterioren Teil der dorsalen *hinge* Region eine *lacZ* Expressionsdomäne gefunden und reproduzierbar gefärbt. Diese Domäne und die der Antennenscheibe war im *omb*<sup>15</sup> mutanten Hintergrund verschwunden. Auch die Färbung der Peripodialmembran war deutlich schwächer. Ob dieser Befund auf eine Regulation durch Omb hindeutet, ist noch unklar. Die posteriore

Expressionsdomäne scheint im Bereich einer posterioren *dpp* Expression zu liegen, von der bekannt ist, dass sie erst im Verlauf von L3 erscheint und durch *Mirr* reguliert wird (Foronda et al., 2009). Für einen rigiden Nachweis der *Omb*-Abhängigkeit ist es notwendig, den Entwicklungsstand der *l(1)omb* Larven z. B. über die retinale Differenzierung zu kontrollieren (vgl. *inv*, 3.2.4.1).

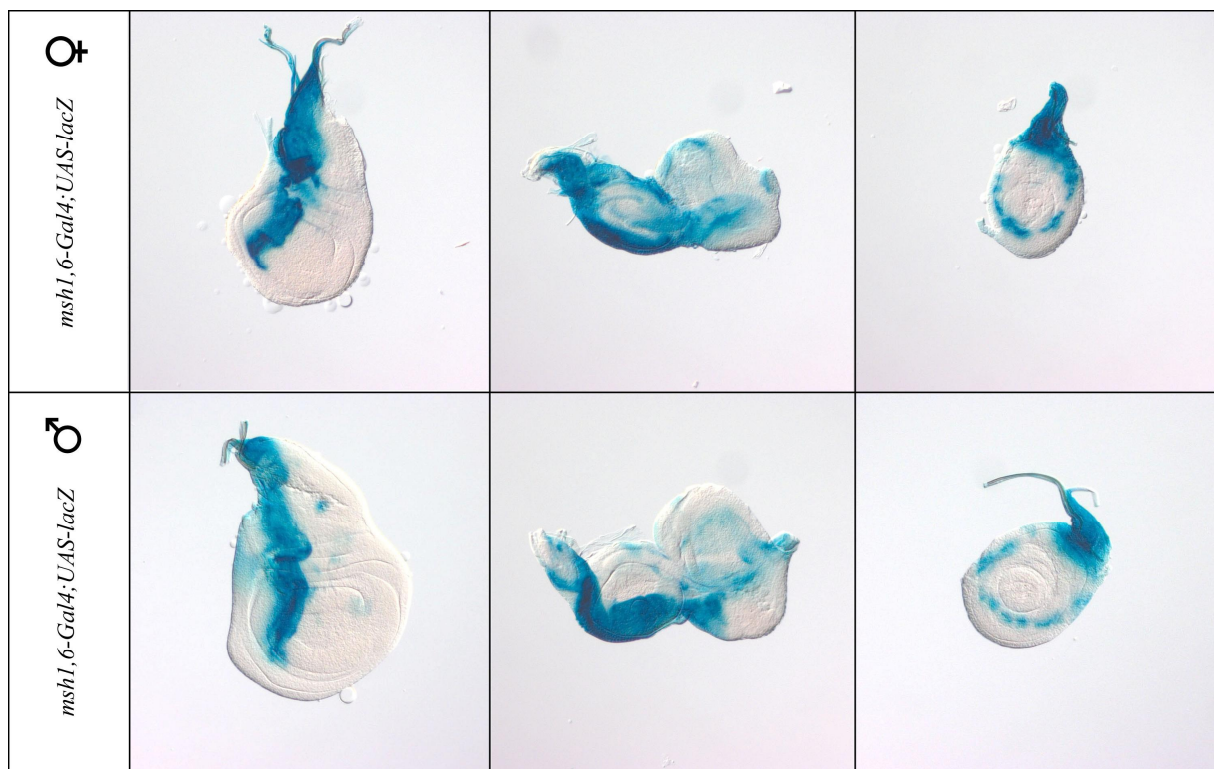


**Abbildung 3.33 X-Gal ÜN Färbung von Imaginalscheiben des Stammes *msh[4,8kb]-Gal4*.** 1. und 2. Reihe: *+/+;msh4,8-Gal4/+;UAS-lacZ/+*. 3. Reihe: *FMGFP/Y;msh4,8-Gal4/+;UAS-lacZ/+*. 4. Reihe: *l(1)omb<sup>15</sup>/Y;msh-Gal4/+;UAS-lacZ/+*. Durch eine teilweise starke Färbung der Peripodialmembran konnten Muster des Scheibenepithels nicht eindeutig identifiziert werden. Eine posteriore Domäne der dorsalen *hinge* Region (rote Pfeilspitze) wurde in *omb<sup>0</sup>* nicht mehr gefunden. Genau so verhielt es sich

mit einer zentralen Domäne in Antennenscheiben und einer dorsalen Färbung in Beinscheiben (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

### 3.2.6.3 *msh*[1,6kb]

Neben dem oben beschriebenen Fragment wurde noch eine zweite TBE-Sequenz auf die gleiche Weise kloniert und untersucht. Dabei handelt es sich um ein 1,6 kb großes Fragment mit einer voll konservierten TBE (GTTCCACTT, score 8,38) aus intronischer Sequenz von *msh* (**Abbildung 3.32**). Auch dieses Fragment zeigte kein *msh* typisches *lacZ* Muster (**Abbildung 3.34**). Bis auf Teile der Peripodialmembran und/oder adepithelialer Zellen waren die Hauptepithelien der Imaginalscheiben wahrscheinlich ungefärbt. Eine Abhängigkeit von Omb wurde für dieses Fragment nicht untersucht.



**Abbildung 3.34 X-Gal ÜN Färbung von Imaginalscheiben des Stammes *msh*[1,6kb]-Gal4.** 1. und 2. Reihe: +/+;*msh1,6-Gal4*/+;*UAS-lacZ*/+. In allen Scheiben wurden nur Teile der Peripodialmembran gefärbt. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

### 3.2.6.4 Diskussion

Das mit der *in situ* Technik nachgewiesene *msh*-mRNA Muster in Flügelimaginalscheiben deckt sich mit der aus der Literatur bekannten Gen Expression. Ein Omb Verlust und eine ektopische Expression von *omb* im dorsalen Teil der Scheibe deuten auf eine Aktivierung von *msh* durch Omb hin. Die Ergebnisse sollten wegen der Schwächen der Hybridisierungstechnik nochmals z.B. mit Antikörperfärbungen überprüft werden.

Die Untersuchung einer direkten Abhängigkeit von Omb in Imaginalscheiben mittels Klonierung von TBE Fragmenten fiel dagegen weitgehend negativ aus. Einzig das *msh[4,8kb]* Fragment induzierte *lacZ* Expression in einem Bereich der *hinge/Alula*, wo auch *omb* exprimiert wird (**Abbildung 3.5 B**). In den untersuchten *omb<sup>0</sup>* Imaginalscheiben verschwand diese Domäne, wobei noch sicherzustellen ist, dass dies nicht auf einem ungenügenden Alter der Scheiben beruhte. Denkbar wäre, dass durch einen Omb Verlust *mirr* aktiviert worden ist (siehe 3.2.5.3) und das einen *msh[4,8]-lacZ* Expressionsverlust zur Folge gehabt hat, da beide Gene antagonistisch wirken können (Villa-Cuesta and Modolell, 2005).

Eine Untersuchung der *upstream* Region von *msh* führte zu der Entdeckung eines 699 bp großen DNA-Abschnitts (*msh2a*), der weitgehend für die endogene *msh* Expression im lateralen Ektoderm von Embryonen verantwortlich zu sein scheint (Von Ohlen et al., 2009). Der Abschnitt überlappt mit einem *downstream* gelegenen Element (*msh2b*), das wiederum ein Reporter-gen-Muster vergleichbar mit dem von Dpp Zielgenen zeigte. Beide Fragmente sind Teil von *msh[4,8kb]* (**Abbildung 3.32**). Wie sich herausstellte, enthält *msh2a* zusätzlich zu mutmaßlichen Ind und Vnd Bindestellen (Von Ohlen et al., 2009) auch TBE1. Es ist also vorstellbar, dass TBE1, unabhängig von einer Funktion in Imaginalscheiben, eine Rolle bei der Regulation der *msh* Expression im embryonalen Neuroektoderm spielt. Könnte mithilfe des *msh[4,8kb]-lacZ* Fragments die embryonale Expression von *msh2a* und *msh2b* reproduziert werden, ließe sich auch hier eine Omb Abhängigkeit mit dem *I(1)omb<sup>15</sup>* Allel überprüfen.



### 3.2.7 *retained (retn/dri)*

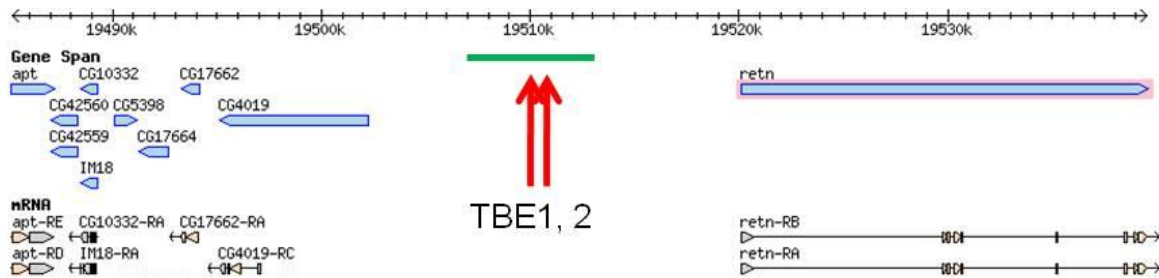
Das *retn* Gen kodiert für ein nukleäres Protein mit einer konservierten AT-reichen DNA Bindedomäne (ARID) (Gregory et al., 1996). *retn* wird im embryonalen Zentralen-Nervensystem (ZNS) in einer Gruppe longitudinaler Glia exprimiert. Eine Mutantanalyse zeigte, dass *retn* für eine normale Bildung des ZNS notwendig ist (Shandala et al., 2003). Embryos, denen die *retn* Funktion fehlt, bilden zwar longitudinale Glia aus, allerdings haben diese die Fähigkeit, bis an ihr Ziel zu wandern, verloren. In der späteren Embryogenese ist *retn* außerdem für die Myogenese und die Entwicklung des Dickdarms erforderlich (Shandala et al., 1999). Während der Larvalentwicklung wird *retn* in einem diffusen Muster in der gesamten Flügelimaginalscheibe exprimiert (Shandala et al., 2002)). Es wurde aber auch Expression in einer Gruppe von Zellen gefunden, die auch das Homeodomänen Protein Cut exprimieren (Shandala et al., 2002). Diese Zellen sind Vorläuferzellen von einer Gruppe von Sinnesorganen, die als Campaniforme Sensillen bekannt sind.

#### 3.2.7.1 *retn[5,8kb]*

Ca. 10 kb *upstream* der *retn* Transkriptionseinheit wurde ein 5,8 kb großer nichtkodierender DNA Bereich mit einem TBE Cluster für die Erforschung der Regulation durch Omb ausgewählt (**Abbildung 3.35**). Bei TBE1 (score 10,34) dieses DNA-Fragments handelt es sich im Gegensatz zu TBE2 (score 10,93, konserviert in 6/12 Spezies) um eine in allen Drosophiliden konservierte Sequenz. Das Fragment wurde nach der Klonierung in einen P-Element Vektor (*pH-Pelican*, 2.2.18) transgen gemacht. Die Überprüfung einer transkriptionellen Aktivität durch Anfertigung von Xgal Präparaten der Imaginalscheiben ergab keine auswertbaren Ergebnisse. Alle Scheiben auch die mit *omb* mutantem Hintergrund waren bis auf Gewebe mit natürlicher  $\beta$ Gal Aktivität (Butler et al., 2003) ungefärbt. Es konnte nur ein transgener Stamm untersucht werden, da bei der Keimbahntransformation nicht mehr transformante Linien erzeugt werden konnten.

Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass es sich bei dem klonierten Fragment um einen regulatorisch inaktiven Bereich handelt. Allerdings kann ein reprimierender Positionseffekt auf das hier verwendete P-Element nicht ausgeschlossen werden. Eine Remobilisierung des P-Elements könnte dem Abhilfe schaffen. Ein

Sequenzfehler des *enhancer reporter* Konstruktes kommt ebenfalls als mögliche Ursache in Frage, da nur das Fragment selbst überprüft wurde. Es muss aber betont werden, dass ein Fehler in der Vektorsequenz eine Ausnahme darstellen würde, da der gleiche P-Element Vektor bei anderen Transgenesen erfolgreich eingesetzt wurde (z.B. 3.2.4.1, 3.2.5.1 usw.).



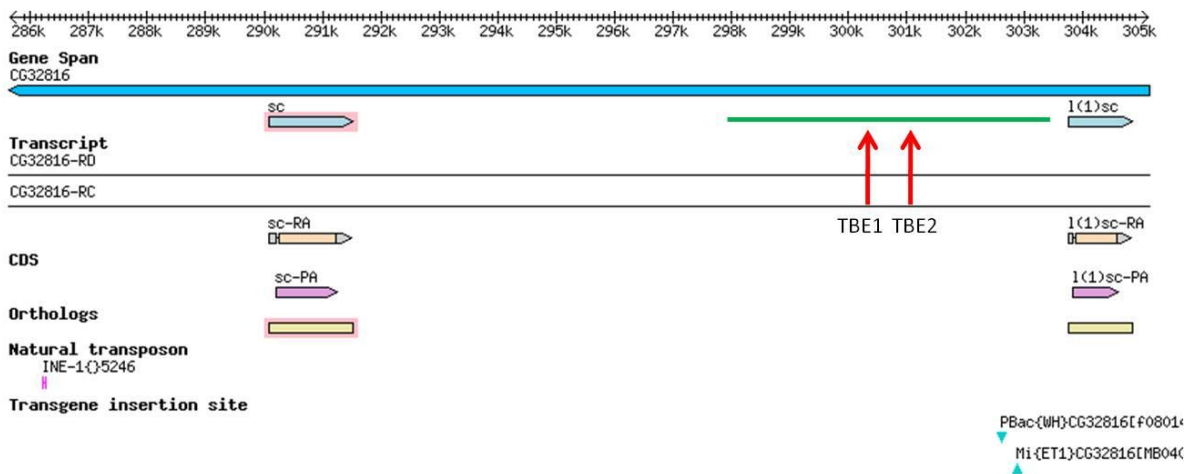
**Abbildung 3.35 Genregion des *retn* Locus mit Transkripten auf Chromosom 2R.** Der grüne Balken symbolisiert das klonierte 5,8 kb *enhancer* Fragment aus nichtkodierender Sequenz 10 kb *upstream* von *retn*. Die roten Pfeile weisen auf das Vorhandensein einer voll konservierten (TBE1) und einer wenig konservierten TBE (TBE2).

### 3.2.8 *scute* (*sc*)

*scute* ist ein proneurales Gen und gehört mit drei weiteren Genen zum *achaete-scute* Komplex (AS-C). *achaete* und *scute* sind die am besten charakterisierten Gene dieses Komplexes. Sie kodieren beide für Transkriptionsfaktoren der *basic helix-loop-helix* Familie (bHLH). Die Funktion beider Proteine ist weitgehend redundant und es konnte gezeigt werden, dass sie *in vivo* als Heterodimere mit dem bHLH Protein Daughterless aktiv sind (Murre et al., 1989). In Imaginalscheiben aktivieren diese Komplexe *downstream* Gene, die für das neurale Differenzierungsprogramm notwendig sind. *ac* und *sc* werden in Zellen eines proneuralen Clusters exprimiert, in dem sich durch den Prozess der lateralen Inhibition eine „sensorische Mutterzelle“ (SMCs) ausbildet. Sie ist die Vorläuferzelle der sensorischen Borste der adulten Fliege. Die für die Bildung eines proneuralen Clusters notwendige Akkumulation von *ac/sc* wird unter anderem durch einen stimulatorischen Loop zwischen diesen Genen und *charlatan* (*chn*) ermöglicht (Escudero et al., 2005).

### 3.2.8.1 *scute*[5,9kb]

In der genomischen Region downstream des *scute* Locus wurde ein 5,9 kb großer Bereich ausgewählt, der aufgrund der Vorkommens zweier hoch konservierter TBEs (TBE1: 12/12 Konservierung, *score* 10,34; TBE2: 10/12 Konservierung, *score* 7,83) als mögliches Ziel von Omb in Frage kommt **Abbildung 3.36**. Trotz der erfolgreichen Klonierung des Fragments in einen *enhancer-reporter* Vektor (*Kapitel*) gelang es durch die Keimbahntransformation nicht transgene Fliegenstämme zu generieren.



**Abbildung 3.36** Genregion des *scute* Locus mit Transkripten auf Chromosom X. Der grüne Balken symbolisiert das klonierte 5,9 kb *enhancer* Fragment aus nichtkodierender Sequenz 9,1 kb *downstream* von *sc*. Die roten Pfeile weisen auf das Vorhandensein zweier hoch konservierter TBEs.

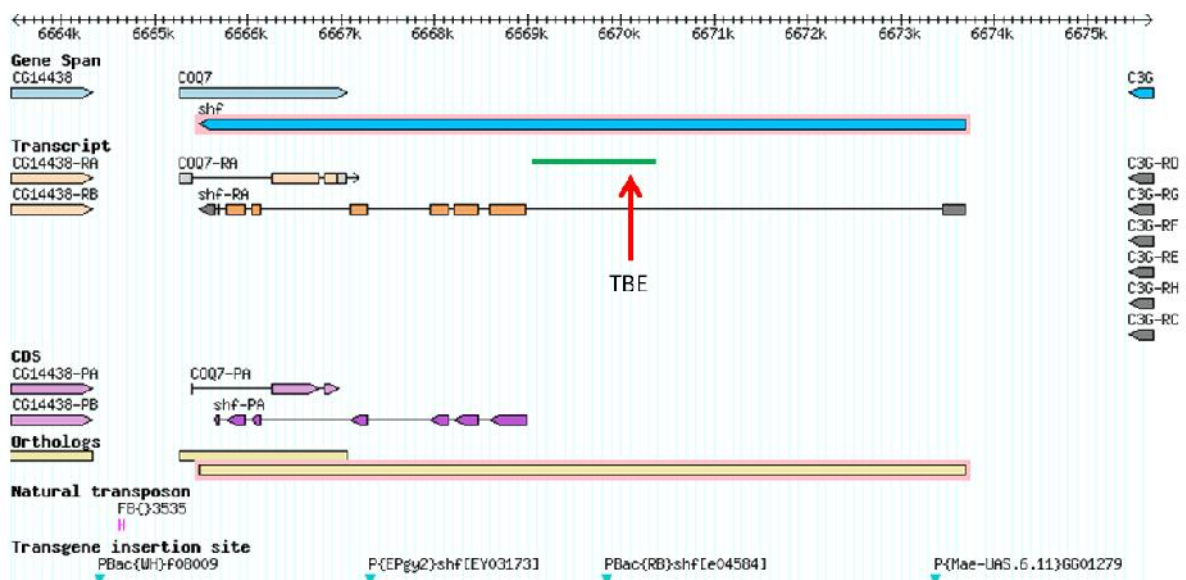
### 3.2.9 *shifted* (*shf*)

*shifted* kodiert für das einzige *Drosophila* Ortholog des sezernierten Vertebraten Proteins Wnt Inhibitory Factor-1 (WIF-1). Von diesem Faktor weiß man, dass er an extrazelluläre Wnts bindet und ihre Signalgebung inhibiert (Hunter et al., 2004). Interessanterweise ist das von Shifted nicht bekannt. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass *shf* für die weitreichende Signalgebung von Hh während der Entwicklung des Flügels erforderlich ist (Glise et al., 2005). Dafür wird Shf genauso wie Hh sezerniert und wirkt über eine lange Distanz, indem es Hh stabilisiert und dessen Diffusion ermöglicht (Gorfinkiel et al., 2005). Extrazellulär bindet Shf auch an *Heparan-Sulfate-Proteoglycans* (HSPGs), von denen man weiß, dass sie für die

Diffusion von Hh notwendig sind (Han et al., 2004). Es ist demnach möglich, dass *shf* eine HSPG Spezifität für Hh bereitstellt.

### 3.2.9.1 *shf*[4,3kb]

Wegen der komplementären Expression von *shf* und *omb* in Flügelimaginalscheiben kommt es als potentiell Ziel von Omb in Betracht.. Aus diesem Grund wurde in der genomischen Region des *shf* Locus nach einem nichtkodierenden TBE Abschnitt gesucht. In **Abbildung 3.37** ist ein solcher Abschnitt gezeigt, der eine in 10 von 12 *Drosophila* Spezies konservierte *Highscore* TBE (TCTCACACCT, Score: 10,93) enthält. Dieses Fragment wurde als *enhancer-reporter* für die Transgenese verwendet.



**Abbildung 3.37** Genregion des *shf* Locus mit Transkripten auf Chromosom X. Der grüne Balken symbolisiert das klonierte 4,3 kb *enhancer* Fragment aus nichtkodierender, intronischer Sequenz. Der rote Pfeil weist auf das Vorhandensein einer hoch konservierten TBE (score: 10,93).

Die Analyse der hergestellten Stämme (*shf1-2a* und *shf2-1*) durch Xgal Färbung der Imaginalscheiben ergab keine auswertbaren Muster. Die Flügelabscheiben zeigten einzig die von Butler et al. (2003) beschriebene unspezifische Färbung im Bereich der dorsalen *hinge*. Für das Fehlen einer *enhancer*-Aktivität könnten die bereits im letzten Abschnitt von Kapitel 3.2.7.1 angesprochenen Ursachen in Frage kommen.

