



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Identifizierung und Verifizierung von Tbx-Zielgenen in *Drosophila melanogaster*

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Inka Hoffmann

geboren am 28.08.1985
in Limburg a. d. Lahn

Mainz, im Juli 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

„Das Wesen der Dinge hat die Angewohnheit, sich zu verbergen.“
Heraklit von Ephesus (etwa 540 - 480 v. Chr.)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
1. Abstract	12
2. Einleitung	13
2.1 Die Bedeutung von T-box Transkriptionsfaktoren in der Genregulation von <i>Drosophila melanogaster</i> und Vertebraten	13
2.2 Die Rolle des T-box Gens <i>optomotor-blind (omb)</i> in der Entwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	14
2.2.1 <i>Optomotor-blind</i>	14
2.2.2 Die Beteiligung von Omb an Musterbildungsprozessen in den Imaginalscheiben ...	16
2.2.2.1 Der Wg-Signalweg kontrolliert die D-/V-Achse in der Flügelscheibe	17
2.2.2.2 Omb beeinflusst den Hh-Signalweg in der Flügelscheibe	19
2.2.2.3 Die Rolle von Omb in der Augen-und Beinentwicklung	21
2.3 Das Tbx-Protein Org-1 ist bereits in der Embryonalentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i> von großer Bedeutung	22
2.4 Identifizierung potentieller Zielgene von Tbx-Proteinen in <i>Drosophila melanogaster</i>	25
2.4.1 Bioinformatische Analyse	26
2.4.2 Microarray-Analyse	26
3. Zielsetzung	27
4. Material & Methoden	29
4.1 Material	29
4.1.1 Chemikalien	29
4.1.2 Enzyme	29
4.1.2.1 Restriktionsendonukleasen	29
4.1.2.2 RNA-Polymerasen	29
4.1.2.3 Weitere Enzyme	29
4.1.3 Bakterien	29
4.1.4 Oligonukleotid-Primer	30
4.1.5 Vektoren	30
4.1.6 Kits	30
4.1.7 Lösungen und Puffer	31
4.1.7.1 X-Gal Färbung	31
4.1.7.2 X-Gal Färbung an Flügeln pharat adulter Fliegen	31
4.1.7.3 Fluoreszente Antikörperfärbung an L3-Larven	31
4.1.7.4 <i>In situ</i> Hybridisierung	32

4.1.7.5	Gelelektrophorese	32
4.1.7.6	ChIP-on-Chip	33
4.1.8	Antikörper.....	33
4.1.9	Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	33
4.1.9.1	Generelle Verbrauchsmaterialien	33
4.1.9.2	Materialien für die qPCR	33
4.1.9.3	Laborgeräte	34
4.1.9.4	PCR-Gerät.....	34
4.1.9.5	Gelkammern für Elektrophorese	34
4.1.9.6	Gel-Dokumentationssystem.....	34
4.1.9.7	Pipetten.....	34
4.1.9.8	Zentrifugen.....	34
4.1.9.9	Binokulare und Mikroskope	34
4.1.9.10	Sonstige Geräte.....	34
4.1.10	Verwendete Computerprogramme	35
4.1.11	Fliegenstämme	35
4.2	Methoden der Fliegenarbeit	38
4.2.1	Fliegenzucht.....	38
4.2.2	Eiablagen	38
4.2.3	Herstellung transgener Fliegenstämme	38
4.2.4	Das phiC31-System zur Keimbahntransformation	39
4.2.5	Etablierung transgener Fliegenstämme	39
4.2.6	Verwendung des Gal4/UAS-Systems zur Analyse von <i>omb loss-of-function</i> und <i>omb gain-of-function</i> Effekten	40
4.3	Histologische Methoden	42
4.3.1	Präparation von <i>Drosophila</i> L3-Larven	42
4.3.2	X-Gal Färbung	42
4.3.2.1	X-Gal Färbung an L3-Larven	42
4.3.2.2	X-Gal Färbung an Flügeln pharat adulter Fliegen	43
4.3.3	Fluoreszente Antikörperfärbung an Embryonen.....	43
4.3.4	Fluoreszente Antikörperfärbung an L3-Larven.....	44
4.3.5	Phalloidin färbung an L3-Larven.....	44
4.3.6	<i>In situ</i> Hybridisierung (sichtbar) an L3-Larven.....	45
4.3.7	Mikroskopie	46
4.4	Molekularbiologische Methoden	47
4.4.1	Gelelektrophorese	47
4.4.2	Gelextraktion	47
4.4.3	Restriktionsanalyse.....	48
4.4.4	Ethanol fällung.....	48

4.4.5	Klonierung.....	49
4.4.5.1	TA Topo-Klonierung	49
4.4.5.2	Gateway-Technologie	50
4.4.6	Transformation.....	51
4.4.7	Bakterienkultur.....	51
4.4.8	Plasmidpräparation	52
4.4.9	Konzentrationsbestimmung am NanoDrop™ 1000.....	52
4.4.10	Polymerasekettenreaktion (PCR)	52
4.4.11	A-tailing.....	53
4.4.12	Site-directed Mutagenesis.....	53
4.4.13	Sequenzierung	54
4.4.14	<i>In vitro</i> Transkription zur Sondenherstellung	54
4.4.15	Tüpfel-Test.....	55
4.4.16	RNA-Isolation	55
4.4.17	Reverse Transkription.....	56
4.4.18	qPCR.....	56
4.4.18.1	Primerdesign	57
4.4.18.2	Vorbereitung der 96well-Platte und Durchführung der qPCR.....	57
4.4.18.3	Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Reaktionsspezifität	58
4.4.18.4	Statistische Auswertung der Daten.....	60
4.4.19	ChIP-on-CHIP.....	60
4.4.19.1	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	60
4.4.19.2	PCR-Amplifikation und <i>Cy5/Cy3-Labeling</i> der Proben	61
4.4.19.3	Microarray-Hybridisierung und Scannen mit dem GenePix 4000B	61
4.4.19.4	Datenanalyse.....	62
5.	Ergebnisse & Diskussion.....	63
5.1	Identifizierung von Omb-Bindestellen mittels ChIP-on-chip.....	63
5.1.1	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	63
5.1.2	PCR-Amplifikation.....	64
5.1.3	Microarray	66
5.1.3.1	Normalisierung, Visualisierung und Analyse der Daten.....	66
5.1.3.2	Diskussion.....	72
5.2	Untersuchungen zur Expression potentieller Omb-Zielgene in Abhängigkeit von Omb	74
5.2.1	Bestimmung des Expressionsmusters potentieller Omb-Zielgene in L3- Imaginalscheiben mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH).....	74
5.2.2	Etablierung der quantitativen RealTime-PCR (qPCR) für Expressionsstudien in <i>omb</i> -mutanten Flügelscheiben im Vergleich zum Wildtyp	75
5.3	Herstellung von <i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Konstrukten und Analyse ihrer Aktivität in Abhängigkeit von Tbx-Proteinen	78

5.3.1	Strategie zur Herstellung der <i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Konstrukte.....	78
5.3.2	Übersicht aller <i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Konstrukte	80
5.3.3	Der Insertionsort 58A führt zu einer Artefakt-Färbung in den Imaginalscheiben.....	81
5.3.4	Analyse der Enhancer-Aktivität in Abhängigkeit von Omb	84
5.3.5	Mutagenesen von TBEs potentieller Tbx-Zielgene	85
5.4	Omb reguliert Musterbildungsprozesse entlang der A/P- sowie entlang der D/V-Grenze in der Flügelscheibe	86
5.4.1	<i>apterous (ap)</i>	86
5.4.1.1	Hintergrund.....	86
5.4.1.2	Ergebnisse & Diskussion.....	86
5.4.2	<i>muscle-segment homeobox (msh)</i>	91
5.4.2.1	Hintergrund.....	91
5.4.2.2	Ergebnisse & Diskussion.....	92
5.4.3	<i>aristaless (al)</i>	96
5.4.3.1	Hintergrund.....	96
5.4.3.2	Ergebnisse & Diskussion.....	96
5.4.4	<i>frizzled 3 (fz3)</i>	99
5.4.4.1	Hintergrund.....	99
5.4.4.2	Ergebnisse & Diskussion.....	100
5.4.5	CR42862.....	103
5.4.5.1	Hintergrund.....	103
5.4.5.2	Ergebnisse & Diskussion.....	103
5.4.6	<i>midline & H15 (midH15)</i>	105
5.4.6.1	Hintergründe.....	105
5.4.6.2	Ergebnisse & Diskussion.....	106
5.4.7	Matrix-Metalloproteinasen (MMP1 und MMP2)	109
5.4.7.1	Hintergrund.....	109
5.4.7.2	Ergebnisse & Diskussion.....	110
5.4.8	<i>yellow (y)</i> und <i>ebony (e)</i> - Omb und die abdominale Pigmentierung.....	115
5.4.8.1	Hintergrund.....	115
5.4.8.2	Ergebnisse & Diskussion.....	115
5.4.9	Omb beeinflusst die Hh-Signalkaskade	118
5.4.9.1	<i>hedgehog (Hh)</i>	119
5.4.9.2	<i>interference hedgehog (ihog) & brother of ihog (boi)</i>	121
5.4.9.3	<i>tout-velu (ttv) & brother of tout-velu (botv)</i>	124
5.4.9.4	<i>shifted (shf)</i>	126
5.4.9.5	<i>dally & dally-like (dlp)</i>	128
5.4.9.6	<i>dispatched (disp)</i>	132
5.4.9.7	<i>Flotillin-2 (Flo-2)</i>	134

5.4.9.8	Effekte von <i>omb</i> -GOF oder -LOF auf die Expression von Komponenten des Hh-Signalwegs in der Flügelscheibe	136
5.4.9.9	Überprüfung der Auswirkungen posteriorer <i>omb</i> -Reduktion in der Flügelscheibe.....	139
5.4.9.10	Diskussion.....	140
5.5	Ansätze zu einer <i>in vivo</i> Analyse von TBEs	141
5.5.1	Das Tbx-Protein Org-1 reguliert <i>ladybird-late</i> und <i>slouch</i>	141
5.5.2	Mutagenese von <i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Konstrukten der Org-1 Zielgene <i>lbi</i> und <i>slou</i>	141
5.5.3	Diskussion	143
6.	Zusammenfassung.....	144
7.	Anhang.....	145
7.1	Bioinformatisch ermittelte TBEs (Binbas, 2009).....	145
7.2	ChIP-chip.....	146
7.3	RNA-Sonden	151
7.4	qPCR	153
7.4.1	Rohdaten zur statistischen Auswertung der qPCR.....	153
7.4.2	qPCR-Ergebnisse	154
7.5	<i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Konstrukte.....	156
7.6	Vektor-Karte pGW-attB-lacZ	157
7.7	Kreuzungen.....	158
7.8	Org-1.....	158
7.8.1	Sequenz von <i>lbi</i> -SBMs mit TBEs.....	158
7.8.2	Sequenz von <i>slouSK16</i> mit den TBEs	159
7.9	Primer	159
7.9.1	Primer zur Herstellung von RNA-Sonden	159
7.9.2	Primer zur Herstellung von Enhancer-Reporter-Konstrukten	160
7.9.3	Mutagenese-Primer	161
7.9.4	Sequenzierprimer	162
7.9.5	Primer für qPCR	162
8.	Lebenslauf	165
9.	Versicherung.....	166
10.	Danksagung	167
11.	Literaturverzeichnis.....	168