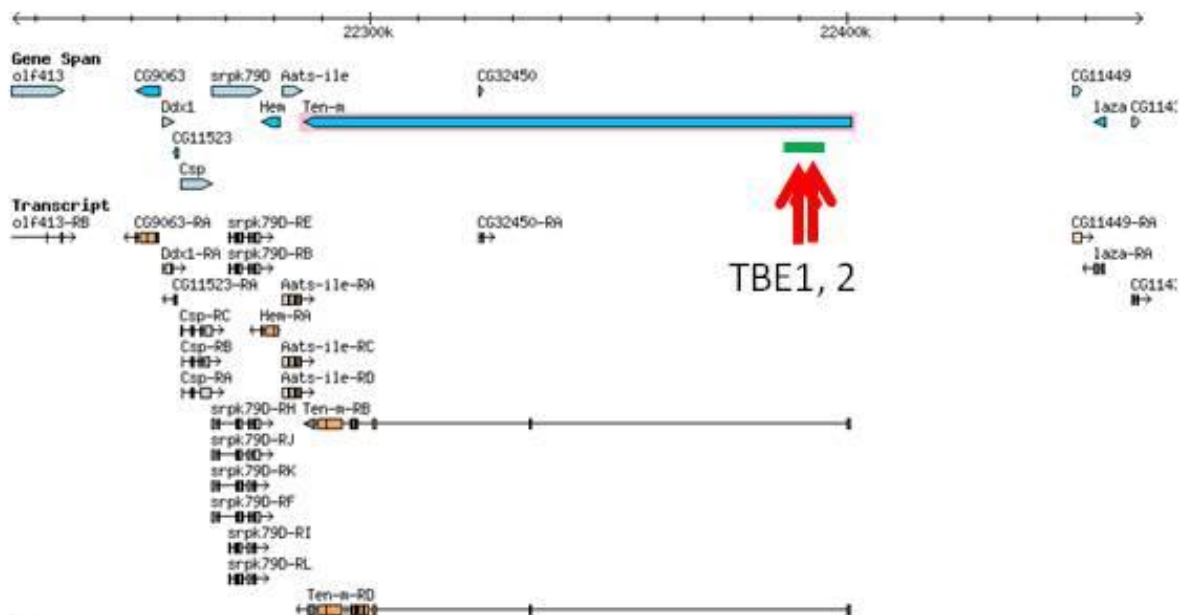
### 3.2.10 *Tenascin major (Ten-m/ odd Oz)*

*ten-m* ist ein Paarregelgen und kodiert nicht wie alle anderen Paarregelgene für einen Transkriptionsfaktor sondern für ein Transmembran Protein, das an der intrazellulären Signalgebung beteiligt ist. Das Protein enthält eine extrazelluläre *epidermal growth factor* (EGF) Domäne und eine intrazelluläre Tyrosinkinase (TK) Substrat Region. Die erste Expression findet im Embryo in sieben Streifen entlang der A/P-Achse während des zellulären Blastoderms statt und offenbart damit seine Rolle bei der embryonalen Musterbildung. Später zeigt es ein 14 Streifen Segmentpolaritätsgen (SP) ähnliches Muster. Wie für andere Paarregelgene (z.B. *h*) konnte aber auch für *ten-m* gezeigt werden, dass es postembryonal in Imaginalscheiben exprimiert wird und dort eine Rolle bei der Entwicklung spielt (Levine et al., 1997; Wides et al., 2007). Das Muster in den Flügelscheiben besteht aus Domänen im späteren Flügelblatt, der *hinge* und der thorakalen Epidermis. In Augenscheiben scheint die Expression entlang der morphogenetischen Furche teilweise von der *hh* Signalgebung abhängig zu sein (Levine et al., 1997). Der Verlust der *ten-m* Aktivität in Vorläuferzellen der Ommatidien führt zu einem Verlust der R7 Photorezeptorzellen und zu verschiedenen Defekten der Ommatidien (Wides et al., 2007).

#### 3.2.10.1 *ten-m*[5,8kb]

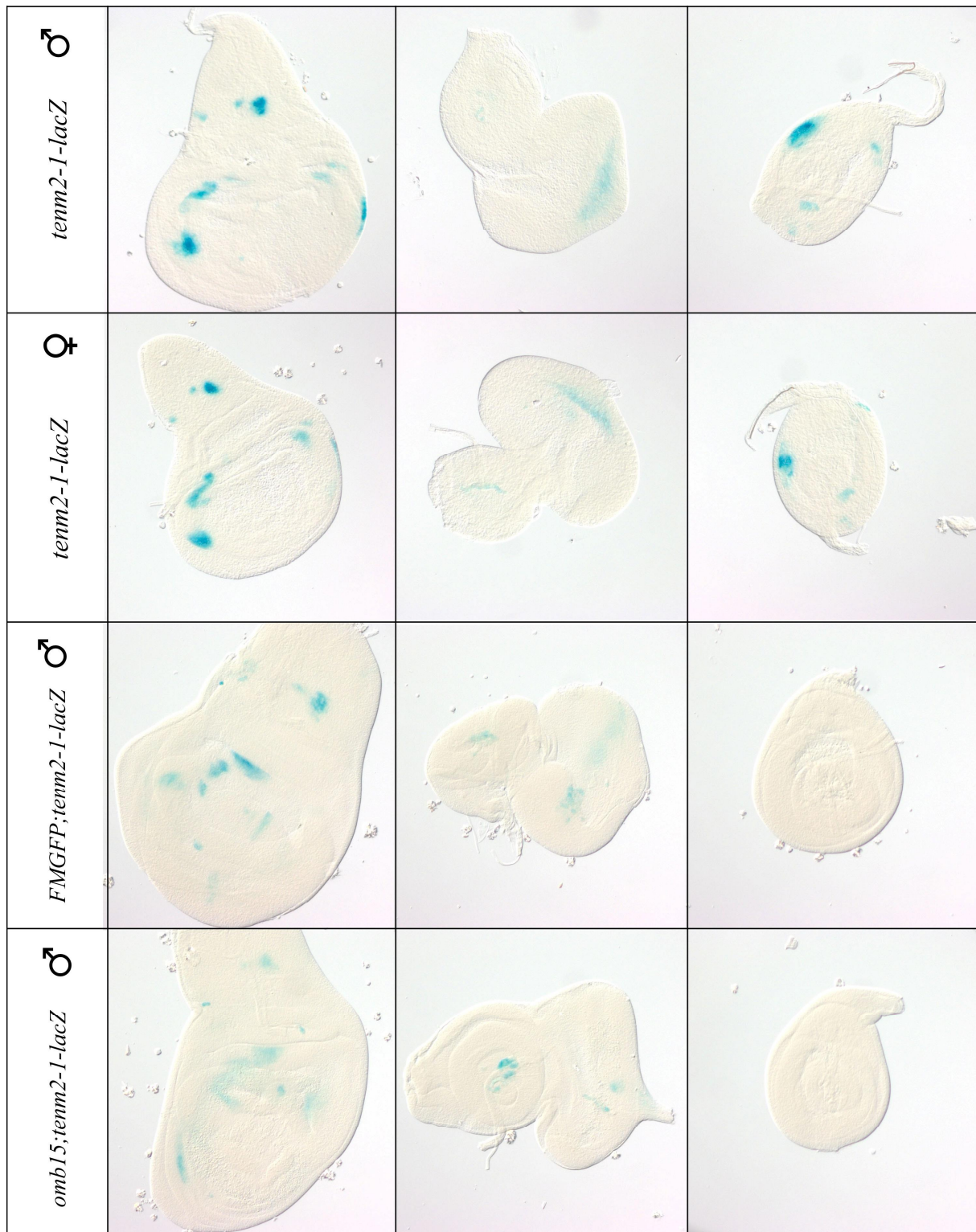
Wegen der angrenzenden und teilweise überlappenden Expression von *ten-m* und *omb* in Augenscheiben und Flügelscheiben, wurde *ten-m* in den Kreis der zu untersuchenden Zielgene aufgenommen. **Abbildung 3.38** zeigt das in einen *enhancer-reporter* Vektor klonierte 5,8 kb große DNA-Fragment. Es enthält eine gut konservierte (TBE1: TTTCACACTT, score 9,06, konserviert in 8/12 *Dr* Spezies) und eine hoch konservierte TBE (TBE2: TTTCACACTT, score 9,06, konserviert in 12/12 *Dr* Spezies). Nach der Transgenese wurde die Aktivität des Fragments durch Xgal-Färbung der Imaginalscheiben von vier unabhängigen transgenen Linien analysiert. In Flügelscheiben entsprach das gefundene Muster nicht dem in der Literatur beschriebenen (s.o.). Wie man in **Abbildung 3.39** erkennen kann handelt es sich um ein komplexes Muster aus mehreren nicht zusammenhängenden, punktförmigen

Domänen. Die in homozygoten Larven gefundene anteriore Domäne in Beinscheiben konnte in heterozygoten nicht mehr beobachtet werden. Das Muster in den



**Abbildung 3.38 Genregion des *ten-m* Locus mit Transkripten auf Chromosom 3L.** Der grüne Balken symbolisiert das klonierte 5,8 kb *enhancer* Fragment aus nichtkodierender, intronischer Sequenz. Die roten Pfeile weisen auf das Vorhandensein eines TBE Clusters mit einer gut konservierten (TBE1) und einer hoch konservierten TBE (TBE2).

Augenscheiben deutet auf eine Färbung entlang der morphogenetischen Furche hin, wie sie auch in der Literatur beschrieben ist. Die Färbung der Flügelscheiben ließ sich auch im *omb* mutanten Hintergrund nachweisen, wenngleich sie zusammen mit der wildtypischen Kontrollfärbung der Heterozygoten schwächer ausfiel. Die Färbung der Augenscheiben dagegen schien in *omb*<sup>-</sup> verloren gegangen zu sein. Allerdings lässt sich das in Hinblick auf die schwache Färbung nicht eindeutig beurteilen. Über den Verbleib der Beindomäne im mutanten Scheiben kann nichts gesagt werden, da diese Färbung bereits in der Heterozygoten nicht mehr zu sehen war. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es sich bei dem untersuchten Fragment um einen regulatorischen Bereich des *ten-m* Locus handelt, der zumindest einen Teil des wildtypischen Expressionsmusters des Gens in den Augenscheiben wiedergibt.



**Abbildung 3.39 X-Gal ÜN Färbung von Imaginalscheiben des Stammes *tenm2-1-lacZ*.** 1. und 2. Reihe: *+/+;tenm2-1-lacZ/tenm2-1-lacZ* 3. Reihe: *FMGFP/Y;tenm2-1-lacZ/+*. 4. Reihe: *l(1)omb<sup>15</sup>/Y;tenm2-1-lacZ*. In homozygoten, wildtypischen Larven fand sich ein in allen Scheibentypen reproduzierbares Muster. Das Muster der Flügelscheiben wurde schwächer auch in heterozygoten (wt) und *omb* mutanten Larven gefunden. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

### 3.2.10.2 Diskussion

*Tenm[5,8kb]-lacZ* zeigte zumindest in Augenimaginalscheiben eine Expression nahe der Morphogenetischen Furche, die der wildtypischen *tenm* Expression ähnelt. Eine Expression in bereits sich entwickelnden Ommatidien, die auch Teil des endogenen Musters ist (Kinel-Tahan et al., 2007; Levine et al., 1997), wurde dagegen nicht gefunden. Ob Omb als Regulator des Fragments aktiv ist, konnte aufgrund der schwachen Färbungen in *omb-* nicht geklärt werden.

Es gibt Hinweise, dass *ten-m downstream* von Hh aktiv ist und somit auch an der Progression der MF beteiligt ist (Levine et al., 1997). Das hypomorphe Allel *hh<sup>1</sup>* führte zu der gleichen Beeinträchtigung der *ten-m* Expression posterior der MF wie der von PKA, einem weiteren Hh Zielgen. Darüber hinaus wurde der Verlust an Ommatidien in *hh<sup>1</sup>* Mutanten durch eine Defizienz, die *ten-m* deletiert, noch verstärkt. Unterstellt man eine TBE vermittelte Regulation der *ten-m* Transkription durch Omb, so würde die aufgrund der unterschiedlichen Einflüsse beider Gene auf die Augenentwicklung (siehe *hh*, 3.2.3.2) wahrscheinlich negativ sein. Das gleiche würde man dann auch von *tenm[5,8kb]* erwarten.

### 3.2.11 *thickveins (tkv)*

Das Gen *tkv* kodiert für einen Transmembran Serin/Threonin Kinase Rezeptor (Typ I). Zusammen mit Punt gehört es zu einem Rezeptorkomplex, der für die Signalgebung von Dpp erforderlich ist (Ruberte, 1995). Die Bindung von Dpp an seine Rezeptoren induziert die Phosphorylierung von Tkv durch Punt. Dies wiederum führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Mad. Phosphoryliertes Mad (pMad) wird dadurch in die Lage versetzt in den Nukleus zu gelangen, wo es zusammen mit dem Zink-Finger Protein Schnurri den transkriptionellen Repressor Brinker (Brk) unterdrückt (Minami, 1999; Muller et al., 2003). Auf diese Weise wird der extrazelluläre Dpp Gradient in einen inversen Gradienten des transkriptionellen Repressors Brinker umgewandelt. Ein Zielgen von Brinker ist unter anderem *omb*, das komplementär zu *brk* exprimiert wird.

*tkv* wird scheinbar durch zwei unabhängige Mechanismen reguliert. Einmal wird es durch die Signalgebung von Dpp herunterreguliert (Lecuit and Cohen, 1998). Zum anderen konnte aber auch gezeigt werden, dass das Level des Rezeptors von einem



Dynamin vermittelten Endocytose Mechanismus limitiert wird, der von der Dpp Aktivität unabhängig ist (Belenkaya et al., 2004).

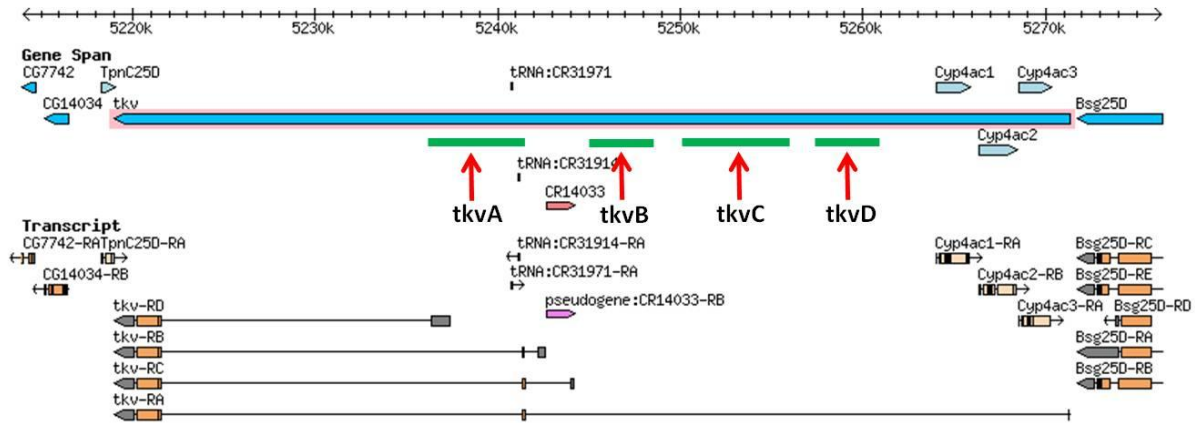
### 3.2.11.1 *tkvA*[5,2kb], *tkvB*[3kb], *tkvC*[4kb] und *tkvD*[3,3kb]

Die Gründe für die Untersuchung regulatorischer Bereiche aus dem *tkv* Locus als mögliche Ziele von Omb waren das Vorhandensein mehrerer stark konservierter TBEs und die komplementäre Expression von *tkv* und *omb* in Flügelimaginalscheiben.

Fragmente	Genomische Position	TBEs
<i>tkvA</i> [5,2kb]	2L: 5236001-5241500	TBE5: TGGTGTGAGC TBE6: AGGTGTGATT TBE7: AGGTGTTAAA
<i>tkvB</i> [3kb]	2L: 5245001-5249000	TBE8: AAGTGTGAAG
<i>tkvC</i> [4kb]	2L: 5250001-5256000	TBE9: TTTCACACCA TBE10: AGGTGTGAAA
<i>tkvD</i> [3,3kb]	2L: 5257001-5261000	TBE11: AGGTGTGAAG

Tabelle 3.2 TBEs innerhalb der *tkv* Fragmente.

Ursprünglich war die Herstellung von vier *enhancer-reporter* Konstrukten geplant (**Tabelle 3.2, Abbildung 3.40**), die auf eine transkriptionelle Aktivität und eine Regulation durch Omb getestet werden sollten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten die Fragmente *tkvA*, *B* und *D* erfolgreich kloniert werden (*pBPGUw*, 2.2.18). Bislang gelang aber nur für *tkvB* die Erzeugung eines transgenen Fliegenstammes (*tkvB*[3kb]-*Gal4*). Xgal Färbungen von Imaginalscheiben dieses Stammes ergaben keine auswertbaren Ergebnisse.



**Abbildung 3.40 Genregion des *tkv* Locus mit Transkripten auf Chromosom 2L.** Die grünen Balken symbolisieren die zur Klonierung vorgesehenen *enhancer* Fragmente aus überwiegend nichtkodierender, intronischer Sequenz. Alle Fragmente enthalten hoch konservierte TBEs.

### 3.2.11.2 Diskussion

Bei dem *tkvB* Fragment handelt es sich vermutlich um einen regulatorisch inaktiven Bereich. Ein negativer Positionseffekt ist aufgrund des Insertionsortes (58A) unwahrscheinlich. Dennoch könnte ein Sequenzfehler des *enhancer reporter* Konstruktes als mögliche Ursache in Frage kommen, da nur das Fragment selbst überprüft wurde (vgl. letzter Abschnitt von 3.2.7.1).

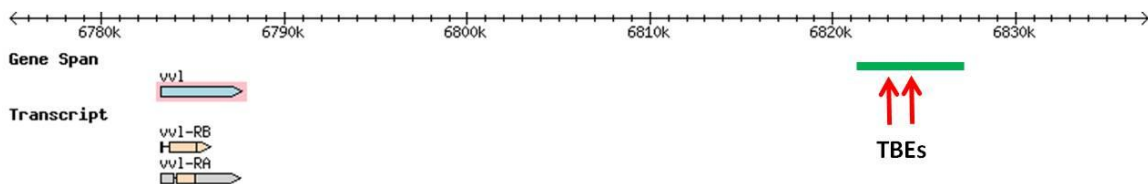
### 3.2.12 *ventral veins lacking (vvl, dfr)*

Das Gen *vvl* kodiert für ein DNA Bindungsprotein mit einer POU Homeodomäne. Es wurde aufgrund seiner Fähigkeit, ein Neuron spezifisches regulatorisches Element zu binden, identifiziert (Johnson, 1995). Eine Mutanten-Analyse legt nahe, dass es für die korrekte Differenzierung und/oder Migration von trachealen Zellen und Mittellinienglia im ZNS erforderlich ist (Anderson et al., 1995). Daneben glaubt man, dass es bei der Differenzierung der Flügelvenen eine Schlüsselrolle spielt. Interaktionen mit verschiedenen Signalwegen, wie z.B. dem Dpp und N Signalweg, weisen darauf hin (de Celis et al., 1995). Während der Larvalentwicklung wird *vvl* in der Flügelimaginalscheibe in allen Zellen bis auf die entlang der D/V Grenze exprimiert. Eine DNaseI *footprinting* Analyse ergab, dass sich innerhalb des *vgQE enhancers* eine Bindungsstelle befindet, die von Vvl mit hoher Affinität gebunden und

aktiviert wird (Certel et al., 2000). Entsprechend erscheint die Expression eines *vgQE-lacZ* Transgens komplementär zu der von *vvf*.

### 3.2.12.1 *vvf*[6,3kb]

*vvf* scheint genauso wie *omb* in den Dpp Signalweg involviert zu sein. Auf dieser Basis, der teilweise überlappenden Expression beider Gene in der Flügelimaginalscheibe und der Identifikation mehrerer hoch konservierter TBEs in der *vvf* Region, wurde *vvf* als potentiell Zielgen von Omb ausgewählt. Zur Untersuchung der transkriptionellen Abhängigkeit von Omb wurde ein 6,3 kb großes Fragment mehr als 30 kb downstream der *vvf* Transkriptionseinheit kloniert (*pH-Pelican-vvf*) und transgen (*PH-Pelican*, 2.2.18) gemacht. Es enthält zwei stark konservierte TBEs mit einem *score* von 10,06 (TBE1: CTTCACACCT) und 8,78 (TBE2: TGTCACACTT). In Imaginalscheiben des Stammes *vvf1-1* konnte aber keine  $\beta$ Gal-Aktivität des *enhancers* festgestellt werden. Allerdings wurde aufgrund der niedrigen Transformationsrate des Konstruktes (0,89%) auch nur eine transgene Linie untersucht.

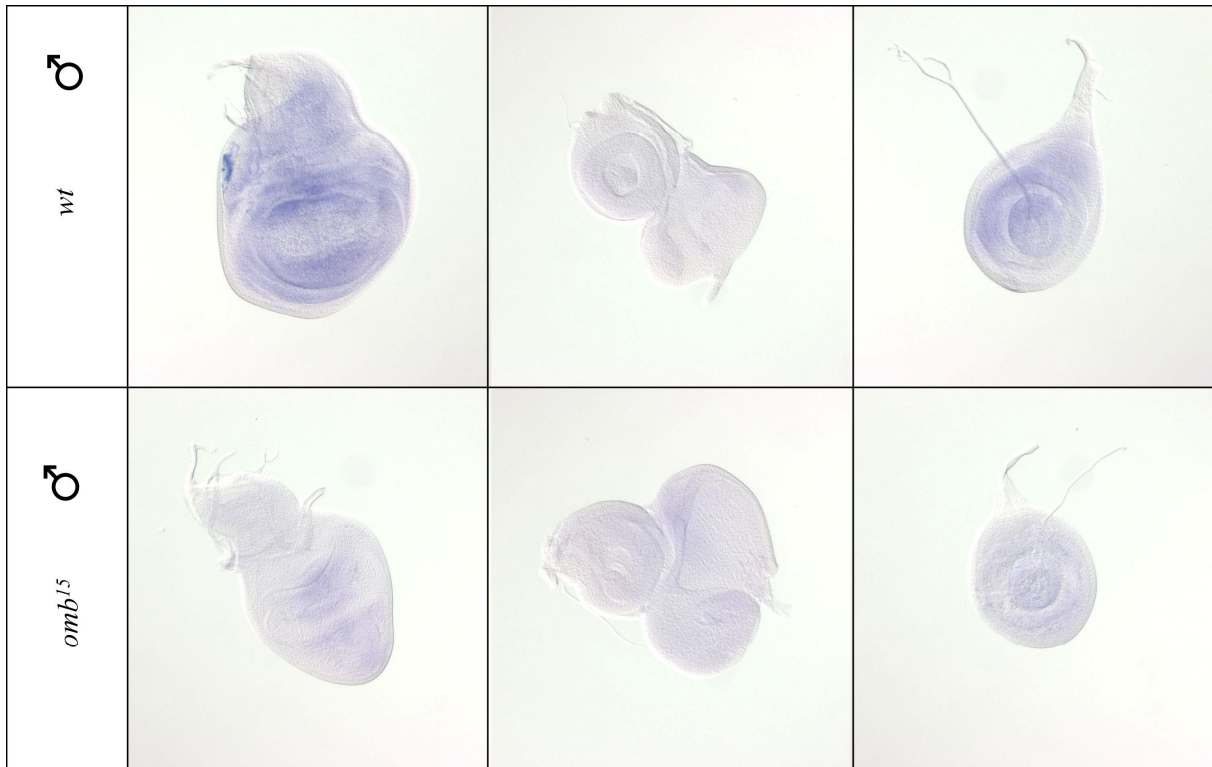


**Abbildung 3.41** Genregion des *vvf* Locus mit Transkripten auf Chromosom 3L. Der grüne Balken symbolisiert das 6,3kb große TBE *enhancer* Fragment mehr als 30kb downstream der *vvf* Transkriptionseinheit.