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Flügel-Phänotyp verschiedener <i>omb</i> -Allele im Vergleich zum Wildtyp.....	15
Abb. 2: Der adulte <i>Drosophila</i> -Flügel entsteht während der Metamorphose aus der Flügelimaginal- scheibe.	16
Abb. 3: Die Morphogene Wg und Dpp steuern den Erhalt der D-/V- bzw. der A-/P-Grenze und kontrollieren die Expression von <i>omb</i>	17
Abb. 4: Model des Wg-Signalwegs.	18
Abb. 5: Model des Hh-Signalwegs.	20
Abb. 6: Omb wird in der Flügel-, der Augen-/Antennen- und der Beinimaginalscheibe exprimiert. ...	22
Abb. 7: Die Org-1-Bindestellen in den <i>Ib</i> und <i>slou</i> CRMs sind essentiell für die spezifische Enhancer- Aktivität.....	25
Abb. 8: Schema der Kreuzungen zur Etablierung eines homozygoten Enhancer-Reporter Stamms nach der Injektion am Beispiel der Injektionslinie BDSC 25709	40
Abb. 9: Das GAL4-/UAS-System.....	41
Abb. 10: Das Prinzip der "Topo-Cloning" Reaktion	50
Abb. 11: Darstellung der Schmelzkurven von <i>nmo</i> -Amplifikaten bei der Verwendung unterschied- licher Primer-Paare	59
Abb. 12: 1% Agarosegel mit Chromatinfragmenten nach der Sonifizierung.	64
Abb. 13: 1% Agarosegel mit Chromatinfragmenten nach der 2. PCR-Amplifikation	65
Abb. 14: Box-Plots und Density-Plots der Augendaten vor und nach der Normalisierung.....	67
Abb. 15: Box-Plots und Density-Plots der Flügeldata vor und nach der Normalisierung.	68
Abb. 16: Histogramme der normalisierten Augen- und Flügeldata der einzelnen Arrays.....	70
Abb. 17: Visualisierung der identifizierten Omb-Bindestellen im genomischen Kontext mithilfe des Integrated Genome Browsers (IGB).....	71
Abb. 18: Vergleich der ermittelten Bindestellen im ChIP-chip mit den bioinformatischen Ergebnis- sen der TBE-Suche.....	72
Abb. 19: Darstellung des Amplifikationsverlaufs in einer qPCR und Bestimmung des C _T -Wertes am Beispiel von <i>rp49</i> und <i>al</i>	77
Abb. 20: Strategie zur Herstellung von <i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Konstrukten	79
Abb. 21: Die Imaginalscheiben einiger <i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Stämme (<i>BH1</i> , <i>brk</i> , <i>crc</i> , <i>dve</i> und <i>rn</i>) weisen eine insertionsbedingte (58A) Artefakt-Färbung (X-Gal) auf.....	81
Abb. 22: Die Imaginalscheiben einiger <i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Stämme (<i>Sox15</i> , <i>tty</i> , <i>vvl</i> , <i>wg</i> und <i>zfh1</i>) weisen eine insertionsbedingte (58A) Artefakt-Färbung (X-Gal) auf.....	84
Abb. 23: Kreuzung von homozygoten <i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Stämmen in den <i>omb</i> -mutanten Hintergrund.....	85

Abb. 24: <i>ap</i> [3,2kb]- <i>lacZ</i> (Insertionsort: 2R, 58A3) wird von Omb im ventralen Kompartiment reprimiert.....	87
Abb. 25: <i>ap</i> [3,2kb]- <i>lacZ</i> (Insertionsort: 2R, 51D) wird von Omb im ventralen Kompartiment reprimiert.....	90
Abb. 26: Omb reguliert auch die endogene <i>ap</i> -Expression in der Flügelscheibe.	91
Abb. 27: Komplementäres Muster von Omb und Msh in der L3-Flügelscheibe.	92
Abb. 28: <i>muscle-segment homeobox (msh)</i> aka <i>Drop</i> wird nicht im <i>l(1)omb</i> ³¹⁹⁸ -mutanten Hintergrund exprimiert.	94
Abb. 29: Omb reguliert das Gen <i>al</i> , nicht jedoch <i>al</i> [5,2kb]- <i>lacZ</i>	99
Abb. 30: Die <i>fz3</i> -Expression steigt in <i>l(1)omb</i> ³¹⁹⁸ -mutanten Flügelscheiben	101
Abb. 31: Das Gen CR42862 wird von Omb in wildtypischen Flügelscheiben reprimiert.	105
Abb. 32: <i>midH15-lacZ</i> reproduziert das endogene <i>mid</i> -Expressionsmuster in der Beinscheibe	107
Abb. 33: <i>midH15-lacZ</i> wird in späten embryonalen Stadien im Bereich des ZNS exprimiert	108
Abb. 34: <i>Matrix metalloproteinase 1 (MMP1)</i> wird nicht von Omb beeinflusst.....	112
Abb. 35: Omb ist ein Antagonist der Augenentwicklung und der <i>MMP2</i> -Expression im Auge	113
Abb. 36: <i>yellow (y)</i> und <i>ebony (e)</i> werden von Omb in der Flügelscheibe beeinflusst	117
Abb. 37: <i>hedgehog (hh)</i>	120
Abb. 38: <i>Interference hedgehog (ihog)</i>	121
Abb. 39: <i>brother of ihog (boi)</i> (Wildtyp und RNAi-Linien)	122
Abb. 40: <i>brother of ihog (boi)</i> (EP-Linien).....	124
Abb. 41: <i>tout-velu (ttv)</i>	125
Abb. 42: <i>brother of tout-velu (botv)</i>	126
Abb. 43: <i>shifted (shf)</i>	127
Abb. 44: <i>division abnormally delayed (dally)</i>	129
Abb. 45: <i>dally-like (dlp)</i>	131
Abb. 46: <i>dispatched (disp)</i>	133
Abb. 47: <i>Flotillin-2 (Flo-2)</i>	135
Abb. 48: Effekte von <i>omb</i> -GOF oder <i>omb</i> -LOF auf die Expression von Komponenten des Hh-Signalwegs.	137
Abb. 49: Analyse der Effekte von posteriorem <i>omb</i> -Verlust auf die Morphologie und die Hh-Signalgebung in der Flügelscheibe.	139
Abb. 50: Wildtypische Expressionsmuster verschiedener Gene in Imaginalscheiben.....	153
Abb. 51: Vektorkarte pGW-attB-lacZ.....	157

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: RNA-Polymerasen.....	29
Tab. 2: Weitere Enzyme	29
Tab. 3: Bakterienstämme	30
Tab. 4: Vektoren	30
Tab. 5: Kits	30
Tab. 6: Primäre Antikörper	33
Tab. 7: Sekundäre Antikörper	33
Tab. 8: Materialien für die qPCR	33
Tab. 9: Fliegenstämme	35
Tab. 10: Enhancer-Reporter Fliegenstämme (basierend auf selbst hergestellten Konstrukten).....	37
Tab. 11: Konzentrationsbestimmung der DNA nach der PCR (NanoDrop)	65
Tab. 12: <i>antisense</i> RNA-Sonden für <i>in situ</i> -Hybridisierungen (Teil 1)	74
Tab. 13: qPCR-Kandidatengene	76
Tab. 14: Aufstellung der <i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Konstrukte	80
Tab. 15: <i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Konstrukte mit mutierten TBEs.....	85
Tab. 16: <i>yellow</i> (<i>y</i>)- und <i>ebony</i> (<i>e</i>)-Enhancer-Reporter-Linien	116
Tab. 17: Kreuzungen der Hh-Effektorlinien mit der Treiberlinie <i>en-Gal4</i>	119
Tab. 18: TBEs im Fragment <i>lhl-SBMs</i> (basierend auf Schaub et al., 2012 sowie dem TBE-Screen)	142
Tab. 19: TBEs in Fragment <i>slouSK16</i> (basierend auf Schaub et al., 2012 sowie dem TBE-Screen)	142
Tab. 20: Übersicht der hergestellten Org-1 Zielgenkonstrukte.....	143
Tab. 21: Bioinformatisch ermittelte TBEs.....	145
Tab. 22: Schnittmenge aus den Eye45-Ergebnissen (FDR1) und der TBE-Liste.....	146
Tab. 23: Schnittmenge aus den Wing23b-Ergebnissen (FDR1) und der TBE-Liste	148
Tab. 24: <i>antisense</i> RNA-Sonden für <i>in situ</i> -Hybridisierungen (Teil 2)	151
Tab. 25: Rohdaten zur statistischen Auswertung der qPCR (außer <i>hh</i> -Kaskade).....	153
Tab. 26: Rohdaten zur statistischen Auswertung der <i>hh</i> -qPCR.....	153
Tab. 27: qPCR-Kandidatengene mit RQ-Werten	154
Tab. 28: Aufstellung von <i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Konstrukte.....	156
Tab. 29: Kreuzungen für verschiedene Färbungen	158
Tab. 30: Primer zur Herstellung von RNA-Sonden	159
Tab. 31: Primer zur Herstellung von Enhancer-Reporter-Konstrukten.....	160
Tab. 32: Mutagenese-Primer.....	161
Tab. 33: Sequenzierprimer	162
Tab. 34: Primer für qPCR	162