### 3.2.12.2 *Reguliert Omb die vvf Expression?*

Bevor weitere Fragmente untersucht werden sollten, wollte man als nächstes einen generellen Hinweis auf die Regulation der *vvf* Expression durch Omb bekommen. Dazu wurde eine *vvf* RNA Sonde hergestellt und im Wildtyp und in *omb* mutanten Larven getestet. Wie man in **Abbildung 3.42** sieht, konnte die *vvf* mRNA im Wildtyp in der Flügel*pouch*, bis auf den Bereich der D/V Grenze, und in der dorsalen Notum

und *hinge* Region detektiert werden. In Beinscheiben wurde eine Expression im anterioren Kompartiment gefunden, die in anderen Präparaten variierte.



**Abbildung 3.42** *vvl* Expression in *wt* und *omb<sup>15</sup>* L3 Imaginalscheiben. 1. Reihe: *FMGFP/Y*, 2. Reihe: *omb<sup>15</sup>/Y*. Visualisierung der *vvl* Expression in L3 Imaginalscheiben durch *in situ* Hybridisierung mit einer *vvl antisense* RNA Sonde. In *omb<sup>15</sup>* Scheiben ist die Expression schwach detektierbar und auf Bereiche der pouch beschränkt. Wildtyp und Mutante wurden parallel gefärbt. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

Die *vvl* Expression war in *omb* mutanten Scheiben schwächer und in Flügelscheiben auf Teile der dorsalen und ventralen *pouch* beschränkt. Für einen besseren Vergleich wurden für **Abbildung 3.42** die am stärksten gefärbten Präparate von Wildtyp und Mutante gewählt. Die Qualität der *in situ*-Präparate reicht aber nicht aus, um eine mögliche Aktivierung von *vvl* durch Omb postulieren zu können.

### 3.2.12.3 Diskussion

Eine *enhancer*-Aktivität des *vvl*[6,3kb] Fragments konnte nicht gezeigt werden. Mögliche Ursachen für eine solche Inaktivität wurden bereits in Kapitel 3.2.7.1 angesprochenen. Die große Distanz zur Promotorregion von *vvl* (30kb) sollte als

Grund aber nicht in Frage kommen, da bereits in dieser Arbeit ein Element gefunden wurde, das eine ähnliche Entfernung überbrücken konnte. Ferner bleibt auch die Bedeutung der in *vvl*[6,3kb] gefundenen TBEs für die Regulation durch Omb unklar. Dennoch deutet die Expressionsanalyse von *omb*- Larven mit der *vvl in situ* Sonde auf eine transkriptionelle Aktivierung hin. *Upstream* von *Vvl* wurde ebenfalls ein TBE Cluster entdeckt, das bis jetzt noch nicht untersucht wurde.

Für eine Aktivierung durch Omb könnte auch sprechen, dass die in der Flügelpouch gefundene *vvl* Expression größtenteils mit der des *vestigial-quadrant-enhancers* (*vgQE*) übereinstimmt. Dieser *enhancer* ist für die *vg* Expression im dorsalen und ventralen Kompartiment verantwortlich, enthält eine für die Aktivierung notwendige *Vvl*-Bindestelle und wird wahrscheinlich indirekt von Omb kontrolliert (Certel et al., 2000; del Alamo Rodriguez et al., 2004; diese Arbeit 3.2.13.2). Ein möglicher Verlust der *vvl* Expression in *omb*<sup>15</sup> könnte also den *vgQE-lacZ* Expressionsverlust im gleichen genetischen Hintergrund erklären.

### 3.2.13 *vestigial* (*vg*)

Dpp ist ein Morphogen, das in einem Zellstreifen anterior der A/P Kompartimentsgrenze der Flügelimaginalscheibe exprimiert wird. Aufgrund seines extrazellulären Transports in das anteriore und posteriore Kompartiment bildet es einen Gradienten, der zu den lateralen Seiten hin abfällt. In der Flügelpouch werden abhängig von der vorliegenden Dpp Konzentration Zielgene in bestimmten Domänen aktiviert (Affolter et al., 2001; Tabata, 2001). Zu ihnen gehören *spalt* (*sal*), *omb* und *vg*.

*vg* gilt als ein typisches Flügelgen, da es für die Proliferation von Flügelzellen erforderlich ist und im Stande ist, Flügelstrukturen zu induzieren, wenn es ektopisch in Augen, Beinen oder Antennen exprimiert wird (Kim et al., 1996; Umemori et al., 2007). Für die vollständige Aktivierung von *vg* in der Flügelimaginalscheibe ist neben dem durch Dpp vermittelten A/P-Achsen-signal auch eines der D/V-Achse notwendig, welches durch den Notch-Signalweg kontrolliert wird. Die Integration beider Signale geschieht über zwei cis-regulatorische Bereiche der *vg* Transkriptionseinheit, die als *vg-quadrant-enhancer* (*vgQE*) und *vg-boundary-enhancer* (*vgBE*) bezeichnet werden (Kim et al., 1997; Kim et al., 1996). Der *vgQE enhancer* ist ein gut charakterisiertes

regulatorisches Element, das neben Dpp abhängigen Mad Bindestellen, eine potentielle E(spl) Erkennungssequenz und eine Vvl Bindestelle enthält (Certel et al., 2000; Kim et al., 1996). Es gibt außerdem Hinweise, die auf eine Autoregulation der *vg* Aktivität hindeuten. Dabei veranlasst ein bisher unbekanntes Signal *vgBE* kontrollierter Zellen in Kombination mit *Wg* benachbarte Zellen ihre *vgQE* kontrollierte *Vg* Produktion zu aktivieren (Zecca and Struhl, 2007).

### 3.2.13.1 *vgQE*[1kb]

*Omb* ist für die Aktivierung des *vgQE enhancers* notwendig. Das konnte in einer Expressionsanalyse mit dem Nullallel *omb*<sup>3198</sup> gezeigt werden (del Alamo Rodriguez et al., 2004). Demnach sollte hier die Frage beantwortet werden, ob es sich dabei um einen direkt von *Omb* kontrollierten Bereich handelt. Ein bioinformatischer Test dieses *enhancers* identifizierte zwei schwach konservierte TBEs mit einem score von 5,7 (TBE24: GTCCCCACCT) und 4,95 (TBE25: GAGTGTGCCA). Der von Kim (1996) beschriebene *vgQE enhancer* wurde zusammen mit weiteren 200bp intronischer DNA (**Abbildung 3.43**) in den *Gateway Destination* Vektor (*pBPGU-vg-Gal4*) kloniert und eine Keimbahntransformation an *Drosophila* Embryonen zur Erzeugung transgener Fliegenstämme durchgeführt. Die Expressionsanalyse dieses *vgQE* Konstruktes (Stamm *vgQE-Gal4 2-2*) in L3 Imaginalscheiben zeigte eine  $\beta$ Gal Aktivität, die mit der in der Literatur beschriebenen übereinstimmt. Sie zeichnete sich durch eine Färbung der dorsalen und ventralen Hälfte der Flügelpouch aus, wobei



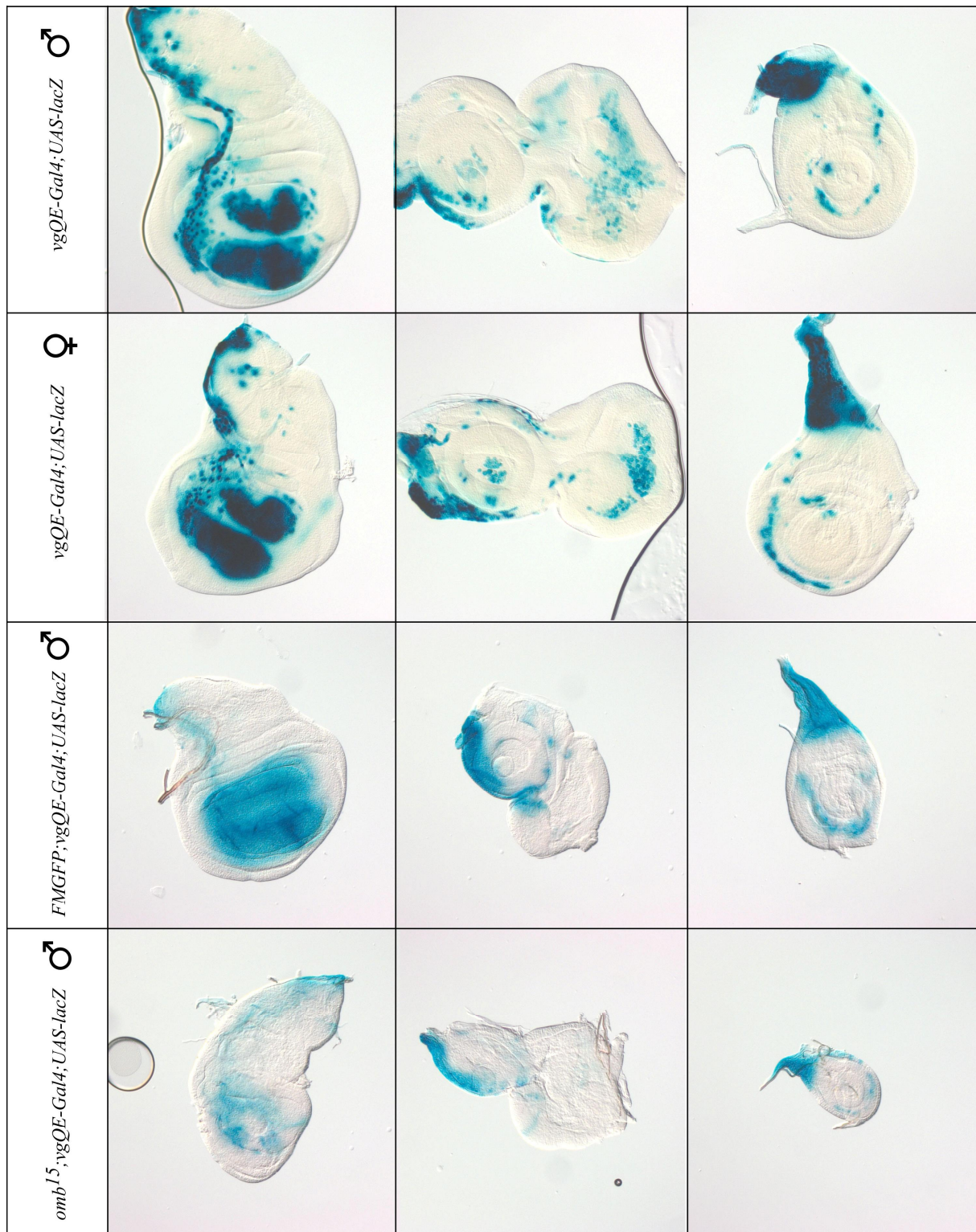
**Abbildung 3.43** Genregion des *vg* Locus mit Transkripten auf Chromosom 2R. Der grüne Balken symbolisiert das klonierte 1kb große TBE *enhancer* Fragment (TBE24 und TBE25) aus Intron 4 der *vg* Transkriptionseinheit. Die TBEs sind Teil des von Kim (1996) beschriebenen *vgQE enhancers*, der sich in diesem Fragment befindet.

der Bereich der D/V Grenze ausgespart bleibt (**Abbildung 3.44**). Charakteristisch ist das Muster eines Quadranten. In Antennen- und Beinscheiben zeigte sich eine

Färbung proximaler Segmente. Eine intensive Färbung konnte außerdem in der „Stielregion“ von Beinscheiben entdeckt werden. *omb* mutante Flügelscheiben zeigten deutlich den Verlust des Quadrantenmusters, was auf eine Aktivierung des *enhancers* durch *Omb* hindeutete. Die Färbung der anderen Imaginalscheiben blieb im *omb*<sup>0</sup> Hintergrund unverändert.

### 3.2.13.2 Omb aktiviert die *vgQE[1kb]* Expression unabhängig der TBEs

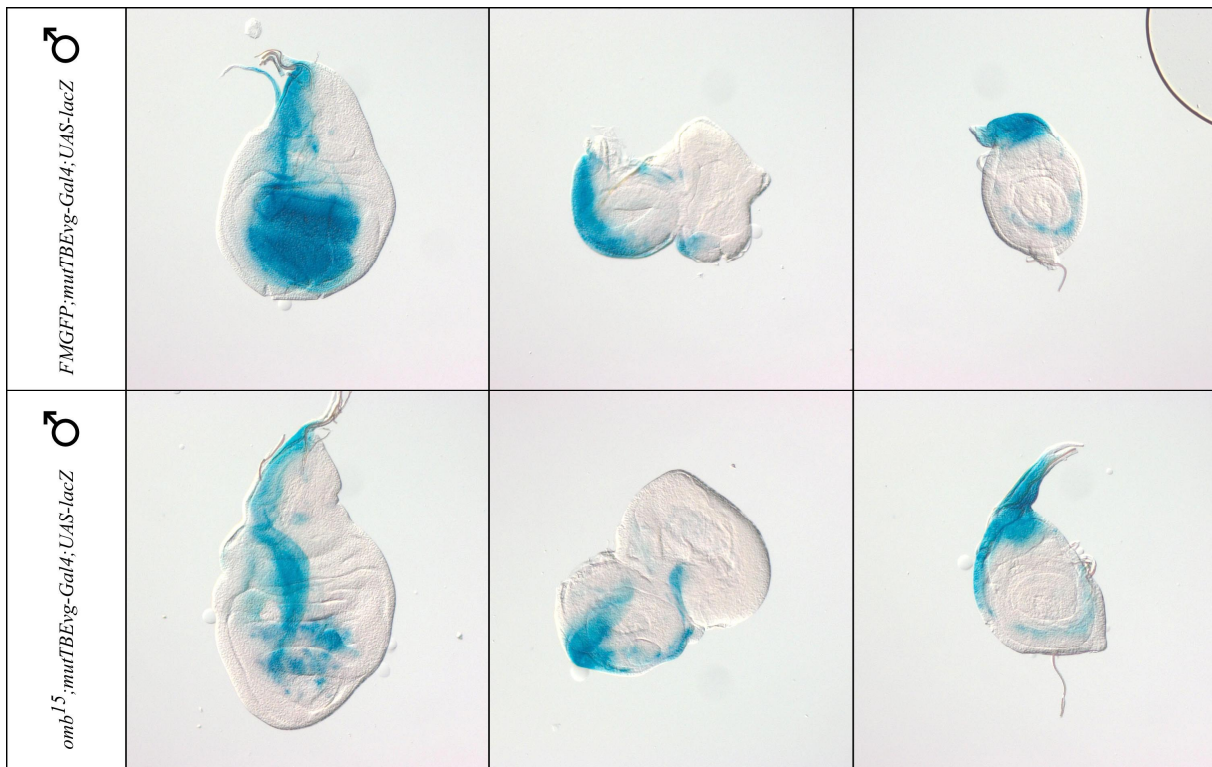
Zur Klärung der Frage, ob die potentiellen TBEs des oben beschriebenen *vgQE[1kb]* *enhancers* für die Aktivierung durch *Omb* notwendig sind, wurden beide Bindestellen in zwei PCRs mutiert (2.2.17.2). Wichtig war dabei die Manipulation der für TBEs essentiellen Kernsequenz GTG (CAC). Nach der Klonierung und der Transgenese des entsprechenden *pBPGUw-mutTBEvgQE-Gal4* Konstruktes konnte eine mögliche Wirkung in Imaginalscheiben untersucht werden. Es zeigte sich aber, dass das QE-spezifische Quadrantenmuster in Flügelscheiben trotz mutierter TBEs immer noch exprimiert wurde (**Abbildung 3.45**). Die Erwartung war, dass die Mutation der TBEs einen ähnlichen Effekt wie ein *omb* Verlust haben sollte. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die TBEs des *QE-enhancers* keinen Einfluss auf dessen Aktivierung haben und somit auch nicht für eine Regulation durch *Omb* erforderlich sein können.



**Abbildung 3.44 X-Gal Färbung von Imaginalscheiben des Stammes *vgQE-Gal4 2-2*.** 1. und 2. Reihe: *+/+;vgQE-Gal4/+;UAS-lacZ/+*. 3. Reihe: *FMGFP/Y;vgQE-Gal4/+;UAS-lacZ/+*. 4. Reihe: *l(1)omb<sup>15</sup>/Y;vgQE-Gal4/+;UAS-lacZ/+*. Das Quadranten-ähnliche Muster der Xgal Färbung wird in *omb<sup>0</sup>* Flügelscheiben nicht exprimiert. Die Imaginalscheiben in Reihe 3 und 4 wurden parallel für nur 2 h gefärbt. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)



Bestätigt wurde dies durch die Untersuchung der Expression dieses Konstruktes im *omb* mutanten Hintergrund. Wie schon für das wildtypische *vgQE-Gal4* Konstrukt beschrieben wurde, verlor auch das mutierte TBE-Fragment durch *omb* Verlust seine Aktivität (**Abbildung 3.45** 2. Reihe) in Flügelscheiben. Damit wird deutlich, dass Omb auch jetzt noch für die Aktivierung des Elements notwendig ist.

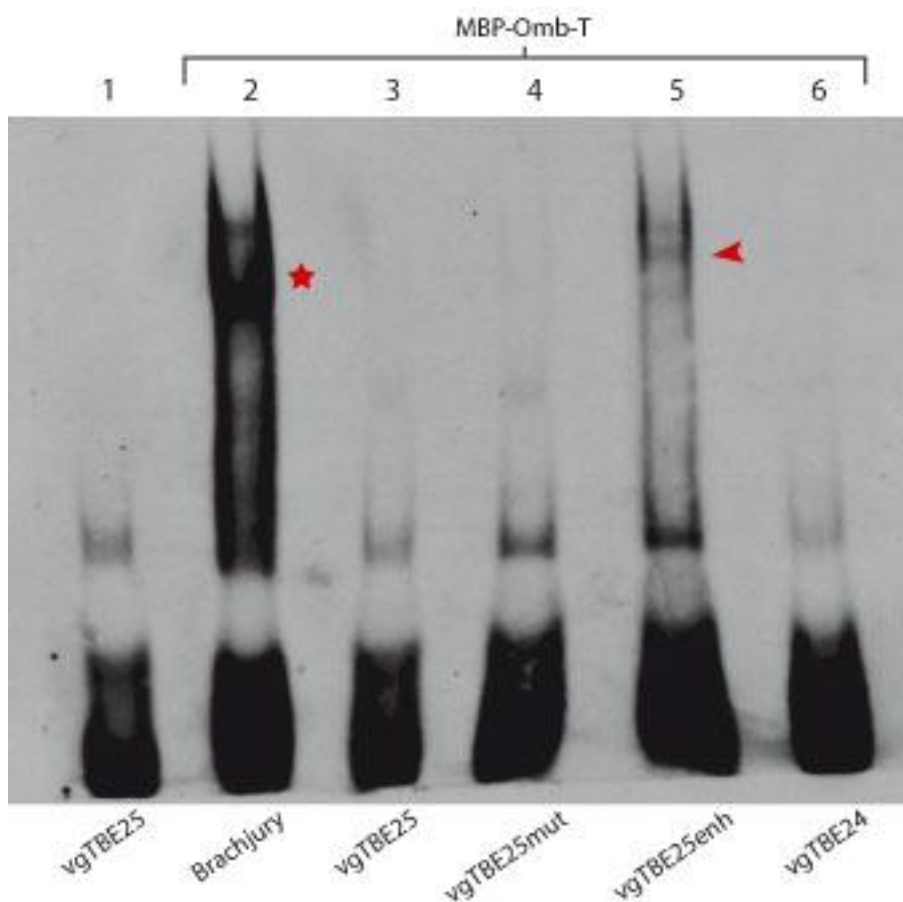


**Abbildung 3.45** X-Gal Färbung von Imaginalscheiben des Stammes *mutTBEvgQE-1-1-Gal4*. 1. Reihe: *FMGFP/Y;mutTBEvgQE-Gal4/+;UAS-lacZ/+*. 2. Reihe: *I(1)omb<sup>15</sup>/Y;vgQE-Gal4/+;UAS-lacZ/+*. Das Quadranten ähnliche Muster wird trotz mutierter TBEs exprimiert und ist in *omb<sup>15</sup>* stark reduziert. Beide Genotypen wurden parallel 2h gefärbt. (von links nach rechts: Flügel-, Augenantennen- und Beinscheibe)

### 3.2.13.3 Omb-Bindungsverhalten *in vitro*

Um abschließend das DNA Bindungsvermögen von Omb an TBE24 und TBE25 *in vitro* zu testen, wurden EMSA Versuche durchgeführt. Dabei wurde das bereits untersuchte, wildtypische Omb-T Fusionsprotein (3.1.5) verwendet. Wie sich herausstellte, ist Omb-T nicht in der Lage, die vermeintlichen *vgQE*-TBEs zu binden. Sogar zu TBE25 (score 4,95), welche immerhin in 8 von 12 *Drosophila* Spezies konserviert ist, schien Omb-T keine erkennbare Affinität zu haben. Stattdessen

konnte mithilfe einer künstlichen, hoch affinen Form von TBE25 (TBE25enh, AGGTGTGAGA) ein Bandshift erzielt werden (**Abbildung 3.46**). Der Shift von TBE25enh war dennoch schwächer als der der Brachyury Konsensus Sequenz. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Omb hier als Homomer bindet, während es im Fall des Brachyury Palindroms als Dimer bindet. Das Ergebnis bestätigt den Verdacht, dass die einzigen in der *vgQE* Sequenz gefundenen TBEs funktionslos sind und auf die Aktivierung des *enhancers* durch Omb keinen Einfluss haben. Mangels geeigneter Bindestellen für Omb wird eine indirekte Regulation über einen weiteren Faktor sehr wahrscheinlich.



**Abbildung 3.46 EMSA verschiedener TBEs des *vgQE enhancers* mit MBP-Omb-T.** Die *wt vgQE*-TBEs (3. und 6. Spur) sowie eine mutante Form von TBE25 (4. Spur) werden von Omb-T nicht gebunden. Stattdessen bindet Omb-T an die Sequenz einer artifiziellen, „highscore“ TBE25 (5. Spur Pfeilspitze). 1. Spur: ohne Protein. 2. Spur: Bandshift des Brachyury consensus Palindroms durch Omb-T als Positivkontrolle (\*).

### 3.2.13.4 Diskussion

Mithilfe des *vgQE-Gal4* Transgens konnte eine *enhancer*-Aktivität festgestellt werden, die erwartungsgemäß einen Teil des endogenen *vg* Expressionsmusters in der Flügel*pouch* wiedergibt. Hier handelt es sich um das bereits beschriebene Quadranten-Muster (Kim et al., 1996), von dem bekannt ist, dass es von Omb abhängig ist (del Alamo Rodriguez et al., 2004). Eine Bestätigung dessen konnte auch hier unter Verwendung des *l(1)omb<sup>15</sup>* Allels erbracht werden.

Trotz der Mutation der in *vgQE* gefundenen TBEs besaß Omb immer noch einen aktivierenden Einfluss auf die Transkription. Die Vermutung liegt also nahe, dass es sich bei beiden TBEs um keine echten Bindestellen handelt. Die hier durchgeführten EMSA Versuche untermauern diese Vermutung. Gegen eine Funktionalität der TBEs spricht außerdem ihr niedriger *score* und die schlechte Konservierung innerhalb der *Drosophiliden*. Da sich keine weiteren potentiellen Omb Bindestellen innerhalb des *enhancers* befinden, kann somit eine direkte Interaktion ausgeschlossen werden.

Wenn es einen weiteren Faktor gibt, der für eine Vermittlung der Omb Aktivität wichtig ist, dann wäre *Vvl* ein solcher Kandidat. Die in *vgQE* gefundene Bindestelle ist für die Aktivierung des *enhancers* notwendig (Certel et al., 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die *vvl* Expression in der Flügel*pouch*, die mit der von *vgQE* überlappt, auch durch Omb aktiviert wird (**Abbildung 3.42**). Der Test von möglicherweise Omb abhängigen TBE-Fragmenten in der *vvl* Region ist noch nicht abgeschlossen (3.2.12.1).

In *vgQE* wurden auch zwei *Mad* Bindestellen gefunden (Certel et al., 2000). Die *Dpp*-Signalgebung, die entsprechend für die Aktivierung von *vg* erforderlich ist, ist in *omb*-Scheiben nicht beeinträchtigt (del Alamo Rodriguez et al., 2004). Stattdessen wurden sogar höhere *Tkv* und *p-Mad* Level gefunden. Ferner konnte gezeigt werden, dass in lateral gelegenen mutanten Klonen des Omb Inhibitors *Brk omb* zwar stark exprimiert wurde, das *Vg* Level dagegen aber nur gering war (Campbell and Tomlinson, 1999). Für eine Aktivierung von *vg* scheint also zusätzlich zu Omb auch die *Dpp*-Signalgebung erforderlich zu sein. Für das durch Omb kontrollierte Gen *sal* konnte ein ähnlicher Mechanismus gezeigt werden. In *brk Mad* doppelt mutanten Klonen wurde *omb* stark exprimiert, *sal* dagegen nur wenig (Jazwinska et al., 1999). Die Möglichkeit, dass Omb bei der Aktivierung mancher *Dpp*-Zielgene als Koaktivator fungiert (del Alamo Rodriguez et al., 2004) ist nach wie vor denkbar. Unter

Berücksichtigung der hier vorliegenden Ergebnisse wäre dann bei der Aktivierung von *vgQE* für Omb eher eine Rolle als Protein-Protein-Interaktionspartner vorstellbar, als ein DNA bindendes Protein. Für Tbx2 dem nächsten menschlichen Verwandten von Omb konnte eine Protein-Protein-Interaktion gezeigt werden. Tbx2 benötigt für die Unterdrückung des Tumor Suppressor Gens NDRG1 (*N-myc downregulated gene 1*) die Rekrutierung von EGR1 (*Early growth response 1*) um die Zellproliferation voran zu treiben (Redmond et al., 2010).

Neben den erwähnten Bindestellen für Vvl und Mad befindet sich noch eine potentielle E(spl) Erkennungssequenz in *vgQE*. Über eine Funktion von E(spl) im Zusammenhang mit der *vgQE* Expression ist bislang nichts Genaues bekannt. Es wird vermutet, dass die Repression der *vgQE* Expression durch Su(H) an der D/V Grenze durch E(spl) vermittelt wird (Kim et al., 1996).

### 3.3 Expression von Vertebraten Tbx Genen in *Drosophila*

Zum Vergleich der biologischen Wirkung verschiedener Tbx Gene in einem Organismus muss sichergestellt werden, dass sie in gleicher Stärke in einem Gewebe exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde von A. Legler (Legler, 2010) der Gateway kompatible *pCa4B2G-UAS-GW* Vektor zur Aufnahme dieser Gene konstruiert. Dieser Vektor erlaubt die gerichtete Integration des zu untersuchenden Gens an dafür bestimmte Zielsequenzen (*attP sites*) im Genom (Bischof, 2007; Groth, 2004). Dank der UAS Sequenz des Vektors kann es dann unter Gal4 Kontrolle exprimiert werden (Brand and Perrimon, 1993). Durch das Anfügen von FLAG Sequenzen sollte außerdem ein späterer Antikörpernachweis der Genprodukte ermöglicht werden.

A. Legler synthetisierte Expressionskonstrukte für *omb*, Tbx2, Tbx3 und Tbx5. Ausgangspunkt dafür war die Amplifikation einer FLAG tagged cDNA der entsprechenden Klone in einer linker PCR (*primer* 1024 und 1079 für Tbx2; *primer* 1029 und 1080 für Tbx3; *primer* 1082 und 1083 für *omb*; *primer* 1056 und 1081 für Tbx5). Wegen des hohen G/C Gehaltes der cDNAs wurde hierfür das GC-rich PCR System (Roche) verwendet. Die vier Konstrukte wurden schließlich für die Herstellung transgener Integrationslinien verwendet. Durch die Wahl eines gemeinsamen Fliegenstammes bei den Transgenesen wurde gewährleistet, dass alle Konstrukte an der gleichen genomischen Position 58A integriert wurden. In einem ersten Versuch von Herrn Pflugfelder konnte bereits die Auswirkung einer ektopischen Expression untersucht werden. Dazu wurden die transgenen Linien mit *dpp-Gal4* gekreuzt. Von *omb* weiß man, dass es unter solchen Bedingungen die Augenentwicklung hemmt und die Bildung eines zusätzlichen Flügelpaares auf dem Notum induziert (Grimm and Pflugfelder, 1996; Porsch et al., 2005). Wie erwartet konnte mit *dpp>Tbx2* und *dpp>Tbx3* ein ähnlicher Phänotyp erzeugt werden. Die ektopische Expression von *omb-58A* und Tbx5 hatte dagegen keine phänotypischen Auswirkungen. Ein Nachweis der in Flügelimaginalscheiben exprimierten FLAG gekoppelten Proteine durch Western Blots gelang schließlich nur im Fall von TBX2 und TBX3, nicht aber für Omb und TBX5 (Hau, 2010).

Im Folgenden wird die Sequenzanalyse und Reparatur der cDNA Konstrukte von *omb* und Tbx5 beschrieben.

### 3.3.1 *pEntry-D-Topo-omb-3xflag* und *pCa4B2G-UAS-GW-omb-3xflag*

#### 3.3.1.1 Sequenzanalyse des *pCa4B2G-UAS-GW-omb-3xflag* aus der Arbeit von Anne Legler (AL)

Der für die Transformation verwendete Klon von *pCa4B2G-UAS-GW-omb-3xflag* wurde mit den *Primern* 1052 und 1053 sequenziert (**Tabelle 3.3**).

Primer Nr.	Primer Name	sequenzierter Bereich in <i>pCa4B2G-UAS-GW-omb-3xflag</i>	fehlerarmer Bereich in <i>pCa4B2G-UAS-GW-omb-3xflag</i> (Position in Omb ORF)	Mutationen in <i>pCa4B2G-UAS-GW-omb-3xflag</i> (Position in Omb ORF)	Omb Proteinsequenz
1052	pTRexDest30-681for	1039-2266	1058-2023 1-956	C1713G C650G	P216A
1053	pTRexDest30-2404rev	3350-4084	3590-4069 2523-3002	G3979 fehlt G2912 fehlt	Rasterschub

**Tabelle 3.3** Partielle Sequenzanalyse von *pCa4B2G-UAS-GW-omb-3xflag*.

Die Sequenzierung mit Primer 1052 wies im Bereich des Omb-ORF 1-956 verglichen mit der *Flybase* Sequenz CG3578-RA die Veränderung C650G auf, die auf Proteinebene zu P216A führt. Die P216-Variante wird schon durch die ursprüngliche cDNA *pceT3-1* kodiert (Pflugfelder et al., 1992a). Sie liegt im schwach konservierten und funktionsarmen (Porsch et al., 2005) N-Terminus, so dass es sich wahrscheinlich um einen Polymorphismus mit geringer funktioneller Bedeutung handelt (vgl. 3.3.1.3). Die Sequenzierung mit *Primer* 1053 zeigte, dass 11 bp vor dem *FLAG-tag* G3979 fehlt. Diese Mutation liegt im Bereich des *FLAG-tag Primers*, der zur Amplifikation der cDNA verwendet wurde. Sie verursacht einen Rasterschub, der ein korrektes Ablesen des *FLAG-tags* unmöglich macht. Dieselbe Mutation fand sich auch in dem Klon *pTRex30-omb-3xflag*, der sich von demselben Subklon (*pEntry-D-Topo-omb-3xflag*) ableitete, so dass die Mutation wahrscheinlich schon in dieser DNA vorliegt.

### 3.3.1.2 Mutagenese zur Korrektur einer Rasterschub-Deletion in *pEntry-D-Topo-omb-3xflag* (Remutation 1)

Zur Korrektur der Deletion G3979 in *pEntry-D-Topo-omb-3xflag* wurde eine Rückmutation mit den *Primern* 1236 und 1237 durchgeführt (2.2.17.2).

### 3.3.1.3 Sequenzanalyse von *pEntry-D-Topo-omb-3xflag-remut-1*

Vor der Herstellung eines Transformationsvektors aus dem remutierten *pEntry-D-Topo-omb-3xflag* sollte sichergestellt werden, dass dieser keine weiteren Mutationen enthielt. Er wurde daher einer gründlichen Sequenzanalyse unterzogen (**Tabelle 3.4**). Die Sequenzierung zeigte, dass die Deletion von G3979 erfolgreich korrigiert worden war, dass es aber Abweichungen zur *omb* Sequenz CG3578-RA gab. Zwei dieser Abweichungen, C646G (bewirkt P216A im N-Terminus) und G1533T (bewirkt L511F am Ende der T-Domäne) sind bereits in der ursprünglichen *omb* cDNA *pceT3-1* enthalten. Die von S. Grimm synthetisierten *UAS-omb* und *hs-omb* Konstrukte kodieren für die P216 und L511 Variante und waren in transgenen Fliegen funktionell (Grimm and Pflugfelder, 1996; Porsch et al., 2005). F511 ist eine unter allen Tbx Proteinen vollständig konservierte Aminosäure. Dennoch scheint L511 die Omb Funktion zumindest in *gain-of-function* Experimenten nicht zu beeinträchtigen. Daneben enthielt der Klon *pEntry-D-Topo-omb-3xflag-remut-1* eine Mutation im C-terminalen Bereich (A2084G, N695S). Ein Alignment der wildtypischen (kodiert durch CG3578-RA) gegen die dreifach mutante Form der *omb* Sequenz findet sich im Anhang (5.1).

Primer Nr.	Primer Name	sequenzierter Bereich in <i>pEntry-D-Topo-omb-3xflag-remut-1</i>	fehlerarmer Bereich in <i>pEntry-D-Topo-omb-3xflag-remut-1</i> (Position in Omb ORF)	Mutationen in <i>pEntry-D-Topo-omb-3xflag-remut-1</i> (Position in Omb ORF)	Omb Proteinsequenz
1096	Omb-237rev	235-908	290-886 1-198		
1032	1173rev (omb exon II)	323-1225	330-1220 1-532		

749	39219for (omb exon II)	983-2245	996-1950 308-1262	C1334G C646G	P216A
1185	ombTU12A- 7182rev	821-2036	1107-2036 419-1348	C1334G C646G	P216A
751	39921for (omb exon II)	1680-2677	1707-2435 1019-1747	G2221T G1533T	L511F
1050	ombTU69773re v	1419-2602	1845-2092 1157-1404		
631	omb88741for	2135-2648	2167-2494 1479-1806	G2221T G1533T	L511F
756	omb756 (omb exon VII/VIII)	2072-3325	2389-3320 1701-2632	A2772G A2084G	N695S
753	omb753 (omb exon VII/VIII)	2566-3023	2566-2703 1878-2015	A2772G A2084G	N695S
755	omb755 (omb exon VII/VIII)	2967-3474	3160-3238 2472-2550		
757	omb757 (omb exon VII/VIII)	3282-4599	3301-4221 2613-end	G4071- (außerhalb von ORF)	
1012	ombTU70498fo r	3384-3687	3384-3687 2696-end		

Tabelle 3.4 Sequenzanalyse von *pEntry-D-Topo-omb-3xflag-remut-1*.

### 3.3.1.4 Austausch des dreifach mutierten Bereichs in *pEntry-D-Topo-omb-3xflag-remut-1* (Remutation 2)

Die drei Polymorphismen/Mutationen C1334G, G2221T und A2772G liegen innerhalb eines *AccI-NcoI* Restriktionsfragmentes der *omb* cDNA. A2772G sollte daher durch einen konventionellen Austausch des defekten Fragmentes gegen das korrespondierende Fragment aus dem originalen *omb* cDNA-Klon *pceT3-1* (Pflugfelder et al., 1992a) ersetzt werden. Ein auf diese Weise synthetisierter Klon wurde durch Sequenzierung ausführlich charakterisiert. Wie erwartet wurde nur A2772G durch den Fragmentaustausch korrigiert, da die beiden anderen Variationen



bereits in dem *pceT3-1* Klon vorhanden waren und somit ebenfalls transferiert wurden.

### 3.3.1.5 Charakterisierung des *pCaB2G-UAS-GW-omb-3xflag*

Das *omb* Insert des *pEntry-D-Topo-omb-3xflag-remut-2* Klons wurde in einer Klonase-Reaktion in den *Destination* Vektor *pCa4B2G-UAS-GW* (Legler, 2010) transferiert und nach einer Maxipräparation nochmals sequenziert (**Tabelle 3.5**).

Primer Nr.	Primer Name	sequenzierter Bereich in <i>pCaB2G-UAS-GW-omb-3xflag</i>	fehlerarmer Bereich in <i>pCaB2G-UAS-GW-omb-3xflag</i> (Position in Omb ORF)	Mutationen in <i>pCaB2G-UAS-GW-omb-3xflag</i> (Position in Omb ORF)	Omb Proteinsequenz
1052	pTRexDest30-681for	1043-2262	1049-2067 1-999	C1713G (s. auch 1185) C646G	P216A
1032	1173rev (omb exon II)	373-1596	697-1593 1-525	keine	
749	39219for (omb exon II)	schlechte Sequenz			
1185	ombTU12A-7182rev	1168-2411	1450-2398 382-1330	C1713G (s. auch 1052) C646G	P216A
751	39921for (omb exon II)	2060-2877	2086-2399 1018-1331	keine	
631	omb88741for	2507-3713	2519-3367 1451-2299	G2600T G1533T eindeutige Mutation nach Chromatogramm	L511F
756	omb756rev (omb exon VII/VIII)	2488-3704	2779-3700 1711-2632	DC2899 (ok in 631) DC1831 Chromatogramm nicht eindeutig	
755	omb755	3342-4561	3359-4203	keine	

	(omb exon VII/VIII)		2291-3155		
757	omb757 (omb exon VII/VIII)	3664-4625 4773-5097	3680-4625 2612-3557 4773-4853 3705-3785	keine	
1053	pTRexDest30-2404rev	2850-4084	3103-4080 2035-3012	DC3270 (ok in 756) DC2202	

**Tabelle 3.5 Sequenzanalyse von *pCaB2G-UAS-GW-omb-3xflag*.** Omb ORF beginnt bei 1068 und endet bei 4055. Beide Abweichungen von der ursprünglichen cDNA Sequenz beruhen wahrscheinlich auf dort enthaltenen Fehlern (Pflugfelder et al., 1992a) (Pflugfelder pers. Mitteilung).

### 3.3.2 *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag* und *pCa4B2G-UAS-GW-Tbx5-3xflag*

#### 3.3.2.1 Sequenzanalyse des *pCa4B2G-UAS-GW-Tbx5-3xflag* (AL)

Die Sequenzierung von *pCa4B2G-UAS-GW-Tbx5-3xflag* ergab überraschenderweise, dass dem Klon genau die Sequenz des *FLAG-tag Primers* 1081 fehlte (93 bp). Das 5' Ende der klonierten Sequenz begann dagegen korrekt mit dem CACCATG Motiv, das durch den *Primer* 1056 angehängt wurde. **Tabelle 3.6** fasst die Ergebnisse der Sequenzierung zusammen.

<i>Primer</i> Nr.	<i>Primer Name</i>	sequenzierter Bereich in <i>pCa4B2G-UAS-GW-Tbx5-3xflag</i>	fehlerarmer Bereich in <i>pCa4B2G-UAS-GW-Tbx5-3xflag</i> (Position in TBX5 ORF)	Mutationen in <i>pCa4B2G-UAS-GW-Tbx5-3xflag</i> (Position in TBX5 ORF)	TBX5 Proteinsequenz
1097	TBX5-202rev	10-1190	249-1190 1-123		
1052	pTRexDest30-681for	1039-1659	1058-1496 1-429	T1424- T357	
1053	pTRexDest30-2404rev	2134-2600	**		
1098	TBX5-1276for	2378-3895	2398-2601 1331-1534	2601-2693 1544-1626	FLAG-tag fehlt

			2694–3257 1627-2190 3405–3601 2338-2534	fehlt (FLAG-tag) und 3258-3404 2191-2337 fehlt (aus dem Vektor)	
1072	UAScass177rev	3523-4716	3541–4506 2474-stop	Pentanukleotid fehlt*** 3669-3673 2602-2606	außerhalb des TBX5- ORF

**Tabelle 3.6 Sequenzanalyse des *pCa4B2G-UAS-GW-Tbx5-3xflag*.**

\* T1424 befindet sich am Ende des verlässlich sequenzierten Bereichs. \*\* Eine schlecht lesbare Sequenz, die aber das Fehlen der FLAG-tag Sequenz bestätigt. \*\*\* Die gleiche 5 bp Deletion fand sich bei TBX3. Sie kann somit für Transgenese und Expression nicht notwendig sein.

### 3.3.2.2 Sequenzanalyse des *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag* (AL)

Durch Sequenzierung von Anne Leglers *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag* sollte untersucht werden, ob die Deletion des *FLAG* tags bereits im *Entry*-Klon zu finden war. Auch hier fehlte die *FLAG* tag Primer Sequenz (**Tabelle 3.7**). Ansonsten war die Sequenz fehlerfrei.

Primer Nr.	Primer Name	sequenzierter Bereich in <i>pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag</i> (AL)	fehlerarmer Bereich in <i>pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag</i> (AL) (Position in TBX5 ORF)	Mutationen in <i>pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag</i> (AL) (Position in TBX5 ORF)	TBX5 Proteinsequenz
1097	TBX5-202rev	117 - 857	259 – 857 1 - 169	keine/ keine	
1032	1173rev (omb-exon II)	571 - 1800	571 – 1533 1 - 845	keine/ keine	
1244	TBX5-394for	1121 - 2221	1121 – 2112 433 - 1424	keine/ keine	
1243	TBX5-1373rev	811 - 2038	1230 – 2038 542 - 1350	keine/ keine	
1242	pENTR-DTopo-865rev	1154 - 2221 2311 - 2468	1422 - 2221 734 - stop	keine/ keine keine/ keine	FLAG-tag fehlt

			2315 - 2464 außerhalb des ORF	C1536- in 1243 nicht bestätigt	
1098	TBX5-1276for	1999 - 2221 2311 - 3324	2019 - 2221 1331 - stop 2315 - 2942 außerhalb des ORF	keine/ keine keine/ keine	FLAG-tag fehlt

**Tabelle 3.7** Sequenzanalyse des *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag* (Anne Legler).

### 3.3.2.3 Resynthese und Sequenzanalyse des *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag*

Um zu untersuchen, ob der FLAG-Defekt bereits während der Amplifikation aufgetreten war, wurde das TBX5 Amplifikat, das A. Legler zur Konstruktion verwendet hatte, nochmals in *pEntry-D-Topo* kloniert (*invitrogen*) und ein positiver Klon durch Sequenzierung analysiert (**Tabelle 3.8**).

Primer Nr.	Primer Name	sequenzierter Bereich in <i>pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag</i>	fehlerarmer Bereich in <i>pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag</i> (Position in TBX5 ORF)	Mutationen in <i>pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag</i> (Position in TBX5 ORF)	TBX5 Proteinsequenz
1097	TBX5-202rev	4054-4206 6-857	48-857 1-169	Einführung einer 13 bp Insertion 8 bp upstream vom ATG start codon	
1032	1173rev (omb-exon II)	574-1837	574-1587 1-899	Einführung einer 13 bp Insertion 8 bp upstream vom ATG start codon T1269A T581A	
1244	TBX5-394for	1135-2006	1156-1804 468-1116	T1269A T581A	F194Y
1243	TBX5-1373rev	1007-1993	1232-1993 544-1305	T1269A T581A	F194Y
1242	pENTR-DTopo-865rev	1599-2443	1599-2443 911-stop	G2208A G1520A	G507E
1098	TBX5-1276for	1998-3262	2019-2942	G2208A	G507E

			1331-stop	G1520A	
--	--	--	-----------	--------	--

**Tabelle 3.8 Sequenzanalyse des neu hergestellten *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag*.** *Primer 1032* hat partielle Sequenzhomologie zu TBX5 und wurde in weiteren TBX5-Sequenzierungen nicht verwendet.

In diesem Klon war der *FLAG tag* intakt, allerdings fand sich die Mutation G2208A am Ende des TBX5 ORF, 14 Nukleotide *upstream* vom 5' Ende des zur Amplifikation verwendeten *FLAG Primers 1081*. Diese Mutation bewirkt den Aminosäureaustausch G507E. Wahrscheinlich gravierender ist die zweite Mutation in diesem Klon. T1269A bewirkt am 3' Ende der T-box den Austausch F194Y. An dieser Position findet sich bei allen Proteinen der Tbx2 Unterfamilie stets eine hydrophobe Aminosäure (L oder F). Es ist daher möglich, dass die Mutation eine Funktionsveränderung bewirkt.