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AP	Alkalische Phosphatase
A-/P	Anterior-/Posterior
AvAll	<i>engl.</i> : average all
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaar
β-Gal	β-Galactosidase
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>engl.</i> : complementaryDNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Chip	DNA-Microarray
CRM	<i>cis</i> -regulatorisches Modul
C _T	<i>engl.</i> : cycle threshold
Cy3/5	Cyanin-Farbstoffe
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d	destilliert
dd	doppelt destilliert
DIG	Digoxigenin
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	<i>engl.</i> : deoxyribonucleic acid
D-/V	Dorso-/Ventral
<i>engl.</i> :	englisch
ES	<i>engl.</i> : eye disc sample
<i>et al.</i>	<i>lat.</i> : <i>et alii</i> (und andere)
FDR	<i>engl.</i> : false discovery rate
for	<i>engl.</i> : forward primer
GFP	<i>engl.</i> : green fluorescent protein
GOF	<i>engl.</i> : gain-of-function
HSPGs	Heparansulfat-Proteoglykane
IHC	Immunhistochemie
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
l	Liter
L2/L3	zweites/drittes larvales Stadium
LOF	<i>engl.</i> : loss-of-function
log	Logarithmus
MF	Morphogenetische Furche
mg	Milligramm
min	Minute
M	Mol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mRNA	<i>engl.</i> : messengerRNA
N	Anzahl an Replikaten
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
<i>omb</i>	<i>optomotor-blind</i>
<i>org-1</i>	<i>optomotor-blind-related gene-1</i>
PBS	<i>engl.</i> : phosphate buffered saline
PCR	<i>engl.</i> : polymerase chain reaction
Pol	Polymerase
PWM	<i>engl.</i> : positional weight matrix
qPCR	quantitative PCR
rev	<i>engl.</i> : reverse primer
RNA	<i>engl.</i> : ribonucleic acid
rpm	<i>engl.</i> : rounds per minute
RQ	<i>engl.</i> : relative quantification
RT	Raumtemperatur
SD	<i>engl.</i> : standard deviation
Tab.	Tabelle
TBE	T-Box Bindeelement
Tbx	T-Box
T _m	Schmelztemperatur der Primer
V	Volt
vgl.	vergleichen
WS	<i>engl.</i> : wing disc sample

1. Abstract

The aim of my doctoral thesis was to identify and verify target genes of Tbx-proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. The main focus was the search for Omb target genes which take part in the development of the larval wing. So far, only data from a bioinformatic screen (Binbas, 2009) and from a microarray analysis (Ansgar Klebes) were available.

Initially, I performed a ChIP-on-chip experiment based on chromatin from wing and eye imaginal discs of wildtypic L3-larvae (*w¹¹¹⁸*). This method was used to identify Omb binding sites throughout the genome and to determine overlap of the bioinformatically predicted T-box binding elements (TBEs) with these binding sites. Altogether 3959 potential binding sites were found in the eye data with a FDR1 (*false discovery rate* of 1%) and 3750 in the wing data. 65 genes contained both ChIP sites and bioinformatically predicted TBEs. Unfortunately, there was no actual overlap between the ChIP sites and the predicted TBEs.

Nonetheless, some interesting candidate genes were analysed by *in situ* hybridisation with regard to their endogenous expression in different genotypes. The focus was set on genes that participate in the Hh signalling pathway. Apart from *hh*, nine further genes were examined in *omb* loss- (*en-Gal4xUAS-ombRNAi*) and gain-of-function (*dpp-Gal4xUAS-omb*) experiments and by qPCR in an *omb³¹⁹⁸*-mutant background. Only the qPCR analysis of *shf*, *dally* and *dlp* yielded statistically significant differences. For these three genes, I noted increased expression in the *omb³¹⁹⁸*-mutant background.

Using qPCR, I analysed 70 genes with regard to their expression in *omb³¹⁹⁸*-mutant wing discs compared to wildtype. 18 genes were further examined by histological experiments. Since the direct regulation of potential Omb target genes via TBEs was of special interest, I generated 32 enhancer-reporter constructs. The analysis of enhancer activity was performed by X-Gal stainings of wildtypic and *omb*-mutant L3-larvae. Enhancer-reporter constructs of *ap* and *fz3* were repressed by Omb, whereas an *al-lacZ* construct was positively controlled.

To demonstrate the necessity of the binding sites and a direct regulation, I performed a site-directed mutagenesis of single TBEs in *ap* and *al* enhancer reporter constructs. In both cases, elimination of TBEs had no influence on the expression of the construct, indicating indirect regulation by Omb. Possibly, Omb, like its human ortholog TBX2, is able to control gene expression as a transcriptional co-factor.

2. Einleitung

2.1 Die Bedeutung von T-box Transkriptionsfaktoren in der Genregulation von *Drosophila melanogaster* und Vertebraten

Proteine, die zu der Familie der T-Box (Tbx) Transkriptionsfaktoren gehören, spielen eine große Rolle in der Embryonalentwicklung und Organogenese vieler Metazoen und sind daher für die Biologie und die Medizin von großem Interesse.

Erstmals wurden T-Box-Proteine 1992 beschrieben, als eine homologe Region im Mausprotein Brachyury (T) und im Protein Optomotor-blind (Omb) von *Drosophila melanogaster* entdeckt wurde (Pflugfelder *et al.*, 1992a). Diese hoch konservierte Domäne, die sogenannte T-Domäne oder T-Box, dient der Bindung an die DNA und umfasst ca. 200 Aminosäuren. Seit ihrer Entdeckung konnten 19 verschiedene Tbx-Gene sowohl in Vertebraten wie Zebrafisch, *Xenopus*, Maus, Huhn und Mensch als auch in Invertebraten wie *C. elegans* identifiziert werden (Castellanos *et al.*, 2014). In *Drosophila* existieren neben *omb* noch sieben weitere Tbx-Gene: *omb-related gene 1 (org1)*, *brachyenteron (byn)*, *H15*, *Dorsocross 1-3 (Doc1-3)* und *midline (mid)* (Minguillon und Logan, 2003). Durch phylogenetische Analysen, welche Homologien zwischen der T-Domäne verschiedener Tbx-Gene berücksichtigen, konnten die Tbx-Gene fünf Unterfamilien zugeordnet werden, nämlich der T-, Tbx1-, Tbx2-, Tbx6- und Tbx1-Familie (Papaioannou und Silver, 1998). Die Gesamtheit der Tbx-Familie ist durch Genduplikationen und Cluster-Dispersion entstanden.

Die Zielsequenz der Tbx-Proteine wurde zuerst für das T-Protein identifiziert, welches *in vitro* an die palindromische Brachyury-Konsensussequenz TCACACCT/AGGTGTGA bindet (Kispert und Herrmann, 1993). Im Gegensatz dazu bestehen viele genomische Bindestellen entweder aus degenerierten Hälften dieser Sequenz, welche als T-box Bindeelemente (TBEs) bezeichnet werden, oder aber aus lokalen Anhäufungen (Carreira *et al.*, 1998); (Casey *et al.*, 1998). Tbx-Proteine können über die Bindung an die TBE als Aktivatoren oder Repressoren wirken. Brachyury kodiert z. B. für ein sequenzspezifisches DNA-Bindeprotein, das als transkriptioneller Aktivator wirkt (Kispert und Herrmann, 1993). Tbx2 und Tbx3, zwei paraloge Vertreter der *Mammalia*, weisen hingegen eine reprimierende Funktion auf (Rowley *et al.*, 2004). Das T-box Protein Tbx4 besitzt, im Gegensatz zu dem paralogen Tbx5, sowohl eine Aktivierungs- als auch eine Repressordomäne (Ouimette *et al.*, 2010).

Die Regulation eines Zielgens ist zum Teil auch von der Interaktion der Tbx-Proteine mit anderen Proteinen oder Co-Faktoren abhängig. Zum Beispiel binden in der murinen Herzentwicklung die Homeobox-Proteine Msx1 und Msx2 die T-box Proteine Tbx2 und Tbx3 und unterdrücken so die Cx43-Promoteraktivität (Boogerd *et al.*, 2008).

Die Rolle von Tbx-Proteinen als entwicklungsbiologische Regulatoren gewann an Bedeutung, als eine Vielzahl von Mutationen identifiziert wurde, die zur Entstehung erblicher Funktions- und Entwicklungsstörungen beim Menschen führen. Viele dieser Erbkrankheiten beruhen auf Haploinsuffizienzen. Das DiGeorge-Syndrom ist eine Erkrankung, die durch Deletionen im Chromosomenbereich 22q11, in dem Tbx1 liegt, verursacht wird. Der Phänotyp kann bei Patienten mit der gleichen Deletion stark variieren, umfasst aber häufig Herzfehler, Unterentwicklung des Thymusgewebes, Gesichtsfehlbildungen und auch Verhaltensauffälligkeiten (Packham und Brook, 2003).

Haploinsuffizienz von Mitgliedern der Tbx2-Unterfamilie äußert sich vor allem in angeborenen Missbildungen der Extremitäten. Bekannt sind z. B. das Ulnar-Mammary-Syndrom/TBX3, das Small-Patella-Syndrom/TBX4 und das Holt-Oram-Syndrom/TBX5 (Packham und Brook, 2003). Zur Tbx2-Unterfamilie zählt auch der Tbx-Transkriptionsfaktor Omb, dessen Verlust durch Mutation unter anderem eine gestörte Entwicklung des *Drosophila*-Flügels verursacht (Abb. 1) (Grimm und Pflugfelder, 1996). Darüber hinaus wird den humanen Omb-orthologen Proteinen TBX2 und TBX3 eine Rolle in der Entstehung verschiedener Tumorerkrankungen zugeschrieben. Nachweislich werden TBX2 und TBX3 in vielen Krebsarten wie Brust-, Eierstock- und Gebärmutterhalskrebs sowie in Melanomen überexprimiert. Beide Proteine können durch Repression der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p19^{ARF} und p21^{CIP1} in die Kontrolle der Zellproliferation eingreifen, die zelluläre Seneszenz unterdrücken und so die Tumorgenese begünstigen (Rowley *et al.*, 2004). Die Metastasenbildung wird insbesondere durch Veränderungen im Expressionslevel von Adhesionsmolekülen bedingt. Tbx3 reprimiert die E-Cadherin-Expression und verstärkt dadurch die Motilität von Melanomazellen (Rodriguez *et al.*, 2008). Somit sind beide TBX-Proteine für die Krebsforschung und demzufolge auch Omb in der Grundlagenforschung von großem Interesse.