### 3.3.2.4 Reparaturmutagenese des *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag (AL)*

Aufgrund der Sequenzfehler des A. Legler Klons (3.3.2.2) und des hier resynthetisierten Klons (CG Klon, 3.3.2.3) erschien eine Kombination aus beiden Vektoren als die sinnvollste Strategie einen funktionellen *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag* herzustellen. Als erstes wurde der im CG Klon vorhandene *3xflag tag* samt flankierender Sequenzen amplifiziert (*Primer 1060, 1061*), wobei bereits hier die Mutation G2208A durch die korrekte Sequenz des *forward Primers (1060)* korrigiert wurde. Das 148 bp lange Amplifikat diente dann als *Megaprimer* (Bryksin and Matsumura, 2010; Unger et al., 2010) für die Reparaturmutagenese (2.2.17.3) des AL Klons.

### 3.3.2.5 Sequenzanalyse der *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag-mut1 und -mut2 Klone*

Ein aus der Reparaturmutagenese (3.3.2.4) erhaltener Klon wurde zur Charakterisierung sequenziert. Unglücklicherweise enthielt dieser Klon eine neue *Nonsense-Mutation (C1295A, Tabelle 3.9)*. In der Hoffnung, dass diese Mutation nur in einem Teil der *Megaprimer*-amplifizierten DNA aufgetreten war, wurde ein weiterer Klon sequenziert (*pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag-mut2, Tabelle 3.10*). Dieser wies die Mutation C1295A nicht auf und wurde für eine Maxipräparation hochgezogen.

<i>Primer</i> Nr.	<i>Primer Name</i>	sequenzierter Bereich in <i>pEntry-D-Topo- TBX5-3xflag- mut1</i>	fehlerarmer Bereich in <i>pEntry-D-Topo- TBX5-3xflag-mut1</i> (Position in TBX5 ORF)	Mutationen in <i>pEntry-D- Topo-TBX5- 3xflag-mut1</i> (Position in TBX5 ORF)	TBX5 Protein- sequenz
1097	TBX5-202rev	1-874 und 2311-2430	224- 858 1-170	keine	
1244	TBX5-394for	1121-2408	1121-2043 433-1355	C1983A C1295A	S432stop
1243	TBX5-1373rev	746-2043	1006-2024 318-1336	C1983A C1295A	S432stop
1242	pENTR- DTopo-865rev	1226-2468 und 569-687	1591-2464 903-Ende	C1983A C1295A	S432stop
1098	TBX5-1276for	1999-3305	2019-2983 1331-Ende	keine	

**Tabelle 3.9 Partielle Sequenzanalyse von *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag-mut1*.** Der TBX5 ORF beginnt bei 689.

<i>Primer</i> Nr.	<i>Primer Name</i>	sequenzierter Bereich in <i>pEntry-D- Topo-TBX5- 3xflag-mut2</i>	fehlerarmer Bereich in <i>pEntry- D-Topo-TBX5- 3xflag-mut2</i> (Position in TBX5 ORF)	Mutationen in <i>pEntry-D- Topo-TBX5- 3xflag-mut2</i> (Position in TBX5 ORF)	TBX5 Protein- sequenz
1097	TBX5-202rev	339-857 und 2311-2430	339-857 1-169	keine	
1244	TBX5-394for	1121-2315	1121-2291 433-1603	keine	
1243	TBX5-1373rev	1120-2044	1206-2039 518-1351	keine	
1242	pENTR- DTopo-865rev	1756-2468 und 569-687	1815-2464 1127-Ende	keine	
1098	TBX5-1276for	1998-3154	2029-2768 1341-Ende	keine	

**Tabelle 3.10 Partielle Sequenzanalyse von *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag-mut2*.** Der TBX5 ORF beginnt bei 689.

### 3.3.2.6 Sequenzanalyse des *pCa4B2G-UAS-GW-TBX5-3xflag*

Das TBX5 Insert des *pEntry-D-Topo-TBX5-3xflag-mut2* wurde in einer Klonase-Reaktion (*invitrogen*) in den Destination Vektor *pCa4B2G-UAS-GW* (Legler, 2010) transferiert und nach einer Maxipräparation nochmals sequenziert (**Tabelle 3.11**).

Primer Nr.	Primer Name	sequenzierter Bereich in <i>pCa4B2G-UAS-GW-TBX5-3xFLAG</i>	fehlerarmer Bereich in <i>pCa4B2G-UAS-GW-TBX5-3xFLAG</i> (Position in TBX5 ORF)	Mutationen in <i>pCa4B2G-UAS-GW-TBX5-3xFLAG</i> (Position in TBX5 ORF)	TBX5 Proteinsequenz
1052	pTRexDest30-681for	schlechte Qualität			
1097	TBX5-202rev	2-1247	249-1236 1-168	G367R (außerhalb des ORF)	
1289	TBX5-123for	1232-2343	1247-2152 179-1084	keine	
1290	TBX5-416rev	203-1464	532-1464 1-396	keine	
1244	TBX5-394for	1497-2735	1497-2493 429-1425	keine	
1243	TBX5-1373rev	1169-2421	1394-2417 326-1349	C1529T C462T (nicht mit 1244)	
1098	TBX5-1276for	2377-3257 3405-3808	2398-3257 1330-2687	keine	
1053	pTRexDest30-2404rev	1453-2717	1688-2701 620-2687	1758ΔC 691ΔC (nicht mit 1244, 1243)	

**Tabelle 3.11** Partielle Sequenzanalyse des *pCa4B2G-UAS-GW-TBX5-3xflag*. Der TBX5 ORF beginnt bei 1068 und endet bei 2687.

### 3.3.2.7 Diskussion

Mit der Reparatur der Expressionskonstrukte für *omb* und *Tbx5* steht jetzt, zusammen mit Konstrukten für *Tbx2/3* von A. Legler (Legler, 2010), eine Reihe von

Vektoren zur Verfügung, mit denen die Auswirkungen einer ektopischen Expression von Tbx Genen auf die Zellmotilität in *Drosophila* untersucht werden kann. Für *omb* konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression des Gens die Migration einzelner Zellen in der Flügelimaginalscheibe auslösen kann (Shen und Pflugfelder, unveröffentlicht). Um zu gewährleisten, dass alle Konstrukte in gleicher Stärke exprimiert werden und so ein Vergleich möglich wird, wurde von A. Legler der Gateway (invitrogen) kompatible Expressionsvektor *pCa4B2G-UAS-GW* konstruiert. Er erlaubt die Integration der Konstrukte an dieselbe genomische Position mittels ortsspezifischer Rekombination.

Die mit der Herstellung der Konstrukte verbundene Einführung eines *in vivo* Modellsystems zur Untersuchung der grundlegenden Schritte der Tumorgenese ist sinnvoll, da bei der Krebsentstehung Einflüsse aus dem umliegenden Gewebe eine wichtige Rolle spielen können (Balmain and Akhurst, 2004; Bissell and Radisky, 2001). *Drosophila melanogaster* wurde bereits für die Untersuchung zellulärer Prozesse und molekularer Mechanismen der Tumorprogression und Metastasierung erfolgreich eingesetzt (Brumby, 2005).



### 3.4 Konstruktion eines TBX2-T-MBP Fusionsprotein-Vektors

Ausgangspunkt für die Klonierung der TBX2-T Domäne (570 bp) war ihre Amplifikation aus einem cDNA Klon, dem *pEntry-D-Topo-Tbx2* (Legler, 2010). Unter Verwendung zweier *linker Primer* (*Primer 1149, 1150, Taq Polymerase (Qiagen)*) wurden dem Amplifikat *Sall* Schnittstellen angefügt, die für die Integration in den Expressionsvektor *pMal-cRI-Sall* (Sen, 2006) bestimmt waren. Es folgte eine präparative *Sall* Restriktion und eine Reinigung mithilfe des *High Pure PCR Purification Kits* (Roche). Nach der Ligation mit dem *pMal-cRI-Sall* wurden transformante Klone analysiert (**Tabelle 3.12**).

Der erste Klon, der durch Sequenzierung mit *primer 806* untersucht wurde (*pMAL-cRI-TBX2-T-1*), enthielt das Insert in der falschen Orientierung und eine *Nonsense-Mutation* C3086T. Des Weiteren enthielt die Sequenz an ihrem 5' Ende die Deletion eines A, was einen *frameshift* im MBP Fusionsprotein bewirken würde. Die Mutation befand sich allerdings im wenig verlässlichen Anfangsbereich der Sequenz. Ein zweiter Klon, der analysiert wurde (*pMAL-cRI-TBX2-T-3*), enthielt das TBX2 Insert in der richtigen Orientierung, wies allerdings ebenfalls mehrere Mutationen auf.

Klon	Primer Nr.	primer Name	sequenzierter Bereich in pMalcRI-TBX2-T	fehlerarmer Bereich	DNA Mutationen im TBX2 ORF	DNA Mutationen im MBP ORF	Protein Mutationen
Mini pMAL-cRI-TBX2-T-1 (X1)	806	malE	2617-3779 2695-3264 vollständig	2617-3607	C3076T	2629delA	TBX2-Q221stop MBP-frameshift
Mini pMAL-cRI-TBX2-T-3 (x1)	806	malE	2620-3885 2695-3264 vollständig	2620-3596	DG2703 C3076T A3191G	2629delA	TBX2-frameshift TBX2-Q221stop TBX2-D259G MBP-frameshift
Maxi pMal cRI TBX2-T-rep1 (x1)	806	malE	2617-3845 2695-3264 vollständig	2620-3655	DG2703	2629delA	TBX2-frameshift MBP-frameshift
Maxi pMal cRI TBX2-T-rep2 (x1)	806	malE	2617-3776 2695-3264 vollständig	2620-3594	keine	2629delA	TBX2: keine MBP-frameshift
Maxi pMal cRI	1291	pMal-	1375-2494	1387-2323	na	T1535C	MBP-I3T

TBX2-T-rep2 (x2)		cRI- 1331for				C1536T	MBP-I3T
Maxi pMal cRI TBX2-T-rep2	1066	TBX2- 393rev	1561-2786	1863-2777	keine	keine	

**Tabelle 3.12 Sequenzanalyse des pMAL-cRI-TBX2-T-1 und -T-3.**

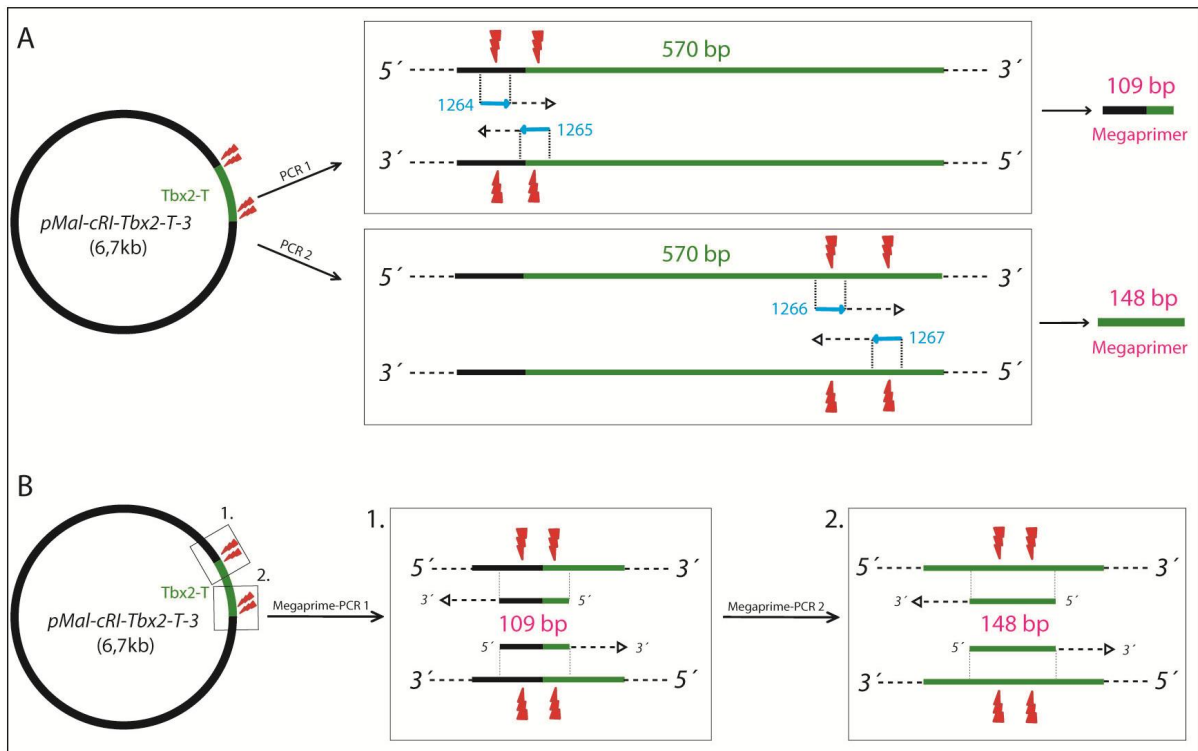
TBX2 ORF beginnt bei 2698 und endet bei 3258

malE ORF beginnt bei 1528 und endet bei 2694

(x1) 12 Nukleotide vom 5´ Ende der gelesenen Sequenz fehlt ein A, was zu einem frameshift im MalE Protein führen würde (□A2630)

(x2) Interessanterweise fehlt auch in dieser Sequenz, die mit einem anderen Primer erzeugt wurde, 12 Nukleotide vom 5´ Ende der gelesenen Sequenz ein A. Anscheinend ist die *primer*-proximale Deletion eines Nukleotids ein häufiges Artefakt der Sequenzierreaktion.

Es wurde versucht, die vier Mutationen, die in diesem Klon identifiziert worden waren, durch eine *Megaprimer* Strategie gleichzeitig zu reparieren (Unger et al., 2010) (**Abbildung 3.47**). Hierzu wurden zwei Primerpaare entworfen, in denen jeder Primer jeweils eine Mutation korrigieren sollte (*Primer* 1264, 1265 und 1266, 1267). In zwei unabhängigen Reparatur-PCRs mit je einem dieser Primerpaare folgte die Herstellung zweier Amplifikate (109 bp und 148 bp), die schließlich die korrigierten Sequenzen enthielten (2.2.17.2). Beide Amplifikate, auch als *Megaprimer* bezeichnet, wurden in einer Reparaturmutagenese (2.2.17.3) des fehlerhaften Ausgangsklons eingesetzt. Ein Klon, der hierbei erhalten wurde (pMal cRI TBX2-T-rep1, **Tabelle 3.12**) wies aber immer noch die Mutationen im 5´ Bereich der TBX2-T Domäne bzw. im MBP-Bereich auf ( $\Delta$ A2629 und  $\Delta$ G2703). Die Reparatur im 3´ Bereich war dagegen erfolgreich. Ein zweiter Reparaturversuch, in dem nur der vordere Megaprimer (109 bp) eingesetzt wurde, führte schließlich zum Erfolg. Ein danach sequenzierter Klon (pMal cRI TBX2-T-rep2) zeigte die Korrektur von  $\Delta$ A2629 und von  $\Delta$ G2703 (wobei es sich bei  $\Delta$ A2629 wahrscheinlich um ein Sequenzierartefakt von Primer 806 handelte).



**Abbildung 3.47 Megaprimer Strategie zur Reparatur des *pMAL-cRI-Tbx2-T-3*.** **A, B** In den Boxen sind Ausschnitte der doppelsträngigen DNA des Vektors vergrößert dargestellt. Rote Blitze markieren die vier Punktmutationen des Vektors. Gestrichelte Pfeile deuten auf die Polymerisierungsrichtung während der PCR. **A** Blaue Pfeile symbolisieren Primer (*MWG/Operon*) mit der korrekten Vektorsequenz. **A** Mithilfe von zwei Reparatur-Primerpaaren (blau) wurden in zwei PCRs jeweils zwei Mutationen korrigiert (2.2.17.2). Die dabei synthetisierten Amplifikate/Megaprimer (pink) (Unger et al., 2010) wurden wiederum in zwei aufeinander folgenden Megaprimer-PCRs (**B**) zur Reparatur des Ausgangsklons verwendet (2.2.17.3).

### 3.4.1 Diskussion

Für die funktionelle Charakterisierung von *omb* bietet sich ein direkter Vergleich mit dem nächsten Verwandten im Menschen, *Tbx2*, an (vgl. letztes Kapitel). Von beiden Genen weiß man bisher, dass sie als transkriptionelle Repressoren fungieren können (Porsch et al., 2005). *Omb* scheint seinen transkriptionellen Einfluss über die Bindung an TBEs vermitteln zu können (Grimm, 1997)(diese Arbeit). Aufgrund des gemeinsamen DNA-Bindungsmotifs, der T-Domäne, ist anzunehmen, dass auch *TBX2* dazu in der Lage ist. Mit der Herstellung eines Expressionsvektors für *TBX2-T* (vgl. *Omb-T*, 3.1.4) wird es möglich sein, die Bindungseigenschaften beider Proteine mithilfe der EMSA-Technik vergleichen zu können.

Dass für TBX2 eine DNA-Bindung zur Regulation von Zielgenen nicht unbedingt erforderlich ist, konnte in einer Arbeit von Redmond et al. (2010) demonstriert werden. Hier zeigte sich, dass TBX2 bei der Inhibition von NDRG1 als Corepressor wirkt.

### 3.5 Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit bestand darin mehr über die Funktion des T-Box Transkriptionsfaktors Omb zu erfahren. *Dm omb* ist der nächste Verwandte zu *Hs Tbx2/3*, die wegen ihrer Rolle bei verschiedenen Krebsarten für die Entwicklung neuer Therapien bedeutsam sind.

In drei, von Herrn Pflugfelder hergestellten, *omb* Allelen *I(1)omb<sup>282</sup>*, *I(1)omb<sup>12</sup>*, *I(1)omb<sup>15</sup>* wurden neue Mutationen kartiert. Dabei handelt es sich um zwei *missense*-Mutationen und eine Stopmutation. Sie betreffen Aminosäurereste, die in allen T-Box Proteinen konserviert sind und daher vermutlich lebenswichtige Proteinabschnitte betreffen. In EMSA Versuchen konnte gezeigt werden, dass die *missense*-Mutationen die DNA-Bindung des Omb-T Proteins verhindern.

Für die Suche nach Omb Zielgenen wurden Gene und phylogenetisch konservierte TBE-Genabschnitte auf ihre Regulation durch Omb getestet. Dabei wurde das Expressionsmuster von Genen mittels *in situ* und das Muster von *enhancer* getriebener  $\beta$ -Gal Expression histochemisch oder durch Immunfärbung von wildtypischen und *I(1)omb<sup>15</sup>* Larven des dritten Stadiums verglichen.

*Upstream* der *mirr* Transkriptionseinheit wurde ein cis-regulatorisches TBE-Fragment identifiziert, das ein Aktivitätsmuster in Flügelimaginalscheiben zeigte, welches dem von *Mirr* nahe kommt. Sowohl ein Omb Verlust als auch die Mutation der TBE Sequenz führten zu einer ähnlichen ektopischen Aktivierung des Fragments, was auf eine Abhängigkeit von Omb hinweist.

In der intronischen Sequenz von *inv* wurde ebenfalls ein TBE-Fragment entdeckt, das eine  $\beta$ -Gal-Aktivität in Flügelscheiben des späten L3 Stadiums anterior der A/P Grenze zeigte. Diese Expression könnte sich mit der späten für *en/inv* beschriebenen Expression (Blair, 1992) decken. Immunfärbungen bestätigten, dass der Verlust dieser Aktivität in *omb<sup>0</sup>* tatsächlich durch den Verlust von Omb hervorgerufen wird und nicht durch eine Entwicklungsverzögerung der Larven verursacht wird.

Schließlich wurde durch die Reparatur von TBX Expressionsvektoren eine Konstruktreihe (Legler, 2010) fertiggestellt, mit deren Hilfe die Auswirkungen einer Überexpression auf die Zellmotilität in *Drosophila* untersucht werden kann. Das soll helfen den Einfluss von TBX Proteinen auf die Invasivität von Krebszellen zu verstehen.