2.2 Die Rolle des T-box Gens *optomotor-blind (omb)* in der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*

2.2.1 *Optomotor-blind*

Das X-chromosomale Tbx-Gen *optomotor-blind (omb)* ist mit einem 160kb Locus im Chromomer 4C5-6 eines der größten *Drosophila*-Gene. Mit der Isolierung der Mutante *ln(1)ombH31* wurde das Gen 1971 erstmals von Martin Heisenberg bei einem Screen zu Untersuchungen des optomotorischen Verhaltens von *Drosophila* beschrieben (Heisenberg, 1972). Um mehr über das betroffene Gen und das entsprechende Protein zu erfahren, wurde die genomische Region 1990 mittels *Chromosome Walking* über 340kb genauer charakterisiert (Pflugfelder *et al.*, 1990).

Mittlerweile konnten mehr als 50 Allele identifiziert werden, darunter die lebensfähigen Mutante *lacquered* (*lac*), die sich in Veränderungen der Flügelentwicklung äußert sowie das *gain-of-function* Allel *Quadroon* (*Qd*), welches eine verstärkte Pigmentierung des Abdomens verursacht (Pflugfelder, 2009).

Omb ist an verschiedenen Entwicklungsprozessen von *Drosophila* beteiligt. Während der Embryonalentwicklung wird *omb* zuerst in den Anlagen der optischen Loben exprimiert. Die Expression hält bis in die Imago an und ist in vielen neuronalen und glialen Zelltypen zu finden (Poeck *et al.*, 1993b). Lethale *omb*-defiziente Fliegen weisen einen dramatischen Phänotyp in der Gehirnentwicklung auf. In zwanzig Prozent der pharat adulten Tiere fehlen die Optischen Loben vollständig, die anderen Tiere zeigen starke Reduktionen im Volumen der Loben (Pflugfelder *et al.*, 1992b). Auch für die Entwicklung der meisten larvalen Imaginalscheiben und der abdominalen Tergiten ist Omb von Bedeutung (Pflugfelder, 2009).

Analog zu Tbx2-Mutationen im Menschen sind für *omb*-defiziente Fliegen Störungen in der Entwicklung der Extremitäten, insbesondere der Flügel charakteristisch (Abb. 1). Morgan und Bridges beschrieben 1916 erstmals den Flügelphänotyp der Mutante *bifid*, welche sich erst später als hypomorphes *omb*-Allel herausstellte (Pflugfelder und Heisenberg, 1995). *Bifid* verursacht eine Fusion der longitudinalen Flügelvenen an der Basis des Flügels sowie weitere variable Defekte im distalen Bereich der Flügelfläche (Abb. 1B). In lethalen *omb*-Mutanten bilden zwar annähernd so viele Zellen das Flügelgewebe wie im Wildtyp, allerdings findet ab dem dritten larvalen Stadium im zentralen Bereich der Flügel vermehrt Apoptose statt. Dadurch wird die Ausbildung des Flügels massiv gestört (Abb. 1C). Eine ektopische *omb*-Expression im Notum führt hingegen zur Ausbildung eines zusätzlichen Flügelpaares (Grimm und Pflugfelder, 1996).

Der ausgeprägte Phänotyp der *omb*-Nullmutanten zeigt die bedeutende Rolle von *omb* in der Entwicklung der Fliege und insbesondere in der Flügelentwicklung.

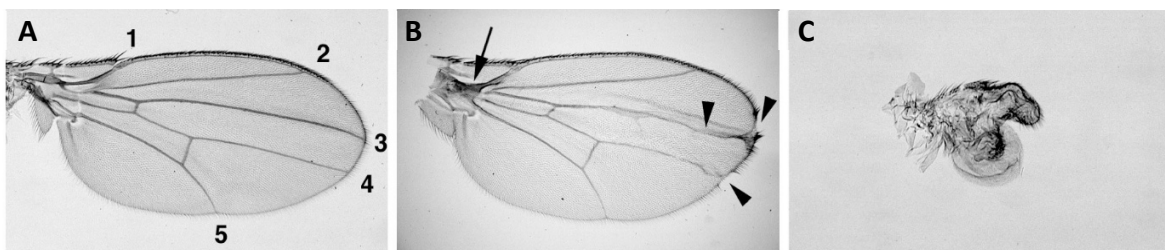


Abb. 1: Flügel-Phänotyp verschiedener *omb*-Allele im Vergleich zum Wildtyp (Grimm und Pflugfelder, 1996).

(A) Wildtypischer Flügel mit fünf (1-5) longitudinalen Venen. (B) Flügel einer *omb^{bi}*-Mutante. Die longitudinalen Venen sind proximal fusioniert (Pfeil), distal treten weitere Defekte auf (Pfeilköpfe). (C) Flügel einer *l(1)omb³¹⁹⁸*-Nullmutante. Die Entwicklung des Flügels ist massiv gestört.

2.2.2 Die Beteiligung von Omb an Musterbildungsprozessen in den Imaginalscheiben

Im Lebenszyklus von *Drosophila melanogaster* ist die Metamorphose eine entscheidende Phase. Dabei wird die adulte Fliege durch die Differenzierung bestimmter larvaler Strukturen, den Histoblasten und Imaginalscheiben, aufgebaut. Die Imaginalscheiben sind säckchenförmige Einstülpungen der Epidermis, die schon während der Embryonalentwicklung angelegt werden. Als Model zur Untersuchung von Entwicklungsprozessen wie der Musterbildung hat sich vor allem die Flügelimaginalscheibe etabliert. Ausgehend von einem einschichtigen Epithelium aus ca. 50 Zellen besteht die Flügelimaginalscheibe im dritten larvalen Stadium (L3) nach einer verstärkten Proliferation aus bis zu 50 000 Zellen, die ein zweischichtiges Epithel ausbilden. Die dünnere der beiden Schichten wird als Plattenepithel oder Peripodialmembran (*squamous layer*) bezeichnet, die dickere als Säulenepithel (*columnar layer*). Beide Epithelien sind durch ein Lumen voneinander getrennt, wobei die apikale Oberfläche der Epithelien in Richtung Lumen orientiert ist (Hartl und Scott, 2014). Mit zunehmender Entwicklung werden die Zellen der Flügelscheibe regionalisiert und spezifiziert. Aus der zentralen Region der Flügelimaginalscheibe, der *pouch*, entsteht in der adulten Fliege die Flügelfläche (Abb. 2). Um diese Fläche herum befindet sich in der Scheibe die Anlage für die *hinge*-Region, die spätere Gelenkregion. Diese verbindet den Flügel mit dem Thorax. Auch die ventro-laterale Region (Pleura) und die dorsale Region (Notum) des Thorax werden bereits in der Flügelscheibe angelegt.

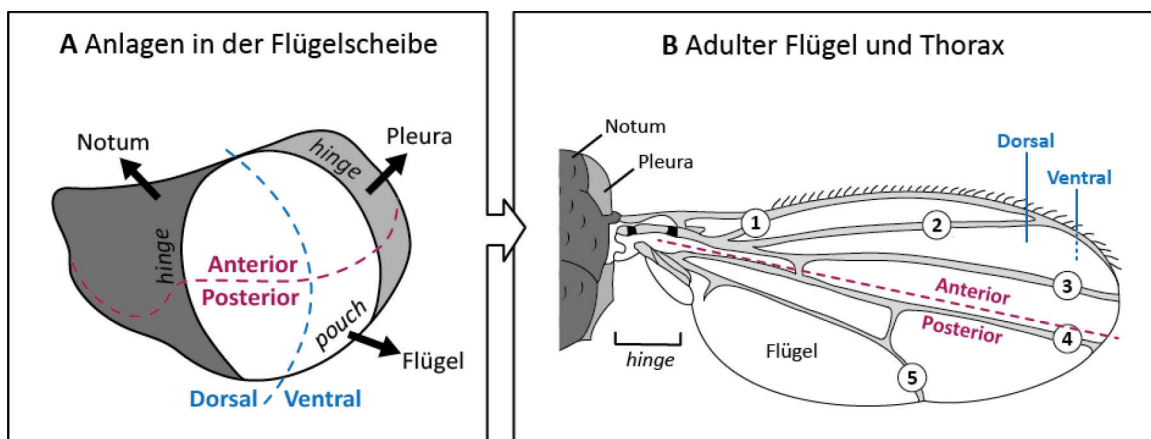


Abb. 2: Der adulte *Drosophila*-Flügel entsteht während der Metamorphose aus der Flügelimaginalscheibe (verändert nach (North und French, 1994)).

A) Aus der *pouch* (weiß), entsteht in der adulten Fliege der Flügel. Um diese Fläche herum befindet sich in der Scheibe die Anlage für die *hinge*-Region, die spätere Gelenkregion. Auch die ventrale Region (Pleura, mittelgrau) und die dorsale Region (Notum, dunkelgrau) des Thorax werden bereits in der Flügelscheibe angelegt. Während der Metamorphose evaginiert die Flügelimaginalscheibe: die präsumptive Flügelfläche (*pouch*) stülpt sich aus und faltet sich entlang der D-/V-Grenze, sodass Notum und Pleura zusammengebracht werden. **B)** Der adulte Flügel ist durch fünf (①-⑤) longitudinale Venen unterteilt. Die A-/P- (pink) sowie die D-/V-Grenze (blau) sind sowohl in der Flügelimaginalscheibe als auch im adulten Flügel durch gestrichelte Linien dargestellt. Die korrespondierenden larvalen und adulten Regionen sind jeweils in den gleichen Grautönen eingefärbt.

Die Flügelimaginalscheibe wird durch die frühe Ausbildung einer anterior/posterioren (A-/P)- sowie einer dorso/ventralen (D-/V)-Grenze in Kompartimente unterteilt (Abb. 2, Abb. 3). Diese Prozesse werden maßgeblich durch die Morphogene Wingless (Wg), Hedgehog (Hh) und Decapentaplegic (Dpp) gesteuert. In der Flügelimaginalscheibe wird *omb* in der Pleura, in der *pouch* und der dorsalen *hinge* exprimiert (Abb. 3C). Die *omb*-Expression im Flügel wird durch Dpp und Wg induziert (Grimm und Pflugfelder, 1996).

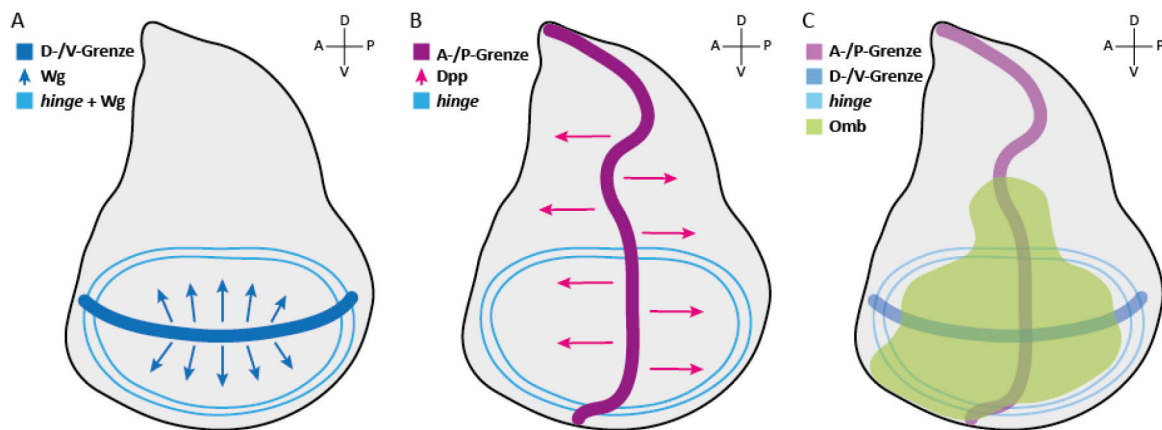


Abb. 3: Die Morphogene Wg und Dpp steuern den Erhalt der D-/V- bzw. der A-/P-Grenze und kontrollieren die Expression von *omb* (verändert nach (Zecca und Struhl, 2010)).

A) Das dorsale Kompartiment wird früh durch das Selektorgen *apterous* (*ap*) spezifiziert (nicht gezeigt). Im späten L2-Stadium wird Wg (Pfeile in dunkelblau) entlang der D-/V-Grenze (dunkelblau) exprimiert und bildet einen Proteingradienten. Während des L3-Stadiums wird die *wg*-Expression erst in einem sogenannten inneren Ring und dann in einem äußeren Ring (hellblau) entlang der *hinge* initiiert. **B)** Die Flügelimaginalscheibe wird auch in ein anteriores und ein posteriores Kompartiment unterteilt. Das Morphogen Decapentaplegic (Dpp) (Pfeile in pink) wird in Zellen anterior der A-/P-Grenze (violett) exprimiert, wirkt aber durch die Ausbildung eines Gradienten auch in posterioren Zellen. **C)** Das T-Box Gen *omb* (grün) wird in der Flügelimaginalscheibe im Bereich der *pouch*, welche in der adulten Fliege die Flügelfläche bildet, in der *hinge*, der presumptiven Gelenkregion, sowie der Pleura exprimiert.

2.2.2.1 Der Wg-Signalweg kontrolliert die D-/V-Achse in der Flügelscheibe

Die Aktivität des Wg-Signalwegs ist notwendig für Spezifizierung, Wachstum, Musterbildung und Morphogenese der *pouch*, der späteren Flügelfläche. Das LIM/Homeobox-Selektorgen *apterous* (*ap*) spezifiziert früh das dorsale Kompartiment (Diaz-Benjumea und Cohen, 1993) und initiiert den Notch-Signalweg durch die Regulation der spezifischen Expression der Liganden Serrate und Delta im dorsalen bzw. ventralen Kompartiment (Micchelli und Blair, 1999). Die Aktivierung des Notch-Signalwegs induziert im mittleren L2-Stadium schließlich die Expression von *wingless* (*wg*) entlang der D-/V-Grenze (Abb. 3) (Neumann und Cohen, 1996). Im frühen L3-Stadium wird *wg* zusätzlich im sogenannten inneren Ring entlang der distalen *hinge* exprimiert, im späten L3-Stadium erscheint ein äußerer, *wg*-exprimierender Ring (Widmann und Dahmann, 2009). Das Wg-Protein bildet einen Gradienten und aktiviert in konzentrationsabhängiger Weise Zielgene wie *vestigial*

(*vg*), *shotgun (shg)*, *senseless (sens)* und *distal-less (dll)* in umgebenden Zellen (Zecca *et al.*, 1996); (Jafar-Nejad *et al.*, 2006); (Widmann und Dahmann, 2009).

Die Wg-Signalkaskade wird durch die Bindung von Wg an seinen Rezeptor Fz2 aus der Frizzled (Fz)-Familie sowie den Co-Rezeptor Arrow (Arr) initiiert (Schilling *et al.*, 2014), wodurch das extrazelluläre Signal in eine intrazelluläre Kaskade übersetzt wird (Abb. 4). Dies führt letztlich zur cytoplasmatischen Stabilisierung von Armadillo (Arm)/ β -catenin. Die cytoplasmatische Arm-Konzentration wird normalerweise durch eine Proteasom-vermittelte Degradation niedrig gehalten. Das Wg-Signal resultiert in einer Aktivierung von Dishevelled (Dsh) und folglich in einer Verminderung der Zw3-Kinaseaktivität (*shaggy/sgg* in *Drosophila*) (Zeng und Verheyen, 2004). Dieses Enzym ist Bestandteil eines Proteinkomplexes mit Axin (Axn) und APC (*APC-like/Apc* in *Drosophila*), der in Abwesenheit von Wg den Abbau von Arm vermittelt. Bei der Aktivierung der Wg-Signalkaskade akkumuliert Arm und assoziiert mit dem DNA-Bindeprotein Pangolin (Pan). Der Arm-Pan-Komplex reguliert dann die Transkription der Wg-Zielgene. Die beiden Rezeptorkomponenten Arr und Fz2 werden durch Wg in ihrer Transkription herunterreguliert, wodurch sie einen zu Wg entgegengesetzten Gradienten bilden.

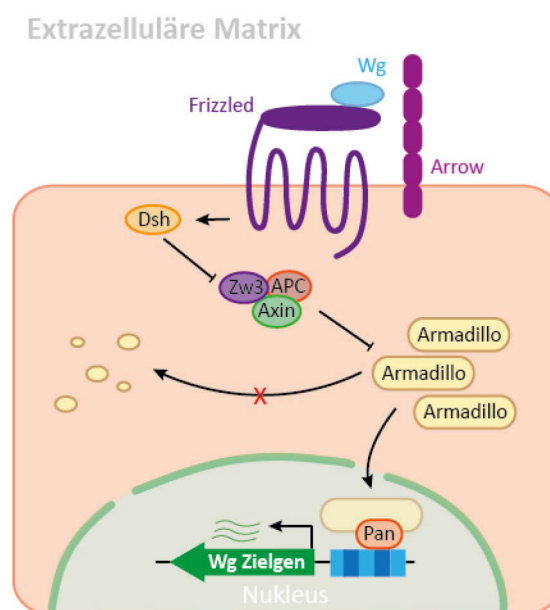


Abb. 4: Model des Wg-Signalwegs.

Die Wg-Signalkaskade wird durch die Bindung von Wg an seinen Rezeptor Frizzled2 (Fz2) sowie den Co-Rezeptor Arrow (Arr) initiiert. Das Wg-Signal führt zur Aktivierung von Dishevelled (Dsh) und in Folge dessen zu einer Verminderung der Zw3-Kinaseaktivität. Dieses Enzym ist Bestandteil eines Proteinkomplexes mit Axin und APC, der in Abwesenheit von Wg den Abbau von Armadillo (Arm) vermittelt. Bei der Aktivierung der Wg-Signalkaskade akkumuliert Arm und assoziiert mit dem DNA-Bindeprotein Pangolin (Pan). Der Arm-Pan-Komplex reguliert schließlich die Transkription der Wg-Zielgene.

Die Regulation vieler Signalwege beinhaltet den Mechanismus des *feedback loops* (Zeng und Verheyen, 2004). Im Falle von negativen *feedback loops* induziert ein Signalweg die Expression der eigenen Inhibitoren, was wiederum zu einer Reduktion der Expression führt. Auch im Wg-

Signalweg von *Drosophila* wurden einige Beispiele für diesen Regulationsmechanismus identifiziert. Die Expression von *frizzled-3* (*fz3*), einem weiteren Mitglied der Fz-Rezeptor-Familie, wird in der *pouch* durch Wg aktiviert. Fz3 reduziert die Menge von Arr und Fz2 in Bereichen mit *wg*-Expression und agiert somit als negativer Regulator des Wg-Signalwegs (Schilling *et al.*, 2014). Nemo (Nmo) wurde als intrazellulärer Antagonist des Wg-Signalwegs identifiziert. Seine Expression in der *pouch* wird durch ein hohes Wg-Expressionslevel induziert. Ektopische Expression von *nmo* führt zu einer Reduktion des stabilisierten Arm in der Zelle (Zeng und Verheyen, 2004).

Auch die *omb*-Expression wird in der Flügelimaginalscheibe von Wg beeinflusst. Die Inaktivierung von Wg führt zu einer deutlichen Reduktion der *omb*-Expression in der *pouch* (Grimm und Pflugfelder, 1996).

2.2.2.2 Omb beeinflusst den Hh-Signalweg in der Flügelscheibe

Die Etablierung der A-/P-Grenze wird maßgeblich durch die Homeobox-Transkriptionsfaktoren Engrailed (En) und Invected (Inv) gesteuert, die, mit Ausnahme der späten Larvalentwicklung nur in posterioren Zellen exprimiert werden (Brower, 1986). En kontrolliert die Zellsegregation an der A-/P-Grenze durch die Aktivierung der *hh*-Expression im posterioren Kompartiment und die gleichzeitige Repression von *Cubitus interruptus* (*Ci*). Der Transkriptionsfaktor Ci vermittelt in der aktiven Form das Signal von Hh in den Nukleus. Posteriore Zellen produzieren in Folge dessen Hh, können aber nicht darauf antworten (Dominguez *et al.*, 1996).

Obwohl die Hh-Kaskade über einige hoch konservierte Komponenten verfügt, fehlt noch immer ein genaues Verständnis der Hh-Ligandenbewegung und der Signaltransduktion. Nichtsdestotrotz ist eine Vielzahl an Proteinen bekannt (Abb. 5), die Hh entweder in der Extrazellulären Matrix (ECM) oder an der Zelloberfläche binden und somit die Ausbildung des Hh-Gradienten maßgeblich steuern (Wilson und Chuang, 2006). Nach der Translation erfährt der 45kDa Hh-Vorläufer eine autokatalytische Spaltung sowie diverse Modifikationen wie Acetylierung, Palmitoylierung und die Anlagerung eines Cholesterol-Moleküls im Endoplasmatischen Retikulum (ER)/Golgi-Apparat (Gorfinkiel *et al.*, 2005). Die Freisetzung des modifizierten Hh-Proteins in die Extrazelluläre Matrix wird durch Dispatched (Disp) und vermutlich auch durch die redundanten Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) Dally und Dally-like (Dlp) ermöglicht (Chen *et al.*, 2007; Lin, 2004). Der genaue Mechanismus bleibt aber nach wie vor ungeklärt. Die Biosynthese der Heparansulfat-Ketten wird maßgeblich von Glycosyl-Transferasen bestimmt, welche von *tout-velu* (*ttv*), *brother-of-tout-velu* (*botv*) und *sister-of-tout-velu* (*sotv*) kodiert werden (Izumikawa *et al.*, 2006). Diese sind nicht nur für die Hh-Diffusion essentiell, sondern auch für die Wg- und Dpp-Signalgebung und – Diffusion (Gorfinkiel *et al.*, 2005). Ein weiterer Faktor, der bei der Sezernierung von Hh und der Bildung des Gradienten eine Rolle spielt ist Flotillin-2 (Flo-2). Flo-2 ist eine Hauptkomponente der

Membran-Microdomänen. Überexpression von *Flo-2* führt zu einer erhöhten Freisetzung von Hh, umgekehrt verursacht der Verlust von *Flo-2* eine Reduktion des Hh-Gradienten (Katanaev *et al.*, 2008).