#### 4 Stichwortverzeichnis

cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure (DNS)

DIG = Digoxigenin

dNTPs = Desoxyribonukleintriphosphate

mRNA = Boten-Ribonukleinsäure

ORF = *Open reading frame*

*Primer* = *Oligonukleotid*

RNA = Ribonukleinsäure

RT = Raumtemperatur

## 5 Anhang

### 5.1 Alignment der Omb Proteinsequenz gegen die Dreifachmutante *pEntry-D-Topo-omb-* (remut 1)

Query	1	MRYDVQELLLHQSAEDPFARFANGMAYHPFLQLTQRPTDFSVSSLLTAGSNNNNSGNTNS	60
		MRYDVQELLLHQSAEDPFARFANGMAYHPFLQLTQRPTDFSVSSLLTAGSNNNNSGNTNS	
Sbjct	1	MRYDVQELLLHQSAEDPFARFANGMAYHPFLQLTQRPTDFSVSSLLTAGSNNNNSGNTNS	60
Query	61	GNNNSNSNNNTNSNTNNTNLLVAVSPTGGGAQLSPQSNHSSSNTTTTNTNNSSSNNNNN	120
		GNNNSNSNNNTNSNTNNTNLLVAVSPTGGGAQLSPQSNHSSSNTTTTNTNNSSSNNNNN	
Sbjct	61	GNNNSNSNNNTNSNTNNTNLLVAVSPTGGGAQLSPQSNHSSSNTTTTNTNNSSSNNNNN	120
Query	121	NSTHNNNNNHTNNNNNNNNNTSQKQGHLSTTEPPSPAGTPPPTIVGLPPIPPNNNS	180
		NSTHNNNNNHTNNNNNNNNNTSQKQGHLSTTEPPSPAGTPPPTIVGLPPIPPNNNS	
Sbjct	121	NSTHNNNNNHTNNNNNNNNNTSQKQGHLSTTEPPSPAGTPPPTIVGLPPIPPNNNS	180
Query	181	SSSSNSASAAAHPSHHPTAAHHSPTGAAAPPAGPTGLPPPTPPHHLQQQQQQQHPAP	240
		SSSSNSASAAAHPSHHPTAAHHSPTGAAAPPAG TGLPPPTPPHHLQQQQQQQHPAP	
Sbjct	181	SSSSNSASAAAHPSHHPTAAHHSPTGAAAPPAGATGLPPPTPPHHLQQQQQQQHPAP	240
Query	241	PPPPYFPAAALAGSPAGPHGLYPGGGLRFPHPHGAHPHAHHLGSAYTTAEDVLA	300
		PPPPYFPAAALAGSPAGPHGLYPGGGLRFPHPHGAHPHAHHLGSAYTTAEDVLA	
Sbjct	241	PPPPYFPAAALAGSPAGPHGLYPGGGLRFPHPHGAHPHAHHLGSAYTTAEDVLA	300
Query	301	SAVAHQ LHPAMRPLRALQPEDDGVDDPKVTLEGGDLWEKFKLGTGEMVITKSGRQMFQ	360
		SAVAHQ LHPAMRPLRALQPEDDGVDDPKVTLEGGDLWEKFKLGTGEMVITKSGRQMFQ	
Sbjct	301	SAVAHQ LHPAMRPLRALQPEDDGVDDPKVTLEGGDLWEKFKLGTGEMVITKSGRQMFQ	360
Query	361	<b>MKFRVSGLDKAKYILLDDIVAADDYRYKFHNSRWMVAGKADPEMPKRMYIHPDSPTTGE</b>	420
		MKFRVSGLDKAKYILLDDIVAADDYRYKFHNSRWMVAGKADPEMPKRMYIHPDSPTTGE	
Sbjct	361	MKFRVSGLDKAKYILLDDIVAADDYRYKFHNSRWMVAGKADPEMPKRMYIHPDSPTTGE	420
Query	421	<b>QWMQKVVSFHKLKLTNNISDKHGFVSTTILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRITYV</b>	480
		QWMQKVVSFHKLKLTNNISDKHGFVSTTILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRITYV	
Sbjct	421	QWMQKVVSFHKLKLTNNISDKHGFVSTTILNSMHKYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRITYV	480
Query	481	<b>FKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNNPFAKGLRDTGAGKREKNCYRQALMSNRGSDSDKLN</b>	540
		FKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNNPFAKGRDTGAGKREKNCYRQALMSNRGSDSDKLN	
Sbjct	481	FKETEFIAVTAYQNEKITQLKIDNNPFAKGRDTGAGKREKNCYRQALMSNRGSDSDKLN	540 511
Query	541	PTHVSSRAPLHLGHAGRPPHLHPHAALLDNQDDDDKLLDVVGPPQSPLLPLSHSLQQM	600
		PTHVSSRAPLHLGHAGRPPHLHPHAALLDNQDDDDKLLDVVGPPQSPLLPLSHSLQQM	
Sbjct	541	PTHVSSRAPLHLGHAGRPPHLHPHAALLDNQDDDDKLLDVVGPPQSPLLPLSHSLQQM	600
Query	601	HAHQHSAALAAWFNHLAGAGAGASEHAAAAANASAEDALRRRLQADADVERDGS DSSCS	660
		HAHQHSAALAAWFNHLAGAGAGASEHAAAAANASAEDALRRRLQADADVERDGS DSSCS	
Sbjct	601	HAHQHSAALAAWFNHLAGAGAGASEHAAAAANASAEDALRRRLQADADVERDGS DSSCS	660
Query	661	ESVGGSTGGAFRPTSTGSPKEAVGAAAAAAGLNPGGGSYSPNISVGPPIHPSHLLP	720
		ESVGGSTGGAFRPTSTGSPKEAVGAAAAAAGL+PGGGSYSPNISVGPPIHPSHLLP	
Sbjct	661	ESVGGSTGGAFRPTSTGSPKEAVGAAAAAAGLSPGGGSYSPNISVGPPIHPSHLLP	720 695

Query	721	YLYPHGLYPPPHLGLLHNPAAAAAMSPAGLNPGLLFNAQLALAAQHPALFGHAYAAAGHT	780
		YLYPHGLYPPPHLGLLHNPAAAAAMSPAGLNPGLLFNAQLALAAQHPALFGHAYAAAGHT	
Sbjct	721	YLYPHGLYPPPHLGLLHNPAAAAAMSPAGLNPGLLFNAQLALAAQHPALFGHAYAAAGHT	780
Query	781	PVSPLQGLKSHRFSFYSLPGSLGSFAFVAVTPGSNANRSGDPPGGGGGLGGGVVENGPRSL	840
		PVSPLQGLKSHRFSFYSLPGSLGSFAFVAVTPGSNANRSGDPPGGGGGLGGGVVENGPRSL	
Sbjct	781	PVSPLQGLKSHRFSFYSLPGSLGSFAFVAVTPGSNANRSGDPPGGGGGLGGGVVENGPRSL	840
Query	841	SSSPRPRPASHSPPTRPI SMSPTTPPSLMKQPRGGGAGAGVAQSQHSPSELKSMEKMVNG	900
		SSSPRPRPASHSPPTRPI SMSPTTPPSLMKQPRGGGAGAGVAQSQHSPSELKSMEKMVNG	
Sbjct	841	SSSPRPRPASHSPPTRPI SMSPTTPPSLMKQPRGGGAGAGVAQSQHSPSELKSMEKMVNG	900
Query	901	LEVQHNGSAAAAAALQLAEAAAQHHTTQAHHQQQHQSHHQQQHHQQAQPHPHHQTTH	960
		LEVQHNGSAAAAAALQLAEAAAQHHTTQAHHQQQHQSHHQQQHHQQAQPHPHHQTTH	
Sbjct	901	LEVQHNGSAAAAAALQLAEAAAQHHTTQAHHQQQHQSHHQQQHHQQAQPHPHHQTTH	960
Query	961	LHSHHGATTGGTDQDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	996
		LHSHHGATTGGTDQDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	
Sbjct	961	LHSHHGATTGGTDQDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	996

## 5.2 Konzeptionelle Sequenz von *pEntry-D-Topo-omb*- (mit Annotationen)

```

1 CTTTCTGCG TTATCCCCTG ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG
51 AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA
101 GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA GCGCCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCCGC
151 GCGTTGGCCG ATTCATTAAT GCAGCTGGCA CGACAGGTTT CCCGACTGGA
201 AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATA CGCGTACCGC TAGCCAGGAA
251 GAGTTTGTAG AAACGCAAAA AGGCCATCCG TCAGGATGGC CTTCTGCTTA
301 GTTTGATGCC TGGCAGTTTA TGGCGGGCGT CCTGCCCGCC ACCCTCCGGG
351 CCGTTGCTTC ACAACGTTCA AATCCGCTCC CGGCGGATTT GTCCTACTCA
401 GGAGAGCGTT CACCGACAAA CAACAGATAA AACGAAAGGC CCAGTCTTCC
451 GACTGAGCCT TTCGTTTTAT TTGATGCCTG GCAGTTCCTT ACTCTCGCGT
501 TAACGCTAGC ATGGATGTTT TCCCAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC 1032 M13for
551 AGTCTTAAGC TCGGGCCCCA AATAATGATT TTATTTTGAC TGATAGTGAC
601 CTGTTTCGTTG CAACAAATTG ATGAGCAATG CTTTTTTATA ATGCCAACTT
651 TGTACAAAAA AGCAGGCTCC GCGGCCGCC CTTTCACTat gagatacgac start codon
701 gtccaggagc tgctacttca tcagctctget gaggatccat tcgccaggtt
751 cgccaatggg atggcatatc atccatttct gcagetaacg caacgacca
801 ctgacttcag cgtttcctcg ctggtgacgg cgggtagcaa caataacaac
851 agcggcaaca ccaacagcgg aaacaacaac tccaattcca acaacaacac
901 caattcaaac accaataaca ccaacaatct cgtggcgtt tcaccaacgg Omb-237rev (1096)
951 gtggtggtgc gcagttatcg ccgcaaagca accacagcag cagcaacacc
1001 accaccacca gcaacaccaa caactccagt tccaataaca acaataataa
1051 cagtacccat aataataaca acaaccacac gaataacaac acaataata
1101 ataataaac aagtcaaaag caaggacacc acttgagcac caccgaggaa
1151 ccgccaatgc ccgctggcac accaccgccc acaattggtg gtctaccgcc AccI
1201 aataccaccg cccaacaaca acagcagtag cagcagcagc aacaactcag
1251 cttcagcgc cgccatccg tcgcaccacc caaccgccc acatcactca
1301 cccagtaacg gtgcccgcgc accgcccgc ggcccacag gcttgcccgc C1334G
1351 acccacaccg ccgaccacc tgcaacaaca acagcagcaa caacagcacc
1401 cggccccacc accaccaccg tactttccag ctgcggcact ggccgctcta

```



1451 gctggaagtc cggccggacc gcatccgggt ctgtatcccg gcggtggatt  
1501 gcgcttcccg ccgaccacc caggtgccc tccgcacgcc catcatctgg  
1551 gcagcgccta tactaccgcc gaggacgtcg tccttgctc gcccgctgcc  
1601 catcagctgc atccggcgat gcgaccgctg cgggcgcttc agcccagga  
1651 cgatggcgtc gtcgatgatc ccaaggtcac gctggagggc aaggacctgt  
1701 gggagaagtt ccacaaactg ggcacggaaa tggcatcac caagagcggc  
1751 agacaaatgt ttccgcaaat gaaatttctg gtttcgggac tggatgcaa  
1801 ggctaaatac atcttgctac tggacattgt ggcgccggac gattatcgtt  
1851 ataaatttca taatagtcgc tggatgggtg ctggcaaagc ggatcccag  
1901 atgcaaaaac gcatgtatat ccatccagat tcgcccacaa cgggtgagca  
1951 atggatgcag aaagttgttt catttcacaa attaaaattg accaacaata  
2001 ttagtgataa acatggattt gtaagtacta cgatcctgaa ctcgatgcac  
2051 aagtaccagc cgcgtttcca cctggtgca gccaatgaca tcctgaagct  
2101 gccgtactcc acgtttcgca cgtacgtctt caaggagacc gagttcatcg  
2151 ccgtcacagc atatcaaaat gagaagataa ctcaattgaa aatcgataac  
2201 aatccgtttg cgaagggtt **g**cgatgact ggtgccggca agcgggaaaa **G2221T**  
2251 gaattgttac aggcagcac tgatgtcgaa ccgagggctc gattcggaca  
2301 agttgaatcc gacgcatgtg agcagctcgc gggcacccgt ccacctgggc  
2351 cacgccggcc gtccgcctca tctgcatccc catgccgcc tgcctgataa  
2401 tcagcaggac gacgacgaca agctcctgga cgtggtgggt ccgccacaga  
2451 gtccgctact ccgctcagc cactcgtcgc agcagatgca cccccaccag  
2501 cactcccgag ctctggctgc ctggtttaat cacttggtg gcgctggagc  
2551 cggagcctcc gaacatgcag ctgcccgggc ggccaatgcc agtgccggagg  
2601 atgcaactgc tcgtcgcttg caggcggacg cggatgtgga gcgggatggc  
2651 agcgattoga gttgctcgga aagcgtcggc ggcagtaccg gcggtgcctt  
2701 taggccacc tcgacgggca gtcccaagga ggcggtgggc gcgctgcag  
2751 ctgcccagc ggctggcttg **a**tcccgggtg gcggtagcta tccgtaccg **A2772G**  
2801 aatataatcg tgggtccgcc cattcaccgc tcgcccatt tgttcctta  
2851 cctgtatoca catggcctgt atccaccgcc gcatctgggc ctgctgaca  
2901 atcccgtcgc agcggcggcc atgagtccgg ctggcctgaa tccgggtctg  
2951 ctcttcaatg cccaactggc gctggccgcc cagcatccgg ctttgtttgg  
3001 ccacgcctac gcggcggcgg gtcacacacc ggtatcacca ttacaaggcc  
3051 tgaagagoca togtttttcg ccgtacagtt tgcccggcag tttggctcc  
3101 gccttcgatg cagtgactcc tggatcgaac gcaaatcgtc cgggagatcc  
3151 tccaggcggc ggcggcggcc tgggtgggtg tgttggtgag aatggtcca  
3201 ggagtctgag ttccagccct cgaccccgac ctgctccca ctgcccgcc  
3251 actcgacoga tttcgatgtc acccacaacg ccgcatccc tgatgaagca  
3301 accacgtggc ggtggtgctg gcgcccgtgt ggccaatcg **cagcactcgc** ombTU70498for (1012)  
3351 **cttcggaact** taagagcatg gagaagatgg tcaacggact ggaggttcaa  
3401 cacaatggca gtgcggcggc agcagcggcg gctcttcagc tggccgagga  
3451 agc**tgcccag** **catcatcatc** acaccagcgc gcaccaccag cagcagcgc **Omb-2766for (1095)**  
3501 atcagtcgca ccaccagcaa cagcaccacc agcaaccggc acaaccacat  
3551 ccgaccacc agaccatct acactcgca **catgg**ggcga ca**ACGGGCGG** **G missing in AL's entry clone, NcoI**  
3601 **TACGGATCAG** **GACTACAAAG** **ACCATGACGG** **TGATTATAAA** **GATCATGACA** **FLAG**  
3651 **TCGACTACAA** **GGATGACGAT** **GACAAGTAGT** **GAAAGGGTGG** **GCGCGCCGAC**  
3701 CCAGCTTTCT TGTACAAAGT TGGCATTATA AGAAAGCATT GCTTATCAAT  
3751 TTGTTGCAAC GAACAGGTCA CTATCAGTCA AAATAAAATC ATTATTTGCC  
3801 ATCCAGCTGA TATCCCTAT AGTGAGTCGT ATTACATGGT CATAGCTGTT  
3851 TCCTGGCAGC **TCTGGCCCGT** **GTCTCA**AAAT CTCTGATGTT ACATTGCACA **1242 pENTR DTopo-865rev**  
3901 AGATAAAAAAT ATATCATCAT GAACAATAAA ACTGTCTGCT TACATAAACA  
3951 GTAATACAAG GGGTGTATG AGCCATATTC AACGGGAAAC GTCGAGGCCG

4001 CGATTA AATT CCAACATGGA TGCTGATTTA TATGGGTATA AATGGGCTCG  
 4051 CGATAATGTC GGGCAATCAG GTGCGACAAT CTATCGCTTG TATGGGAAGC  
 4101 CCGATGCGCC AGAGTTGTTT CTGAAACATG GCAAAGGTAG CGTTGCCAAT  
 4151 GATGTTACAG ATGAGATGGT CAGACTAAAC TGGCTGACGG AATTTATGCC  
 4201 TCTTCCGACC ATCAAGCATT TTATCCGTAC TCCTGATGAT GCATGGTTAC  
 4251 TCACCACTGC GATCCCCGGA AAAACAGCAT TCCAGGTATT AGAAGAATAT  
 4301 CCTGATTCAG GTGAAAATAT TGTTGATGCG CTGGCAGTGT TCCTGCGCCG  
 4351 GTTGCAATCG ATTCCTGTTT GTAATTGTCC TTTTAACAGC GATCGCGTAT  
 4401 TTCGTCTCGC TCAGGCGCAA TCACGAATGA ATAACGGTTT GGTGATGCG  
 4451 AGTGATTTTG ATGACGAGCG TAATGGCTGG CCTGTTGAAC AAGTCTGGAA  
 4501 AGAAATGCAT AAAC TTTTGC CATTCTCACC GGATTCAGTC GTCACTCATG  
 4551 GTGATTTCTC ACTTGATAAC CTTATTTTTG ACGAGGGGAA ATTAATAGGT  
 4601 TGTATTGATG TTGAGCAGAGT CGGAATCGCA GACCGATAAC AGGATCTTGC  
 4651 CATCCTATGG AACTGCCTCG GTGAGTTTTT TCCTTCATTA CAGAAACGGC  
 4701 TTTTTCAAAA ATATGGTATT GATAATCCTG ATATGAATAA ATTGCAGTTT  
 4751 CATTTGATGC TCGATGAGTT TTTCTAATCA GAATTGTTA ATTGGTTGTA  
 4801 ACACTGGCAG AGCATTACGC TGA CTGACG GGACGGCGCA AGCTCATGAC  
 4851 CAAAATCCCT TAACGTGAGT TACGCGTCGT TCCACTGAGC GTCAGACCCC  
 4901 GTAGAAAAGA TCAAAGGATC TTCTTGAGAT CCTTTTTTTC TGCGCGTAAT  
 4951 CTGCTGCTTG CAAACAAAAA AACCACCGCT ACCAGCGGTG GTTTGTTTGC  
 5001 CGGATCAAGA GCTACCAACT CTTTTTCCGA AGGTA ACTGG CTTCAGCAGA  
 5051 GCGCAGATAC CAAACTACTGT CCTTCTAGTG TAGCCGTAGT TAGGCCACCA  
 5101 CTTCAAGAAC TCTGTAGCAC CGCCTACATA CCTCGCTCTG CTAATCCTGT  
 5151 TACCAGTGGC TGCTGCCAGT GCGGATAAGT CGTGTCTTAC CGGGTGGAC  
 5201 TCAAGACGAT AGTTACCGGA TAAGGCGCAG CGGTCGGGCT GAACGGGGGG  
 5251 TTCGTGCACA CAGCCAGCT TGGAGCGAAC GACCTACACC GAACTGAGAT  
 5301 ACCTACAGCG TGAGCATTGA GAAAGCGCCA CGCTTCCCGA AGGGAGAAAAG  
 5351 GCGGACAGGT ATCCGGTAAG CGGCAGGGTC GGAACAGGAG AGCGCACGAG  
 5401 GGAGCTTCCA GGGGGAAACG CCTGGTATCT TTATAGTCCT GTCGGGTTTC  
 5451 GCCACCTCTG ACTTGAGCGT CGATTTTTGT GATGCTCGTC AGGGGGGCGG  
 5501 AGCCTATGGA AAAACGCCAG CAACGCGGCC TTTTACGGT TCCTGGCCTT  
 5551 TTGCTGGCCT TTTGCTCACA TGTT

Mutationen in Version remut-1 sind in magenta.

### 5.3 Verwendete Oligonukleotide

Die Angaben zu den *primern* wurden von Herrn Pflugfelder gemacht und wurden zur besseren Prüfbarkeit übernommen.

Nr.	Sequenz	bp	Zweck	Name	Bemerkung
439	GCAGACAAATGTTTC CRCARATG	23	based on D. vir genomic seq obtd. from Ian Duncan/Jennifer Brisson 22. 10. 01. Purpose: amplification of D. vir cDNA	omb-deg1363 (number refers to position in Dm omb cDNA)	

622	GTAATACGACTCACTA TAG	19	sequencing primer for Qiagen pDrive etc	t7 promoter	
627	TGACGGTTCTCGAAA ATCTCAA	22	sequencing of I(1)omb alleles	omb38662for	
631	AAGCTGCCGTACTION ACGTTTC	22	sequencing of I(1)omb alleles	omb88741for	
634	AGTGCGGAGGATGCA CTG	18	sequencing of I(1)omb alleles	omb93127for	
749	AACGGGTGGTGGTGC GCAGTT	21	completion of AS omb mut seq project exon II	39219for	
751	GGACGATGGCGTCGT CGATGA	21	completion of AS omb mut seq project exon II	39921for	
753	TCTGGCTGCCTGGTT TAATC	20	completion of AS omb mut seq project exon VII/VIII	omb753	
754	TCTTTAGGCCTTGTA TGGT	20	completion of AS omb mut seq project exon VII/VIII	omb754	
755	GCTGGCCTGAATCCG GGTCT	20	completion of AS omb mut seq project exon VII/VIII	omb755	
756	AAGTTCCGAAGGCGA GTGCT	20	completion of AS omb mut seq project exon VII/VIII	omb756	
757	GCCGCCCACTCGACC GATTT	20	completion of AS omb mut seq project exon VII/VIII	omb757	
806	GGTCGTCAGACTGTC GATGAAGCC	24	for sequencing of inserts in NEB MBP-expression vectors according to NEB catalogue 3' end of primer at 2610. Sall cloning site is at 2695	malE	
849	CAAGCGGCGACCCCA ACTAAA	21	characterization of ombP6, deletion lines	ombP6- 2303for	
880	ACGCCAGGGTTTTCC CAGTCA	21	for sequencing of CPLZ inserts rev comp is: TGACTGGGAAAACCCTG GCGT	lacZ-5-out2 (rev)	
947	GAGATGGATCCTGCG ATTGAAAAGGTAATAC GA	33	for analysis of potential TBE site FII projects fall 2007	msopa43for	
948	GAGATGGATCCTTTG GCAGTCAACGCATAT TGG	33	for analysis of potential TBE site FII projects fall 2007	msopa6528re v	
949	GAGATGGATCCATT AGCCAGCGACGACTC AAG	33	for analysis of potential TBE site FII projects fall 2007	tenm32for	
950	GAGATGGATCCTGTT CTGCCAGTTGTCGAA TCC	33	for analysis of potential TBE site FII projects fall 2007	tenm5852rev	
951	GAGATGCGGCCGCTG TATTGTTGGATTCCGGC ACTC	35	for analysis of potential TBE site FII projects fall 2007	vv141for	
952	GAGATGCGGCCGCAC GGGACCGGAGCTACG TGTTT	35	for analysis of potential TBE site FII projects fall 2007	vv16325rev	
955	GAGATGGATCCAAGC GCCTAAATAGTGTCAA TG	33	for analysis of potential TBE site FII projects fall 2007	retn190for	
956	GAGATGGATCCAATG CGAGCTAAGCGAGTT AAG	33	for analysis of potential TBE site FII projects fall 2007	retn6029rev	
957	GAGATGGATCCAAGG	33	for analysis of potential	scutefor473	