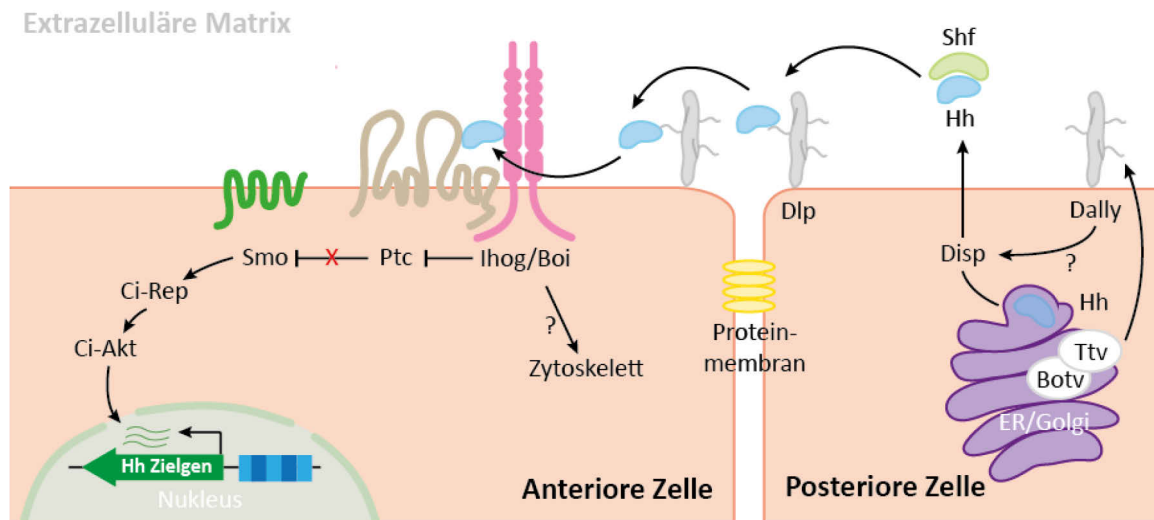


Abb. 5: Model des Hh-Signalwegs (verändert nach (Wilson und Chuang, 2006)).

Die Hh-Produktion erfolgt durch die Aktivierung von En ausschließlich in Zellen des posterioren Kompartiments. Die Freisetzung von Hh nach Modifikationen im ER/Golgi wird durch Disp und die HSPGs Dally und Dlp vermittelt. Die Glycosyl-Transferasen Ttv und Botv sind maßgeblich an der Biosynthese der HSPGs beteiligt. Die HSPGs tragen ebenso wie das extrazelluläre Protein Shf zur Stabilisation und Diffusion von Hh bei. In anterioren Zellen bindet Hh an seinen Transmembran-Rezeptor Ptc sowie an Ihog/Boi. Die synergistische Bindung von Hh an den Ptc/Ihog/Boi-Komplex verhindert die Inhibition von Smo, was wiederum zu einer Stabilisierung des Transkriptionsfaktors Ci führt. Dieser überträgt das Hh-Signal in den Nukleus und aktiviert somit die Transkription von Hh-Zielgenen.

In der Extrazellulären Matrix co-lokalisiert das sezernierte Protein Shifted (Shf) mit Hh und führt durch die Interaktion mit den HSPGs zu dessen Stabilisierung (Gorfinkiel *et al.*, 2005). Dlp dirigiert Hh in Folge dessen zu sogenannten Membran-Mikrodomänen auf anterioren Zellen, bestehend aus dem Rezeptor Patched (Ptc) und den mutmaßlichen Co-Rezeptoren Interference hedgehog (Ihog) und Brother of ihog (Boi). Obwohl bekannt ist, dass beide Proteine für die Aktivierung des Hh-Signalwegs unerlässlich sind, ist auch hier ein genauer Mechanismus bislang unklar. Durch Epistasie-Experimente konnte allerdings gezeigt werden, dass Ihog und Boi *upstream* von Ptc wirken bzw. auf der gleichen Ebene (Camp *et al.*, 2014). Vermutlich ermöglichen sie die Inhibition von Ptc durch die Bindung von Hh. Durch diese Bindung wird die Repression des Transmembranproteins Smoothed (Smo) verhindert und so dessen Translokation an die Zelloberfläche und eine Phosphorylierung des cytosolischen C-Terminus ermöglicht. Dies führt letztlich zu einer Stabilisierung der Aktivatorform von Ci (Ci-155) und der Expression von Hh-Zielgenen.

In Abwesenheit von Hh inhibiert Ptc Smo und verhindert so dessen Translokation an die Zelloberfläche. Unter diesen Bedingungen erfolgt eine proteolytische Spaltung von Ci, wobei die C-

terminale Aktivierungsdomäne entfernt wird. Ci inhibiert dann als Repressor die Aktivierung von Hh-Zielgenen im Nukleus.

Als Antwort auf die Hh-Signalkaskade produzieren Zellen in einem schmalen Streifen anterior der A-/P-Grenze das Morphogen Decapentaplegic (Dpp). Dpp wirkt durch die Ausbildung eines Gradienten auch in posterioren Zellen. In konzentrationsabhängiger Weise reguliert Dpp direkt oder indirekt diverse Zielgene in beiden Kompartimenten, so zum Beispiel *spalt (sal)*, *Daughters against dpp (Dad)*, *vestigial (vg)*, *brinker (brk)* und *omb*.

Omb ist ebenfalls für die Musterbildung in der Flügelimaginalscheibe essentiell. In wildtypischen Flügelimaginalscheiben wird *omb* im Bereich der *pouch*, welche in der adulten Fliege die Flügelfläche bildet, und der *hinge*, der presumptiven Gelenkregion, exprimiert (Abb. 3C, Abb. 6A). Die Inaktivierung der Morphogene Wg und Dpp führt jeweils zu einer deutlichen Reduzierung der *omb*-Expression in der *pouch* (Grimm und Pflugfelder, 1996). Wie bereits gezeigt wurde, spielt der T-Box Transkriptionsfaktor in der Flügelimaginalscheibe eine entscheidende Rolle im Erhalt der A-/P-Grenze (Shen und Dahmann, 2005). Wird die Expression von Omb im posterioren Kompartiment unterdrückt, führt dies zur Ausbildung einer ektopischen epithelialen Falte entlang der A-/P-Grenze im Bereich der presumptiven Flügelfläche (*pouch*) (Shen *et al.*, 2008). Mit der ektopischen Faltenbildung geht auch eine Reduktion der Hh-Signalaktivität einher, wie durch die reduzierte *ptc* und *Ci* Expression nachgewiesen wurde (Liu *et al.*, in Vorbereitung). Wie genau Omb in den Signalweg eingreift, bleibt allerdings noch zu klären und ist unter anderem Bestandteil dieser Arbeit. Eine direkte Regulation von *hh* durch Omb konnte bereits ausgeschlossen werden. Die *hh*-Expression ist bei posteriorer Reduktion von Omb nicht beeinträchtigt. Die ektopische Faltenbildung bei Verwendung von *omb*RNAi im posterioren Kompartiment kann jedoch durch die zusätzliche Expression von *hh* gerettet werden (Liu *et al.*, in Vorbereitung). Der Effekt der Faltenbildung tritt nicht bei anteriorer Reduktion von Omb auf (Shen *et al.*, 2008). Adachi-Yamada und Kollegen beschrieben eine apikale Faltenbildung auch in der Flügelscheibe des *omb* hypomorphen Allels *bifid* (Umemori *et al.*, 2007).

2.2.2.3 Die Rolle von Omb in der Augen-und Beinentwicklung

Omb wird auch in den larvalen Vorläufern der Augen und der Beine exprimiert. Die Augen-/Antennenimaginalscheibe beinhaltet die Anlagen für je ein Komplexauge und die drei Segmente einer Antenne. *Omb* wird zum einen in retinalen basalen Gliazellen exprimiert und zum anderen in Epithelzellen am dorsalen und ventralen Randbereich der Augenimaginalscheibe (Abb. 6B) (Poeck *et al.*, 1993b). Insbesondere im ventralen Bereich inhibiert Omb die Zellproliferation sowie die Initiierung und die Progression der Morphogenetischen Furche und wirkt somit als Antagonist auf

die Augenentwicklung. Der Verlust von *omb* verursacht eine verstärkte Proliferation im ventralen Bereich der Augenscheibe (Tsai *et al.*, 2015).

Aus den sechs Beinimaginalscheiben entstehen durch die Differenzierung während der Metamorphose die einzelnen Beine der Imago. Zwar wird *omb* im dorsalen Bereich der Scheibe exprimiert (Abb. 6C), ein *omb*-Verlust hat jedoch keinen großen Einfluss auf die Beinentwicklung (Pflugfelder, 2009).