	GCTATTAAGACCGCA GGC		TBE site FII projects fall 2007		
958	GAGATGGATCCGACT TCGGCAGAGGAGCTA CAG	33	for analysis of potential TBE site FII projects fall 2007	scuterev6338	
963	GTACGTGGTACCGAG GCGGAAAGGTTTGGT AGAA	34	PCR primers CG30460 TBE candidate analysis	inv499down	
964	GTACGTGGTACCGCA TGTTGGCAAGCGGAG ATAA	34	PCR primers CG30460 TBE candidate analysis	inv5791up	
967	GTCCGTGGGGTTTGA ATTA ACT	22	seq primer for characterization of pH pelican subclones. Reads into 5' end of inserts. primer is in 3' P-element seq. primer 880 can be used to read from the other side. descr. s. Pelican lacZ AF242360.doc	pelican12456	
967	GTCCGTGGGGTTTGA ATTA ACT	22	seq primer for characterizatio of pH pelican subclones Reads into 5' end of inserts. primer is in 3' P-element seq. primer 880 can be used to read from the other side. descr. s. Pelican lacZ AF242360.doc	pelican12456	
970	CTAATATGCCCCAAT AGAATG	22	for tkv enhancer reps HS	tkvfor235	
971	TATGAGGATGCCGAC AACGAGA	22	for tkv enhancer reps HS	tkvrev5390	
972	GCGCGCACTCTAGTA GCAATTA	22	for tkv enhancer reps HS	tkvfor101for	
973	CGTGCAGCTGTCCGC GAATGTT	22	for tkv enhancer reps HS	tkv3101rev	
974	CCGAAGGCGTGTGAA TATCAAT	22	for tkv enhancer reps HS	tkv1052for	
975	ACACACGGCAAATAT CGCAAAT	22	for tkv enhancer reps HS	tkv4955rev	
976	GAGACTCGCGAAGAC TGTC AAT	22	for tkv enhancer reps HS	tkv171for	
977	GCAGCGCGTGTAACG ATGTAAT	22	for tkv enhancer reps HS	tkv3512rev	
985	CGCATAATCATCATCG TATCAT	22	revival Aditya project: ident of l(1)omb mutations	ombTU17100 rev	
1008	GATTAGGTACCGATG CCCTGATGTGCATA G	31	new shifted genomic ampl primers because oringina pair failed	shf467for	
1009	GATTAGGTACCAAGA ACTAACTAAACCGCT GAA	33	new shifted genomic ampl primers because oringina pair failed	shf4803rev	
1012	CAGCACTCGCCTTCG GAACTTA	22	new primers for ampl of omb exons VII and VIII CG	ombTU70498 for	
1014	TGGGAACTGATCGAC GAATCTG	22	for amplific of hh TBE region. Erasmus project	hh5115for	
1015	TGCGCACTTGAATTAT GTCGTT	22	for amplific of hh TBE region. Erasmus project	hh11360rev	

1031	TGAGCACCACCGAGG AAC	18	internal seq primers for omb exon II amplicates 984-985	1064for	
1032	GCGGCTGAAGCTGAG TTG	18	internal seq primers for omb exon II amplicates 984-985	1173rev	
1033	AAATAGGGGTTCCGC GCACAT	21	seq primers for Pfeiffer et al. 2008 (Rubin, Addgene) pDP vectors position in pBPGUw is 11652-11672	BDFfor	
1050	ATCCGCGTCCGCCTG CAA	18	verification of potential mut in I(1)omb11	ombTU69773 rev	
1052	ATATCCTCGAGCCCA TCA	18	verification of pTRexDest30-derivatives (Anne Legler) also for pCa4B2G-UAS-GW but not for pENTR-Dtopo	pTRexDest30 -681for	
1053	TAGAGCGGCCGCCCA TCA	18	verification of pTRexDest30-derivatives (Anne Legler) also for pCa4B2G-UAS-GW but not for pENTR-Dtopo but not for pENTR-Dtopo revcomp: TGATGGGCGGCCGCTCT A	pTRexDest30 -2404rev	
1058	GGCGTGCAGA GCAAATTAAT TCAGGCCTTG CCAATCCATT GTTG	44	mirror TBE mutagenesis, CG	mirrorTBEmut -for	
1059	CAACAATGGATTGGC AAGGCCTGAATTAATT TGCTCTGCACGCC	44	mirror TBE mutagenesis, CG	mirrorTBEmut -rev	
1060	AAGCATCGATTGTACT TTGTC	21	vestigial quadrant enhancer CG	vestigial- 129for	
1061	ACTTGCGGCAATGAT TAACTG	21	vestigial quadrant enhancer CG	vestigial- 1230rev	
1062	AGGCCAAAAGGTGAA AGGCCTGGACAGGTA GTGCGGCTTTCGC	43	mutagenesis of TBE elements, CG	vg214for-mut	
1063	GCGAAAGCCGCACTA CCTGTCCAGGCCTTT CACCTTTTGGCCT	43	mutagenesis of TBE elements, CG	vg214rev-mut	
1064	GTCATCAGCATGCAT GGCACGCGCGCCAAC GTGCCGGCCAAAG	43	mutagenesis of TBE elements, CG	vg523for-mut	
1065	CTTTGGCCGGCACGT TGGCGCGGTGCCAT GCATGCTGATGAC	43	mutagenesis of TBE elements, CG	vg523rev-mut	
1066	TTGTCCAGGCCGCTG ACT	18	internal seq primer TBX2, AL	TBX2-393rev	
1070	GATAAACTGCTGTTG AGTCG	21	vestigial quadrant enhancer CG alternative to 1060	vestigial- 183for	
1071	GGAGCCGGGAGCAA GACA	18	mutagenesis verification primer see file "vg TBE mutagenesis" CG	vg828rev	
1077	TCCGGCCAGAGTGGT AAA	18	verification of mirr TBE mut CG	mirr2865for	
1078	CACATGCCGATTGTAT	18	verification of mirr TBE mut	mirr3220rev	

	GG		CG		
1096	GAAACGGCCACGAGATTG	18	verification primers for Annel Legler expression constructs (post-thesis)	Omb-237rev	
1097	TTCCGTGCCCACTTCGTG	18	verification primers for Annel Legler expression constructs (post-thesis)	TBX5-202rev	
1098	TTCTCCGCTCACTTCA CC	18	verification primers for Annel Legler expression constructs (post-thesis)	TBX5-1276for	
1099	TAAAGCCCAGTTCGATTCCGGTC	22	CG subcloning of mirror enhancer	mirr3288rev	
1100	AATCAACGAAAGTCCGCTCAAT	22	CG subcloning of mirror enhancer	mirr1643for	
1104	GAGGATTCAGCATGGGCATAAT	22	amplification of Drop/msh TBE site	DrTBE2-113for	
1105	GCCAAATGATACGAAACGAAAC	22	amplification of Drop/msh TBE site	DrTBE2-1736rev	
1106	TAGTTTTGAAACCCCCGGAGAA	22	amplification of Drop/msh TBE site	DrTBE1-11for	
1107	AGTGGAACCTTACTGGCGTGTT	22	amplification of Drop/msh TBE site	DrTBE1-4827rev	
1149	ACACAGTCGACAAGGTGACGCTGGAG	26	for the expression cloning in pMal-cRI of TBX2T domain CG in context of HPV (papilloma) project	TBX2T-Salfor	
1150	TGTGTGTCGACCTAGTTCCCGGTGTCCCG	29	for the expression cloning in pMal-cRI of TBX2T domain CG in context of HPV (papilloma) project	TBX2T-stopsalrev	
1163	TGTATAAACTAAGGGCGTAA	21	for amplification of HPV promoter seq (CG/Gill Spoden)	HPV-1for-DIG	
1164	GTGGGTCCTGAAACATTGCAG	21	for amplification of HPV promoter seq (CG/Gill Spoden)	HPV-85rev	
1165	GGTTAGTATAAAAGCTCACACTTTATGCACCAAAGG	37	introduction of bona fide TBE into HPV promoter as long fragment EMSA positive control (CG/Gill Spoden)	HPV18-TBEintro-for	
1166	CCTTTTGGTGCATAAAGTGTGAGCTTTTATAC TAACC	37	introduction of bona fide TBE into HPV promoter as long fragment EMSA positive control (CG/Gill Spoden)	HPV18-TBEintro-rev	
1182	CCGGGCCTTTCTTTATGT	18	seq primers for pGL3 HPV project (Gilles Spoden, CG)	pGL3-104rev	
1183	TCGGTGCGGGCCTCTTCG	18	seq primers for pGL3 HPV project (Gilles Spoden, CG)	pGL3-4569for	
1185	GGAAACGCGGCTGGTACTTGT	21	for the characterization of deletions in ombTU12A deletion project (LM)	ombTU12A-7182rev	
1242	TGAGACACGGGCCAGAGC	18	characterization of TBX5 expression clones CG	pENTR-DTopo-865rev (apparently not for destination)	

				vector)	
1243	GGTGGGCCACGGAG GTCT	18	characterization of TBX5 expression clones CG	TBX5- 1373rev	
1244	CCTGCGCCCTGTAC GTG	18	characterization of TBX5 expression clones CG	TBX5-394for	
1245	GGTTAGTATAAAAGCT CACACTTTATGCACCA AAAGGGCCCTGC	44	introduction of bona fide TBE into HPV promoter fragment (2nd CG attempt)	HPV18- TBEintronew- for	replaced by 1250
1246	GCAGGGCCCTTTTGG TGCATAAAGTGTGAG CTTTTATACTAACC	44	introduction of bona fide TBE into HPV promoter fragment (2nd CG attempt)	HPV18- TBEintronew- rev	replaced by 1251
1250	GGTTAGTATAAAAGCT CACACTTTATGCACCA AAAGAGAACTGC	44	introduction of bona fide TBE into HPV promoter fragment (2nd CG attempt)	HPV18- TBEintronew2 -for	replaces 1245 which contained a foolish error
1251	GCAGTTCTCTTTTGGT GCATAAAGTGTGAGC TTTTATACTAACC	44	introduction of bona fide TBE into HPV promoter fragment (2nd CG attempt)	HPV18- TBEintronew2 -rev	replaces 1246 which contained a foolish error
1264	AGACGCGCAGACTAA TTCGAGCTCGGTACC GTCCT	35	for the correction of several seq errors in TBX2-T_MBT by megaprimer method (CG)	TBX2-T-MBT- 2616for	primer design: TBX2-T- MBP correction mutagenesis .doc
1265	GCTCCTTGGCCTCCA GCGTCACCTTGTCGA CTCTA	35	for the correction of several seq errors in TBX2-T_MBT by megaprimer method (CG)	TBX2-T-MBT- 2691rev	primer design: TBX2-T- MBP correction mutagenesis .doc
1266	TCCATGCACAAGTAC CAGCCGCGCTTCCAC ATA	33	for the correction of several seq errors in TBX2-T_MBT by megaprimer method (CG)	3061for aka TBX2-ORF- 646for	primer design: TBX2-T- MBP correction mutagenesis .doc
1267	CTTCAGCTGTGTGAT CTTGTCATTCTGGTAG GCAG	35	for the correction of several seq errors in TBX2-T_MBT by megaprimer method (CG)	3176rev aka TBX2-ORF- 761rev	primer design: TBX2-T- MBP correction mutagenesis .doc
1289	CCCGCAGGCCGCCTT CAC	18	to close a sequence gap in TBX5 CG	TBX5-123for	search doc: TBX5 FLAG primer design
1290	CGGTGGCGGGGAG TCTG	18	to close a sequence gap in TBX5 CG	TBX5-416rev	search doc: TBX5 FLAG primer design
1291	GGCGCACTCCCGTTC TGG	18	for verification of MBP part in MBP fusion genes CG	pMal-cRI- 1331for	search doc: Mal-cRI annotated 6131bp

#### 5.4 TBE Analyse der *Doc Region*

Alle Angaben in **Tabelle 5.1** stammen von Herrn Pflugfelder und wurden zur besseren Prüfbarkeit übernommen.



## Anhang

Number	Orientation	TBE sequence	Absolute Position	Delta	Score	Location	Comments	located in Frasch clone	Pattern (prelim JT Dipl. 2008) + CG 2009
1	for	<i>aggtgtcacg</i>	8993133		8.16	us Doc3	coding region, conserved only in 3/12 unrelated specs	outside	
2	for	<i>agtgccaag</i>	8993705	572	6.12	us Doc3	coding region, conserved only in 7/12 unrelated specs	outside	
3	for	<i>aagtgtgatt</i>	8995059	1354	6.31	us Doc3	coding region, conserved only in 3/12 unrelated specs	outside	
4	rev	<i>agtcacactc</i>	8995907	848	7.03	us Doc3	6/12	DocF11	
5	for	<i>aagtgtgatg</i>	8996699	792	6.95	us Doc3	9/12; 3/12 vary in last position, larger conserved block	DocF11, GOP 458	wing: peripodial? leg and antenna: central eye: ventral?
6	rev	<i>tttgacactc</i>	8997140	441	6.61	us Doc3	6/10 poorly cons area	DocF11	
7	rev	<i>tttcacacct</i>	8997385	245	10.34	us Doc3	1/9 poor	DocF11	
8	rev	<i>gccgacacct</i>	8999900	2515	6.61		coding 5/12	between F10 and F9	
									F9 has strong staining in notum and hinge, a weaker line of staining along D/V in centre of pouch + ventral pleura. From CG

## Anhang

									2009, first impression that notum and hinge expression intensifies, and that pouch expression disappears in I(1)omb. Expr at dorsal and ventral eye disc margin may also change,
9	rev	<i>tccacactc</i>	9003144	3244	6.21	ds Doc2	1/9 poor	F8	
10	rev	<i>cttgacacca</i>	9006872	3728	6.56		7/11, 4/11 vary in last two positions, cons block	DocF7, GOP 327	wing: away from D/V boundary leg: proximal? eye: dorsal and ventral
11	for	<i>aagtgtgaaa</i>	9010045	3173	9.06	in Doc2	100% conservation	DocF7, GOP 327	s.o.
12	for	<i>aagtgtgaca</i>	9011384	1339	8.78		3/10 poor	DocF7	
13	rev	<i>ttggcacct</i>	9012497	1113	6.40		5/12 poor	DocF6	
14	for	<i>aagtgcgaag</i>	9012631	134	6.46		100% 12/12	DocF6, GOP 232	wing: along a/p boundary leg: ~none eye: ocellar region? antenna: central spot?
15	for	<i>aggtgggagc</i>	9014624	1993	8.31	usDoc2	5/9 poor	DocF6	
16	rev	<i>gcccacacct</i>	9016774	2150	8.23	usDoc2	1/10 poor	DocF6	
17	rev	<i>gttgacactt</i>	9017232	458	6.76	usDoc2	9/12	in DocF6	
18	for	<i>gggggtgaag</i>	9018483	1251	6.15	usDoc2	1/11 poor	DocF6	
19	for	<i>aagtgtgaaa</i>	9020352	1869	9.06	usDoc2	originally ident. cluster conserved in 4 diverged specs (9.06)	DocF5, GOP 231	cloudy in all discs (peripodial?)

## Anhang

							Alternative motif in 8 other specs (7.22)		
20	for	<i>gggtgtgaga</i>	9020837	485	10.10	usDoc2	originally ident cluster cons. in 4 specs (10.1) 5 specs w/ variants (7.68-9.42)	DocF5, GOP 231	s.o.
21	rev	<i>tctaacacct</i>	9024948	4111	8.27	usDoc2	6/11, 5/11 differ in 2nd pos	DocF4, GOP 229	wing appears anterior periodical keg; dorsal (proximal) antennaa:cantral + along anterior margin
22	for	<i>aggggtcaga</i>	9025054	106	6.23	usDoc2	1/5 poor	DocF4	
23	rev	<i>tccccacccc</i>	9027775	2721	6.14	usDoc2	2/9 poor	DocF4	
24	for	<i>aggtgtgagc</i>	9029529	1754	10.25	usDoc2	5/10. 3/10 differ in last pos	DocF3	F3 has nice half-moon-shaped brackets in dorsal and ventral pouch; more obvious in CG 2009 than JT p 73. Anterior part of brackets apparently disappears in l(1)omb0, central pouch tissue gains staining
25	rev	<i>cttcacacccc</i>	9032412	2883	9.23	usDoc2	6/11	DocF3	
26	for	<i>gagtgggaca</i>	9034319	1907	6.01	usDoc2	3/12 poor	DocF3	
27	rev	<i>cgttcccacccc</i>	9035199	880	7.01		3/12 coding poor	DocF2	
28	rev	<i>tttcacacctt</i>	9035666	467	9.06		8/11; 1/11 with variant motif	in DocF2	
29	for	<i>aagtgttaaa</i>	9037323	1657	6.40		3/10 poor	DocF2	

## Anhang

30	rev	<i>agtcacacgt</i>	9038324	1001	6.02	dsDoc1	1/12 poor	DocF1	
31	rev	<i>tatcgcacct</i>	9038695	371	6.19	dsDoc1	12/12100%	DocF1 A GOP 191 DocF1 B GOP 195	the two orientations differ strongly in pattern: only common element is a spot in hinge and centre of antenna
32	for	<i>aagtgggagc</i>	9038732	37	7.03	dsDoc1	5/12	DocF1	
33	rev	<i>tgtcccacca</i>	9041494	2762	6.24	dsDoc1	coding region, conserved only in 4/12 unrelated specs	outside	

**Tabelle 5.1**

Number: Nummern der TBEs.

Orientation: *forward* oder *reverse* Orientierungen der TBE-Sequenzen.

TBE-sequence: TBE-Sequenzen.

Absolute Position: Positionen der TBEs innerhalb des *Dm* Genoms (nach *flybase* R5.5).

Delta: Abstände zwischen aufeinanderfolgenden TBEs.

Score: Werte der TBEs aus einer PWM mit dem cut-off 6.

Location: Lage der TBEs relativ zu den drei *Doc* Genen.

Comments: phylogenetische Konservierung der TBEs.

Located in Frasch clone: Vorkommen der TBEs in den *enhancer-reporter* Konstrukten von Manfred Frasch (teilweise mit Fliegenstammmummern (nach Pflugfelder)).

Pattern: *lacZ* Expressionsmuster der Transgene in Imaginalscheiben.

## 5.5 Literatur

- Abassi, Y.** (2007). Regulation im Drosophila Gen optomotor-blind: cis-regulatorische Regionen und Expressionstreue von Enhancertrap Insertionen. In *Institut für Genetik*, (ed.: Universität Mainz).
- Affolter, M., Marty, T., Vigano, M. A. and Jazwinska, A.** (2001). Nuclear interpretation of Dpp signaling in Drosophila. *EMBO J* **20**, 3298-305.
- Anderson, M. G., Perkins, G. L., Chittick, P., Shrigley, R. J. and Johnson, W. A.** (1995). Drifter, a Drosophila Pou-Domain Transcription Factor, Is Required for Correct Differentiation and Migration of Tracheal Cells and Midline Glia. *Genes & Development* **9**, 123-137.
- Andreou AM, P. E., Jones MC, Singh MK, Bussen M, Doudney K, Moore GE, Kispert A, Brosens JJ, Stanier P.** (2007). TBX22 missense mutations found in patients with X-linked cleft palate affect DNA binding, sumoylation, and transcriptional repression. *Am J Hum Genet.*
- Balmain, A. and Akhurst, R. J.** (2004). Cancer: dangerous liaisons. *Nature* **428**, 271-2.
- Bamshad, M., Le, T., Watkins, W. S., Dixon, M. E., Kramer, B. E., Roeder, A. D., Carey, J. C., Root, S., Schinzel, A., Van Maldergem, L. et al.** (1999). The spectrum of mutations in TBX3: Genotype/Phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome. *Am J Hum Genet* **64**, 1550-62.
- Bamshad, M., Lin, R. C., Law, D. J., Watkins, W. C., Krakowiak, P. A., Moore, M. E., Franceschini, P., Lala, R., Holmes, L. B., Gebuhr, T. C. et al.** (1997). Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat Genet* **16**, 311-5.
- Barolo, S., Carver, L. A. and Posakony, J. W.** (2000). GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in Drosophila. *Biotechniques* **29**, 726, 728, 730, 732.
- Belenkaya, T. Y., Han, C., Yan, D., Opoka, R. J., Khodoun, M., Liu, H. Z. and Lin, X. H.** (2004). Drosophila Dpp morphogen movement is independent of dynamin-mediated endocytosis but regulated by the glypican members of heparan sulfate proteoglycans. *Cell* **119**, 231-244.
- Bilican, B. and Goding, C. R.** (2006). Cell cycle regulation of the T-box transcription factor *tbx2*. *Exp Cell Res* **312**, 2358-66.
- Binbas, H.** (2009). Identifizierung potentieller Tbx-Zielgene im Drosophila-Genom unter Einsatz bioinformatischer und molekulargenetischer Methoden. In *Institut für Genetik*, vol. Diplom (ed. Mainz: Johannes Gutenberg Universität).
- Bischof, J.** (2007). An optimized transgenesis system for Drosophila using germline-specific phiC31 integrases.
- Bissell, M. J. and Radisky, D.** (2001). Putting tumours in context. *Nature Reviews Cancer* **1**, 46-54.
- Blair, S. S.** (1992). Engrailed expression in the anterior lineage compartment of the developing wing blade of Drosophila. *Development* **115**, 21-33.
- Blair, S. S. and Ralston, A.** (1997). Smoothed-mediated Hedgehog signalling is required for the maintenance of the anterior-posterior lineage restriction in the developing wing of Drosophila. *Development* **124**, 4053-4063.

- Bongers, E. M., Duijf, P. H., van Beersum, S. E., Schoots, J., Van Kampen, A., Burckhardt, A., Hamel, B. C., Losan, F., Hoefsloot, L. H., Yntema, H. G. et al.** (2004). Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome. *Am J Hum Genet* **74**, 1239-48.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted Gene-Expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Brook, W. J., Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1996). Organizing spatial pattern in limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 161-80.
- Brumby, A.** (2005). Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways. *Nat Rev Cancer* **5**.
- Brunner, A., Wolf, R., Pflugfelder, G. O., Poeck, B. and Heisenberg, M.** (1992). Mutations in the proximal region of the optomotor-blind locus of *Drosophila melanogaster* reveal a gradient of neuroanatomical and behavioral phenotypes. *J Neurogenet* **8**, 43-55.
- Bryksin, A. V. and Matsumura, I.** (2010). Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* **48**, 463-5.
- Burke, R. and Basler, K.** (1997). Hedgehog signaling in *Drosophila* eye and limb development - conserved machinery, divergent roles? *Curr Opin Neurobiol* **7**, 55-61.
- Butler, M. J., Jacobsen, T. L., Cain, D. M., Jarman, M. G., Hubank, M., Whittle, J. R., Phillips, R. and Simcox, A.** (2003). Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* **130**, 659-70.
- Campbell, G. and Tomlinson, A.** (1999). Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of *Drosophila*: regulation of Dpp targets by brinker. *Cell* **96**, 553-62.
- Carlson, H., Ota, S., Campbell, C. E. and Hurlin, P. J.** (2001). A dominant repression domain in Tbx3 mediates transcriptional repression and cell immortalization: relevance to mutations in Tbx3 that cause ulnar-mammary syndrome. *Hum Mol Genet* **10**, 2403-13.
- Certel, K., Hudson, A., Carroll, S. B. and Johnson, W. A.** (2000). Restricted patterning of vestigial expression in *Drosophila* wing imaginal discs requires synergistic activation by both Mad and the drifter POU domain transcription factor. *Development* **127**, 3173-83.
- Coleman, K. G., Poole, S. J., Weir, M. P., Soeller, W. C. and Kornberg, T.** (1987). The invected gene of *Drosophila*: sequence analysis and expression studies reveal a close kinship to the engrailed gene. *Genes Dev* **1**, 19-28.
- DAlessio, M. and Frasch, M.** (1996). msh may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm. *Mechanisms of Development* **58**, 217-231.
- de Celis, J. F., Llimargas, M. and Casanova, J.** (1995). Ventral veinless, the gene encoding the Cf1a transcription factor, links positional information and cell differentiation during embryonic and imaginal development in *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 3405-16.
- de Celis, J. F. and Ruiz-Gomez, M.** (1995). groucho and hedgehog regulate engrailed expression in the anterior compartment of the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 3467-76.
- del Alamo Rodriguez, D., Terriente Felix, J. and Diaz-Benjumea, F. J.** (2004). The role of the T-box gene optomotor-blind in patterning the *Drosophila* wing. *Dev Biol* **268**, 481-92.