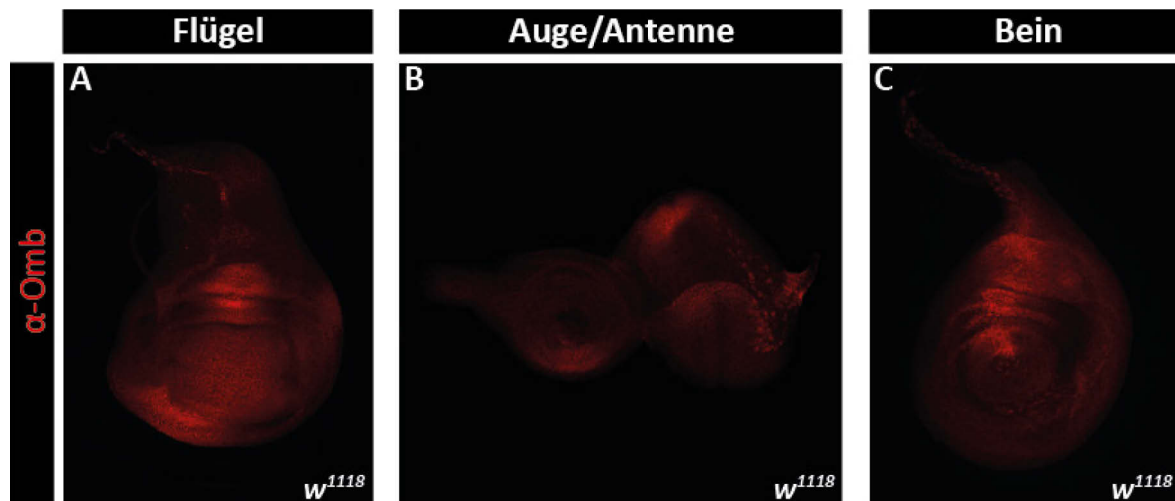


Abb. 6: Omb wird in der Flügel-, der Augen-/Antennen- und der Beinimaginalscheibe exprimiert.

Die Imaginalscheiben zeigen die Verteilung des Omb-Proteins mittels fluoreszenter Antikörperfärbung. (A) In der Flügelimaginalscheibe wird *omb* im Bereich der *pouch* exprimiert, welche in der adulten Fliege die Flügelfläche bildet, in der *hinge*, der presumptiven Gelenkregion, sowie der Pleura (vgl. Abb. 2). (B) In der Augen-/Antennenscheibe wird *omb* zum einen in retinalen basalen Gliazellen exprimiert und zum anderen in Epithelzellen am dorsalen und ventralen Randbereich der Augenimaginalscheibe. Im Antennenbereich ist ebenfalls eine Expression am ventralen Rand zu detektieren. (C) In den Beinimaginalscheiben wird *omb* im dorsalen Bereich exprimiert. Die Abbildungen zeigen eine Maximumprojektion der konfokalen Schnittebenen. Anterior ist links, dorsal ist oben.

2.3 Das Tbx-Protein Org-1 ist bereits in der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* von großer Bedeutung

Das T-box Gen *optomotor-blind-related gene-1* (*org-1*), wurde erstmals 1998 isoliert (Porsch *et al.*, 1998). Da die T-box mit der von Omb die größte Übereinstimmung mit 60,8% aufweist, erhielt das Gen die entsprechende Bezeichnung. Die T-Domänen beider Proteine sind von großen N- und C-terminalen Regionen flankiert, wobei in diesen Bereichen keine signifikanten Sequenzübereinstimmungen vorliegen (Porsch *et al.*, 1998). *Org-1* ist das einzige orthologe Gen zu TBX1 in Vertebraten, welches unter anderem mit der Entstehung des DiGeorge-Syndroms in Verbindung gebracht wird (Packham und Brook, 2003).

Org-1 wird hauptsächlich während der Embryogenese exprimiert und ist dabei an der Musterbildung des viszerale Mesoderms beteiligt (Lee *et al.*, 2003). Ähnlich wie die meisten T-Box Proteine agiert *Org-1* in Zellkultur-Assays als transkriptioneller Aktivator (Porsch *et al.*, 2005). Die stärkste aktivierende Funktion ist dabei im C-terminalen Bereich lokalisiert. Während der somatischen Myogenese von *Drosophila* aktiviert *Org-1* direkt die bekannten Muskel-Identitätsgene *ladybird* (*lb*) und *slouch* (*slou*) (Schaub *et al.*, 2012). Die Expression der beiden Homeodomänen-Gene überlappt mit der von *org-1* in einer kleinen Gruppe von Muskelvorläuferzellen. In *org-1*-mutanten Embryos fehlt die Expression von *lb* und *slou* in genau diesen Zellen, was entweder eine starke Fehlbildung oder einen kompletten Verlust der entsprechenden Muskelfasern zur Folge hat (Schaub *et al.*, 2012).

Für die somatische Muskelexpression von *lb* und *slou* konnten bestimmte Enhancerelemente identifiziert werden, die im Folgenden als *cis*-regulatorische Module (CRMs) bezeichnet werden. Die Aktivierung der beiden Gene durch *Org-1* benötigt TBEs, welche in diesen spezifischen CRMs lokalisiert sind und *in vivo* durch *Org-1* gebunden werden können. Die Arbeitsgruppe von Manfred Frasch generierte für dieses Experiment Reporterkonstrukte mit den entsprechenden Enhancerelementen (Abb. 7), die eine zum Wildtyp äquivalente Reporteraktivität zeigen. Das vorher bereits definierte Enhancerfragment *lbi-SBM* (Philippakis *et al.*, 2006) sowie das 925bp Subfragment *lbi-SBMs* weisen Reporteraktivität auf, die im *org-1*-mutanten Embryo komplett verloren gehen. Die Enhancerregion von *slou* kann in zwei Bereiche unterteilt werden, die als *slou-SK10* und *SK16* bezeichnet werden. In *org-1*-mutanten Embryonen zeigen beide Regionen keine Aktivität in den spezifischen Zelllinien, die sonst *org-1* exprimieren.

Diese Beobachtungen zeigen, dass beide Gene transkriptionelle Ziele von *Org-1* sind. Durch Sequenzanalysen der entsprechenden CRMs wurden sechs potentielle *Org-1* Bindestellen im *lbi-SBMs* identifiziert und sieben im *slou-SK16*-Fragment. Mittels Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) wurde *in vivo* die Bindung von *Org-1* an *lbi-SBMs* und auch an die Bindestellen im *SK16*-Fragment bestätigt, wenn auch im Falle von *SK16* eine geringere Anreicherung beobachtet wurde (Schaub *et al.*, 2012). Darüber hinaus führte auch der gezielte Austausch mehrerer Basen in den potentiellen *Org-1* Bindestellen dieser Fragmente zum Verlust oder zur Reduktion der Reportergenexpression (Abb. 7) in den spezifischen Muskelvorläuferzellen.

Christoph Schaub konnte somit demonstrieren, dass die normale Aktivierung von *slou* und *lbi* durch *Org-1* die Bindung an spezifische Bindestellen (TBEs) innerhalb des Enhancerelements voraussetzt. Ob für diese transkriptionelle Aktivierung die *Org-1*-Bindung an eine einzige Bindestelle ausreichend ist oder ob mehrere Bindestellen besetzt sein müssen, ist Gegenstand dieser Arbeit.

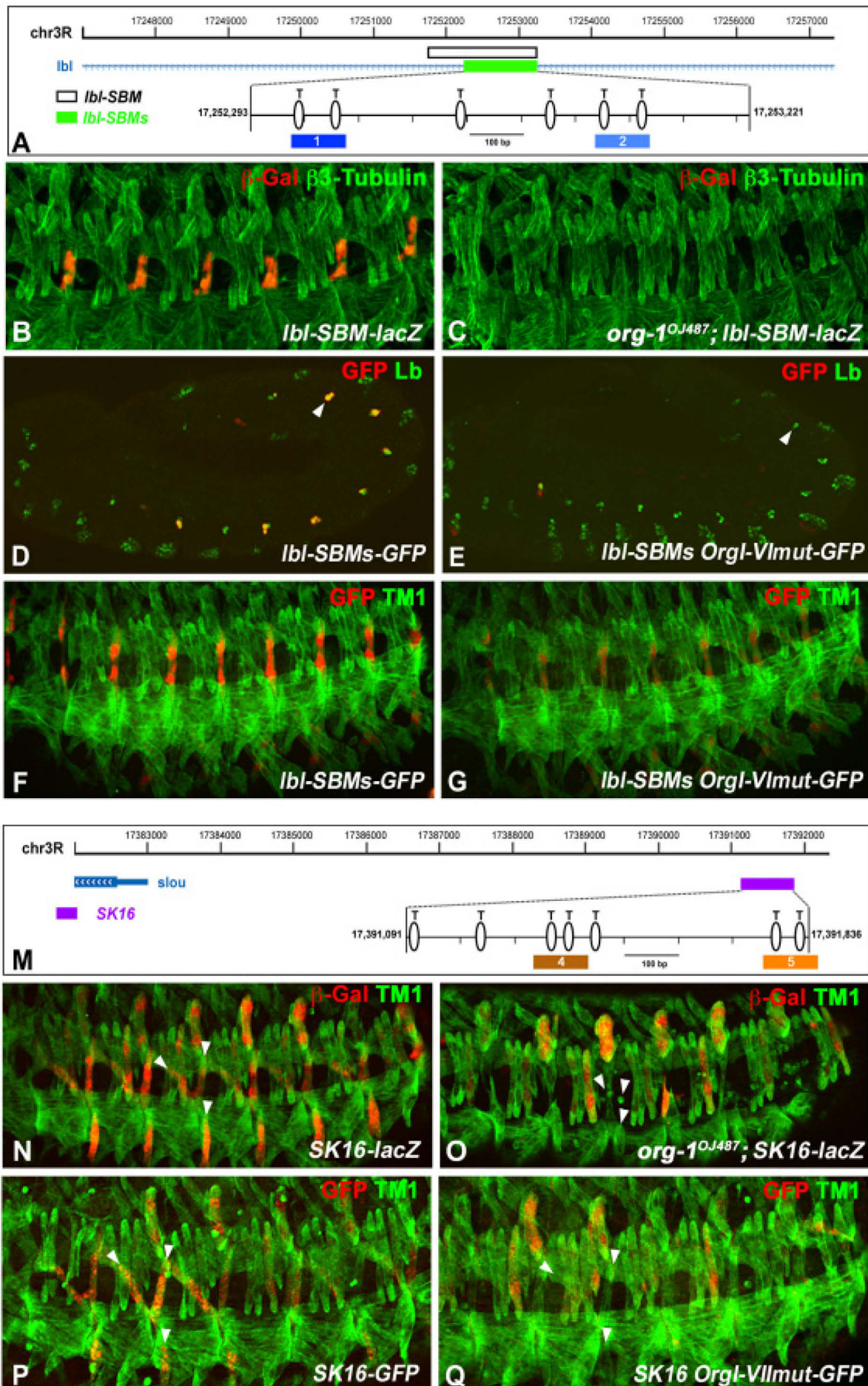


Abb. 7 (auf der vorherigen Seite): Die Org-1-Bindestellen in den *lbi* und *slou* CRMs sind essentiell für die spezifische Enhancer-Aktivität (verändert nach (Schaub *et al.*, 2012)).