- Diez del Corral, R., Aroca, P., JL, G. m.-S., Cavodeassi, F. and Modolell, J.** (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev* **13**, 1754-61.
- Dobrovolskia-Zavadskia.** (1927). Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caractère héréditaire 'non-viable'.
- Emberly, E.** (2003). Conservation of regulatory elements between two species of *Drosophila*. In *BMC Bioinformatics*, (ed).
- Escudero, L. M., Caminero, E., Schulze, K. L., Bellen, H. J. and Modolell, J.** (2005). Charlatan, a Zn-finger transcription factor, establishes a novel level of regulation of the proneural achaete/scute genes of *Drosophila*. *Development* **132**, 1211-22.
- Foronda, D., Perez-Garijo, A. and Martin, F. A.** (2009). Dpp of posterior origin patterns the proximal region of the wing. *Mech Dev* **126**, 99-106.
- Frasch, M., Ismat, A., Schaub, C., Reim, I., Kirchner, K. and Schultheis, D.** (2010). HLH54F is required for the specification and migration of longitudinal gut muscle founders from the caudal mesoderm of *Drosophila*. *Development* **137**, 3107-3117.
- Garcia-Bellido, A. and Santamaria, P.** (1972). Developmental analysis of the wing disc in the mutant engrailed of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **72**, 87-104.
- Garnett, A. T., Han, T. M., Gilchrist, M. J., Smith, J. C., Eisen, M. B., Wardle, F. C. and Amacher, S. L.** (2009). Identification of direct T-box target genes in the developing zebrafish mesoderm. *Development* **136**, 749-60.
- Gibson, M. C. and Perrimon, N.** (2005). Extrusion and death of DPP/BMP-compromised epithelial cells in the developing *Drosophila* wing. *Science* **307**, 1785-1789.
- Glise, B., Miller, C. A., Crozatier, M., Halbisen, M. A., Wise, S., Olson, D. J., Vincent, A. and Blair, S. S.** (2005). Shifted, the *Drosophila* ortholog of Wnt inhibitory factor-1, controls the distribution and movement of Hedgehog. *Dev Cell* **8**, 255-66.
- Gorfinkiel, N., Sierra, J., Callejo, A., Ibanez, C. and Guerrero, I.** (2005). The *Drosophila* ortholog of the human Wnt inhibitor factor Shifted controls the diffusion of lipid-modified Hedgehog. *Dev Cell* **8**, 241-53.
- Gregory, S. L., Kortschak, R. D., Kalionis, B. and Saint, R.** (1996). Characterization of the dead ringer gene identifies a novel, highly conserved family of sequence-specific DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **16**, 792-9.
- Grimm, S.** (1997). Das T-box protein optomotor-blind von *Drosophila melanogaster*: DNA-bindungseigenschaften und die rolle in der Imaginalentwicklung, (ed.: Universität Würzburg).
- Grimm, S. and Pflugfelder, G. O.** (1996). Control of the gene optomotor-blind in *Drosophila* wing development by decapentaplegic and wingless. *Science* **271**, 1601-4.
- Groth, A.** (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics*.
- Guillen, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sanchez-Herrero, E., Morata, G. and Guerrero, I.** (1995). The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development* **121**, 3447-56.
- Gustavson, E., Goldsborough, A. S., Ali, Z. and Kornberg, T. B.** (1996). The *Drosophila* engrailed and invected genes: partners in regulation, expression and function. *Genetics* **142**, 893-906.

- Hamaguchi, T., Yabe, S., Uchiyama, H. and Murakami, R.** (2004). Drosophila Tbx6-related gene, Dorsocross, mediates high levels of Dpp and Scw signal required for the development of amnioserosa and wing disc primordium. *Dev Biol* **265**, 355-68.
- Han, C., Belenkaya, T. Y., Wang, B. and Lin, X.** (2004). Drosophila glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process. *Development* **131**, 601-11.
- Hau, A.-C.** (2010). In *Institut für Genetik*, vol. Diplom (ed).
- Hays, R.** (1999). Patterning of Drosophila leg sensory organs through combinatorial signaling by hedgehog, decapentaplegic and wingless. *Development* **126**, 2891-2899.
- Heberlein.** (1995). Mechanisms of Drosophila Retinal Morphogenesis: The Virtues of Being Progressive. *Cell*.
- Hepker, J.** (1999). Cubitus interruptus is necessary but not sufficient for direct activation of a wing-specific decapentaplegic enhancer. *Development*.
- Hidalgo, A.** (1994). Three distinct roles for the engrailed gene in Drosophila wing development. *Curr Biol* **4**, 1087-98.
- Hiroi, Y., Kudoh, S., Monzen, K., Ikeda, Y., Yazaki, Y., Nagai, R. and Komuro, I.** (2001). Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* **28**, 276-80.
- Hofmeyer, K.** (2008). Optomotor-blind expression in glial cells is required for correct axonal projection across the Drosophila inner optic chiasm. *Dev Biol*.
- Hunter, D. D., Zhang, M. L., Ferguson, J. W., Koch, M. and Brunken, W. J.** (2004). The extracellular matrix component WIF-1 is expressed during, and can modulate, retinal development. *Molecular and Cellular Neuroscience* **27**, 477-488.
- Isshiki, T., Takeichi, M. and Nose, A.** (1997). The role of the msh homeobox gene during Drosophila neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm. *Development* **124**, 3099-109.
- Jacobs, J. J., Keblusek, P., Robanus-Maandag, E., Kristel, P., Lingbeek, M., Nederlof, P. M., van Welsem, T., van de Vijver, M. J., Koh, E. Y., Daley, G. Q. et al.** (2000). Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet* **26**, 291-9.
- Jazwinska, A., Kirov, N., Wieschaus, E., Roth, S. and Rushlow, C.** (1999). The Drosophila gene brinker reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell* **96**, 563-73.
- Jeong, Y. and Epstein, D. J.** (2003). Distinct regulators of Shh transcription in the floor plate and notochord indicate separate origins for these tissues in the mouse node. *Development* **130**, 3891-902.
- Johnson.** (1995). Binding of a Drosophila POUdomain protein to a sequence element regulating gene expression in specific dopaminergic neurons. *Nature*.
- Kassis, J. A., Kwon, D., Mucci, D., Langlais, K. K., Americo, J. L., DeVido, S. K. and Cheng, Y. Z.** (2009). Enhancer-promoter communication at the Drosophila engrailed locus. *Development* **136**, 3067-3075.
- Kehl, B. T., Cho, K. O. and Choi, K. W.** (1998). Mirror, a Drosophila homeobox gene in the iroquois complex, is required for sensory organ and alula formation. *Development* **125**, 1217-1227.
- Kim, J., Johnson, K., Chen, H. J., Carroll, S. and Laughon, A.** (1997). Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* **388**, 304-8.



- Kim, J., Sebring, A., Esch, J. J., Kraus, M. E., Vorwerk, K., Magee, J. and Carroll, S. B.** (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* **382**, 133-8.
- Kinel-Tahan, Y., Weiss, H., Dgany, O., Levine, A. and Wides, R.** (2007). *Drosophila* odz gene is required for multiple cell types in the compound retina. *Developmental Dynamics* **236**, 2541-2554.
- Kirk, E. P., Sunde, M., Costa, M. W., Rankin, S. A., Wolstein, O., Castro, M. L., Butler, T. L., Hyun, C., Guo, G., Otway, R. et al.** (2007). Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **81**, 280-91.
- Kispert, A. and Hermann, B. G.** (1993). The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J* **12**, 4898-9.
- Kopp, A. and Duncan, I.** (1997). Control of cell fate and polarity in the adult abdominal segments of *Drosophila* by optomotor-blind. *Development* **124**, 3715-26.
- Kornberg, T. B., Biehs, B., Kechris, K. and Liu, S. M.** (2010). Hedgehog targets in the *Drosophila* embryo and the mechanisms that generate tissue-specific outputs of Hedgehog signaling. *Development* **137**, 3887-3898.
- Krause, A., Zacharias, W., Camarata, T., Linkhart, B., Law, E., Lischke, A., Miljan, E. and Simon, H. G.** (2004). Tbx5 and Tbx4 transcription factors interact with a new chicken PDZ-LIM protein in limb and heart development. *Dev Biol* **273**, 106-20.
- Kwon, C., Hays, R., Fetting, J. and Orenic, T. V.** (2004). Opposing inputs by Hedgehog and Brinker define a stripe of hairy expression in the *Drosophila* leg imaginal disc. *Development* **131**, 2681-92.
- Lausch, E., Hermanns, P., Farin, H. F., Alanay, Y., Unger, S., Nikkel, S., Steinwender, C., Scherer, G., Spranger, J., Zabel, B. et al.** (2008). TBX15 mutations cause craniofacial dysmorphism, hypoplasia of scapula and pelvis, and short stature in Cousin syndrome. *Am J Hum Genet* **83**, 649-55.
- Lecuit, T. and Cohen, S. M.** (1998). Dpp receptor levels contribute to shaping the Dpp morphogen gradient in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **125**, 4901-4907.
- Legler, A.** (2010). Entwicklung von TBX2- und TBX3-Expressionsvektoren zur Identifizierung molekularer und genetischer Determinanten verstärkter Zellmobilität. In *Institut für Genetik*, vol. Diplom (ed. Mainz).
- Letizia, A., Barrio, R. and Campuzano, S.** (2007). Antagonistic and cooperative actions of the EGFR and Dpp pathways on the iroquois genes regulate *Drosophila* mesothorax specification and patterning. *Development* **134**, 1337-46.
- Levine, A., Weiss, C. and Wides, R.** (1997). Expression of the pair-rule gene odd Oz (odz) in imaginal tissues. *Dev Dyn* **209**, 1-14.
- Lingbeek, M. E., Jacobs, J. J. and van Lohuizen, M.** (2002). The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator. *J Biol Chem* **277**, 26120-7.
- Lu, C. H., Rincon-Limas, D. E. and Botas, J.** (2000). Conserved overlapping and reciprocal expression of msh/Msx1 and apterous/Lhx2 in *Drosophila* and mice. *Mech Dev* **99**, 177-81.
- Lum, L. and Beachy, P. A.** (2004). The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* **304**, 1755-9.
- Lyng, H., Brovig, R. S., Svendsrud, D. H., Holm, R., Kaalhus, O., Knutstad, K., Oksefjell, H., Sundfor, K., Kristensen, G. B. and Stokke, T.** (2006). Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer. *BMC Genomics* **7**, 268.

- Maniatis.** (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (ed).
- Maschat, F., Serrano, N., Randsholt, N. B. and Geraud, G.** (1998). engrailed and polyhomeotic interactions are required to maintain the A/P boundary of the *Drosophila* developing wing. *Development* **125**, 2771-80.
- Meneghini, V., Odent, S., Platonova, N., Egea, A. and Merlo, G. R.** (2006). Novel TBX3 mutation data in families with ulnar-mammary syndrome indicate a genotype-phenotype relationship: mutations that do not disrupt the T-domain are associated with less severe limb defects. *Eur J Med Genet* **49**, 151-8.
- Milan, M., Weihe, U., Tiong, S., Bender, W. and Cohen, S. M.** (2001). msh specifies dorsal cell fate in the *Drosophila* wing. *Development* **128**, 3263-8.
- Minami.** (1999). brinker is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature*.
- Morgan.** (1916). Sex-linked inheritance in *Drosophila*.
- Muller, B., Hartmann, B., Pyrowolakis, G., Affolter, M. and Basler, K.** (2003). Conversion of an extracellular Dpp/BMP morphogen gradient into an inverse transcriptional gradient. *Cell* **113**, 221-233.
- Mullor, J. L., Calleja, M., Capdevila, J. and Guerrero, I.** (1997). Hedgehog activity, independent of decapentaplegic, participates in wing disc patterning. *Development* **124**, 1227-37.
- Murre, C., Mccaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B. et al.** (1989). Interactions between Heterologous Helix-Loop-Helix Proteins Generate Complexes That Bind Specifically to a Common DNA-Sequence. *Cell* **58**, 537-544.
- Ng, P. C. and Henikoff, S.** (2006). Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**, 61-80.
- Orenic, T. V., Held, L. I., Jr., Paddock, S. W. and Carroll, S. B.** (1993). The spatial organization of epidermal structures: hairy establishes the geometrical pattern of *Drosophila* leg bristles by delimiting the domains of achaete expression. *Development* **118**, 9-20.
- Packham, E. A. and Brook, J. D.** (2003). T-box genes in human disorders. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 1**, R37-44.
- Papaiouannou, V. E.** (2001). T-box genes in development: from hydra to humans. *Int Rev Cytol* **207**, 1-70.
- Pauli, T., Seimiya, M., Blanco, J. and Gehring, W. J.** (2005). Identification of functional sine oculis motifs in the autoregulatory element of its own gene, in the eyeless enhancer and in the signalling gene hedgehog. *Development* **132**, 2771-82.
- Pflugfelder, G. O.** (2009). omb and circumstance. *J Neurogenet* **23**, 15-33.
- Pflugfelder, G. O., Roth, H. and Poeck, B.** (1992a). A homology domain shared between *Drosophila* optomotor-blind and mouse Brachyury is involved in DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 918-25.
- Pflugfelder, G. O., Roth, H., Poeck, B., Kerscher, S., Schwarz, H., Jonschker, B. and Heisenberg, M.** (1992b). The lethal(1)optomotor-blind gene of *Drosophila melanogaster* is a major organizer of optic lobe development: isolation and characterization of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1199-203.
- Pflugfelder, G. O., Schwarz, H., Roth, H., Poeck, B., Sigl, A., Kerscher, S., Jonschker, B., Pak, W. L. and Heisenberg, M.** (1990). Genetic and molecular characterization of the optomotor-blind gene locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **126**, 91-104.
- Poeck, B., Balles, J. and Pflugfelder, G. O.** (1993). Transcript identification in the optomotor-blind locus of *Drosophila melanogaster* by intragenic recombination

- mapping and PCR-aided sequence analysis of lethal point mutations. *Mol Gen Genet* **238**, 325-32.
- Porsch, M., Hofmeyer, K., Bausenwein, B. S., Grimm, S., Weber, B. H., Miassod, R. and Pflugfelder, G. O.** (1998). Isolation of a *Drosophila* T-box gene closely related to human TBX1. *Gene* **212**, 237-48.
- Porsch, M., Sauer, M., Schulze, S., Bahlo, A., Roth, M. and Pflugfelder, G. O.** (2005). The relative role of the T-domain and flanking sequences for developmental control and transcriptional regulation in protein chimeras of *Drosophila* OMB and ORG-1. *Mech Dev* **122**, 81-96.
- Redmond, K. L., Crawford, N. T., Farmer, H., D'Costa, Z. C., O'Brien, G. J., Buckley, N. E., Kennedy, R. D., Johnston, P. G., Harkin, D. P. and Mullan, P. B.** (2010). T-box 2 represses NDRG1 through an EGR1-dependent mechanism to drive the proliferation of breast cancer cells. *Oncogene* **29**, 3252-3262.
- Reim, I. and Frasch, M.** (2005). The Dorsocross T-box genes are key components of the regulatory network controlling early cardiogenesis in *Drosophila*. *Development* **132**, 4911-25.
- Reim, I., Lee, H. H. and Frasch, M.** (2003). The T-box-encoding Dorsocross genes function in amnioserosa development and the patterning of the dorsolateral germ band downstream of Dpp. *Development* **130**, 3187-204.
- Rodriguez, M., Aladowicz, E., Lanfrancone, L. and Goding, C. R.** (2008). Tbx3 represses E-cadherin expression and enhances melanoma invasiveness. *Cancer Res* **68**, 7872-81.
- Rogers, E. M., Brennan, C. A., Mortimer, N. T., Cook, S., Morris, A. R. and Moses, K.** (2005). Pointed regulates an eye-specific transcriptional enhancer in the *Drosophila* hedgehog gene, which is required for the movement of the morphogenetic furrow. *Development* **132**, 4833-4843.
- Roignant, J. Y. and Treisman, J. E.** (2009). Pattern formation in the *Drosophila* eye disc. *Int J Dev Biol* **53**, 795-804.
- Ruberte.** (1995). An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and and thick veins, for dpp signaling in vivo. *Cell*.
- Sasaki, G., Ogata, T., Ishii, T., Hasegawa, T., Sato, S. and Matsuo, N.** (2002). Novel mutation of TBX3 in a Japanese family with ulnar-mammary syndrome: implication for impaired sex development. *Am J Med Genet* **110**, 365-9.
- Sen, A.** (2006). optomotor-blind and the Horizontal and Vertical System cells of the *Drosophila* optic lobes: Molecular and laser ablation studies. In *Institut für Genetik*, (ed. Mainz: Johannes-Gutenberg-Universität.
- Sen, A., Gadomski, C., Balles, J., Abassi, Y., Dorner, C. and Pflugfelder, G. O.** (2010). Null mutations in *Drosophila* Optomotor-blind affect T-domain residues conserved in all Tbx proteins. *Mol Genet Genomics* **283**, 147-56.
- Shandala, T., Kortschak, R. D., Gregory, S. and Saint, R.** (1999). The *Drosophila* dead ringer gene is required for early embryonic patterning through regulation of argos and buttonhead expression. *Development* **126**, 4341-4349.
- Shandala, T., Kortschak, R. D. and Saint, R.** (2002). The *Drosophila* retained/dead ringer gene and ARID gene family function during development. *Int J Dev Biol* **46**, 423-30.
- Shandala, T., Takizawa, K. and Saint, R.** (2003). The dead ringer/retained transcriptional regulatory gene is required for positioning of the longitudinal glia in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **130**, 1505-1513.

- Shashidhara, L. S. and Usha, N.** (2010). Interaction between Ataxin-2 Binding Protein 1 and Cubitus-interruptus during wing development in *Drosophila*. *Developmental Biology* **341**, 389-399.
- Shen.** (2008). optomotor-blind suppresses instability at the A/P compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Mech Dev.* **125**.
- Shen, J. and Dahmann, C.** (2005). The role of Dpp signaling in maintaining the *Drosophila* anteroposterior compartment boundary. *Dev Biol* **279**, 31-43.
- Siggia, E. D.** (2005). Computational methods for transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 214-21.
- Simmonds, A. J., Brook, W. J., Cohen, S. M. and Bell, J. B.** (1995). Distinguishable functions for engrailed and invected in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing. *Nature* **376**, 424-7.
- Sivasankaran, R., Vigano, M. A., Muller, B., Affolter, M. and Basler, K.** (2000). Direct transcriptional control of the Dpp target omb by the DNA binding protein Brinker. *EMBO J* **19**, 6162-72.
- Tabata, T.** (2001). Genetics of morphogen gradients. *Nat Rev Genet* **2**, 620-30.
- Tada, M. and Smith, J. C.** (2001). T-targets: clues to understanding the functions of T-box proteins. *Dev Growth Differ* **43**, 1-11.
- Takatori, N., Hotta, K., Mochizuki, Y., Satoh, G., Mitani, Y., Satoh, N., Satou, Y. and Takahashi, H.** (2004). T-box genes in the ascidian *Ciona intestinalis*: characterization of cDNAs and spatial expression. *Dev Dyn* **230**, 743-53.
- Teleman, A. A., Strigini, M. and Cohen, S. M.** (2001). Shaping morphogen gradients. *Cell* **105**, 559-62.
- Tomlinson, A.** (2003). Patterning the peripheral retina of the fly: decoding a gradient. *Dev Cell* **5**, 799-809.
- Tseng, W. C., Lin, J. W., Wei, T. Y. and Fang, T. Y.** (2008). A novel megaprimered and ligase-free, PCR-based, site-directed mutagenesis method. *Anal Biochem* **375**, 376-8.
- Umemori, M., Takemura, M., Maeda, K., Ohba, K. and Adachi-Yamada, T.** (2007). *Drosophila* T-box transcription factor Optomotor-blind prevents pathological folding and local overgrowth in wing epithelium through confining Hh signal. *Dev Biol* **308**, 68-81.
- Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R. and Peleg, Y.** (2010). Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J Struct Biol* **172**, 34-44.
- Usui, K., Goldstone, C., Gibert, J. M. and Simpson, P.** (2008). Redundant mechanisms mediate bristle patterning on the *Drosophila* thorax. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20112-7.
- Villa-Cuesta, E., Gonzalez-Perez, E. and Modolell, J.** (2007). Apposition of iroquois expressing and non-expressing cells leads to cell sorting and fold formation in the *Drosophila* imaginal wing disc. *BMC Dev Biol* **7**, 106.
- Villa-Cuesta, E. and Modolell, J.** (2005). Mutual repression between msh and Iro-C is an essential component of the boundary between body wall and wing in *Drosophila*. *Development* **132**, 4087-4096.
- Vincent, J. P. and Briscoe, J.** (2001). Morphogens. *Curr Biol* **11**, R851-4.
- Von Ohlen, T., Moses, C. and Poulson, W.** (2009). Ind Represses msh Expression in the Intermediate Column of the *Drosophila* Neuroectoderm, Through Direct Interaction With Upstream Regulatory DNA. *Developmental Dynamics* **238**, 2735-2744.

- Weiss, A., Charbonnier, E., Ellertsdottir, E., Tsirigos, A., Wolf, C., Schuh, R., Pyrowolakis, G. and Affolter, M.** (2010). A conserved activation element in BMP signaling during *Drosophila* development. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 69-76.
- White, P. H. and Chapman, D. L.** (2005). Dll1 is a downstream target of Tbx6 in the paraxial mesoderm. *Genesis* **42**, 193-202.
- Whittle, J. R. S.** (1990). Pattern formation in imaginal discs, vol. 1 (ed., pp. 241-252.
- Wides, R., Kinel-Tahan, Y., Weiss, H., Dgany, O. and Levine, A.** (2007). *Drosophila* odz gene is required for multiple cell types in the compound retina. *Developmental Dynamics* **236**, 2541-2554.
- Zecca, M. and Struhl, G.** (2007). Recruitment of cells into the *Drosophila* wing primordium by a feed-forward circuit of vestigial autoregulation. *Development* **134**, 3001-3010.

## **5.6 Versicherung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet wurden. Die Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise bei einer anderen Fakultät oder Prüfung eingereicht.

Mainz, den 22.8.2011

Christian Gadomsky