(A) Schema der genomischen Region von *lbi*, die zur Herstellung der *lbi*-SBM- (schwarz) und *lbi*-SBMs-Reporter (grün) verwendet wurde. Die vorhergesagten T-Box Bindestellen (T) sind ebenfalls dargestellt. (B) *lbi*-SBM-getriebene *lacZ*-Expression in M8 und IAMPs im Wildtyp-Embryo (Stadium 15). (C) Der *org-1*-mutante Embryo mit *lbi*-SBM-*lacZ* zeigt einen kompletten Verlust der β -Gal-Expression (Stadium 15). (D) *lbi*-SBMs-GFP weist die gleiche Expression wie das Lb-Protein in somatischen Muskelvorläufern auf (Pfeilkopf). (E) *lbi*-SBMs-*Org1-Vlmut*-GFP mit sechs mutierten, vorhergesagten Org-1-Bindestellen zeigt einen Verlust der Reporteraktivität in somatischen Muskelvorläufern (Pfeilkopf) (Stadium 12, anti-GFP, anti-Lb). (F) *lbi*-SBMs-Expression in M8 und IAMPs (Stadium 15). (G) *lbi*-SBMs-*Org1-Vlmut*-GFP zeigt eine reduzierte Reporteraktivität in M8 und den IAMPs (Stadium 15, anti-GFP, anti-TM1). (M) Schema der genomischen Region von *slou*, die zur Herstellung des SK16-Reporterkonstrukts (lila) verwendet wurde. Die vorhergesagten T-Box Bindestellen (T) sind ebenfalls dargestellt. (N) *slou*-SK16-*lacZ*-Reporteraktivität in den Org-1-positiven Muskeln 5, 25 und 8 (Pfeilköpfe) sowie in M18 (und schwache ektopische Aktivität in M21 und M23). (O) Im *org-1*-mutanten Hintergrund wird die *slou*-SK16-*lacZ*-Reporteraktivität nicht in den Überresten von M5, M25 und M8 aktiviert (Pfeilköpfe), bleibt aber in M18, M21 und M23 aktiv. (P) *slou*-SK16-GFP-Reporteraktivität in den *slou*-positiven Muskeln 5, 25 (Pfeilköpfe) und 18 sowie in M8 (Pfeilkopf), M22 und M24. (Q) Das *slou*-SK16 *Org1Vlmut*-Enhancerkonstrukt kann die GFP-Expression in den Muskeln 5, 25 und M8 (Pfeilköpfe) nicht aktivieren (Stadium 15, anti-GFP, anti-TM1). In M18, M21 und M23 bleibt die Expression erhalten.

IAMP: lateral adult muscle precursor; M: Muskel

2.4 Identifizierung potentieller Zielgene von Tbx-Proteinen in *Drosophila melanogaster*

Seit der Entdeckung der Tbx-Familie konnten bereits einige Kenntnisse über die Rolle einzelner Mitglieder in entwicklungsbiologischen Prozessen erlangt werden, auch in *Drosophila*. Obwohl Omb das am besten charakterisierte der acht Tbx-Proteine in *Drosophila* ist, fehlt nach wie vor ein molekulares Verständnis seiner zell- und entwicklungsbiologischen Wirkung. Daher ist es von großer Bedeutung potentielle Zielgene zu identifizieren und diese zu verifizieren, wie dies zum Beispiel für Org-1 mit *lbi* und *slou* in der Embryonalentwicklung (siehe 2.3) schon geschehen ist. Auch für Omb wurden bereits Gene identifiziert, deren Expression in der Flügelentwicklung durch Omb beeinflusst wird (del Alamo Rodriguez *et al.*, 2004). Ob diese Gene allerdings einer direkten oder indirekten Kontrolle durch Omb unterliegen, ist bislang noch unklar.

Die DNA-Bindedomäne der bekannten Tbx-Proteine ist über alle Spezies hinweg stark konserviert. Diese Tatsache führt zu der Annahme, dass alle Transkriptionsfaktoren dieser Familie an die gleichen Tbx-Bindungsstellen (TBEs) binden können, um als transkriptionaler Repressor und/oder Aktivator zu wirken. Durch *in vitro*-Bindeassays wurde diese Annahme bereits verifiziert (Nitta *et al.*, 2015). Nichtsdestotrotz wurden bislang zu wenige tatsächliche TBEs identifiziert, welche die Wirkung einzelner Tbx-Proteine vermitteln. Umso wichtiger ist es, einzelne Tbx-Zielgene zu bestimmen und dann eine direkte oder indirekte Interaktion beispielsweise mit Omb oder Org-1 nachzuweisen. Die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene wurden aufgrund von bioinformatischen und experimentellen Analysen ausgewählt.

2.4.1 Bioinformatische Analyse

Die bioinformatische Analyse wurde durch Hüseyin Binbas (FH Bingen) im Rahmen seiner Diplomarbeit am Institut für Genetik in Mainz durchgeführt (Binbas, 2009).

Ausgehend von dem Programm *Target Explorer* wurde eine phylogenetische *Footprinting* Software entwickelt, welche die Suche nach konservierten TBEs innerhalb der *Drosophila*-Sequenz ermöglicht. Dafür wurde eine *Positional Weight Matrix (PWM)* mit 40 aus der Literatur bekannten TBEs (je 10bp) erstellt. Mit dem *Target Explorer* und der *PWM* wurde daraufhin ein Screen genomischer Sequenzen durchgeführt. Der höchste *PWM*-Score war dabei 10.93, der niedrigste 4.46. Zusätzlich wurde ein durchschnittlicher *PWM*-Score berechnet, der die Konservierung einer identifizierten TBE innerhalb der 12 *Drosophila*-Arten angibt (ebenfalls maximal 10.93). Um die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse zu verringern, wurden folgende Rahmenbedingungen festgelegt:

- *Drosophila melanogaster PWM* cut-off : mindestens 8,77
- mittlerer *PWM*-Score an dieser Position für alle 12 *Drosophila* Spezies: > 8,0
- Konzentration auf Gene mit einer Rolle in der Flügelentwicklung

Ausgehend von einem Satz von etwa 1000 Genen, für die eine Rolle oder Expression in der Flügelentwicklung nachgewiesen war, konnten 265 TBEs in (+/- 10 kb) 191 Genen identifiziert werden. TBEs, welche im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle spielen, sind im Anhang (7.1) tabellarisch mit den jeweiligen Scores aufgelistet.

2.4.2 Microarray-Analyse

Mit Hilfe eines Microarray können Aussagen über das Transkriptom in einem Gewebe ermöglicht werden (Klebes *et al.*, 2005). Das Microarray-Experiment, das dieser Arbeit z.T. zugrunde liegt, wurde von Ansgar Klebes (Humboldt Universität, Berlin) durchgeführt. In diesem Fall wurde die *mRNA* aus Flügelimaginalscheiben von *bifid*- und Wildtyp-L3-Larven isoliert und mittels reverser Transkription in *cDNA* umgeschrieben. Dabei wurden die *cDNAs* unterschiedlicher Herkunft mit rot bzw. grün fluoreszierenden Farbstoffen (Cy5 bzw. Cy3) markiert. Nach der Hybridisierung auf dem Microarray wird die Fluoreszenz mit Laserlicht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt und das Verhältnis der Intensität kann mit speziellen Computerprogrammen ausgewertet werden. Aufgrund dieses Verhältnisses kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Transkription eines bestimmten Gens in der *bifid*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp erhöht, verringert oder gleich bleibend stattfindet.

3. Zielsetzung

Tbx-Proteine spielen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der Metazoen. Die Kenntnis Tbx-regulierter Gene würde zu einem besseren Verständnis der Entwicklungsprozesse beitragen, in denen Tbx-Proteine involviert sind. Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Identifizierung von Omb-Zielgenen in der larvalen Flügelentwicklung. Dazu wird auf einen Pool an Kandidatengenen zurückgegriffen, der sowohl auf der Bioinformatik als auch auf der Microarray-Analyse basiert. Um eine überschaubare Schnittmenge zu erhalten, soll zusätzlich zur Identifikation von Omb-Bindestellen, ein ChIP-on-chip mit DNA aus Augen- und Flügelimaginalscheiben durchgeführt werden. Da alle drei Methoden fehleranfällig sind, kann durch Kombination der experimentellen Ansätze der Anteil an falsch-positiven Kandidatengenen reduziert werden. Ziel ist es, einzelne Gene als mögliche Zielgene zu identifizieren und einzelne Sequenzbereiche als TBEs von Omb zu verifizieren. Dabei liegt der besondere Fokus auf Genen des Hh- oder Wg-Signalwegs, da eine Rolle von Omb bei beiden Signalwegen vermutet wird.

Die Gene des engeren Kandidatenkreises sollen im Anschluss mittels *in situ*-Hybridisierung oder Antikörperfärbung an Flügelscheiben auf eine Regulation durch Omb getestet werden. Dafür werden sowohl *gain-of-function* als auch *loss-of-function*-Analysen mithilfe der *Gal4-UAS*-Systems durchgeführt, sowie Veränderungen des Expressionsmusters in *l(1)omb*-mutanten Larven ermittelt.

Weiterhin soll für vergleichende Expressionsstudien (Wildtyp gegen *l(1)omb*-mutanten Larven) die quantitative RealTime-PCR im Labor etabliert und eingesetzt werden. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung der relativen Expression bestimmter potentieller Zielgene von Omb in Lysaten aus L3-Flügelimaginalscheiben von *omb*³¹⁹⁸-mutanten und *FM-GFP*-Kontrolltieren. Sie dient ebenfalls zur Verifizierung der Befunde aus Bioinformatik, Microarray, ChIP-on-chip sowie Histologie.

Eine direkte Regulation von Omb-Zielgenen erfordert sehr wahrscheinlich das Vorhandensein einer oder mehrerer TBEs. Für bestimmte Kandidatengene werden deshalb Enhancer-Reporter-Konstrukte hergestellt und injiziert. Die Analyse der Enhancer-Aktivität erfolgt in der Regel über eine X-Gal Färbung an L3-Larven, im wildtypischen und im *omb*-mutanten Hintergrund. Sofern ein Omb-abhängiger Effekt zu erkennen ist, sollen einzelne TBEs mutiert werden, um die Notwendigkeit der Bindestelle und somit auch eine direkte Regulation nachzuweisen. Dies soll auch abschließend die Frage nach der reprimierenden oder aktivierenden Funktion von Omb beantworten.

Die Kenntnis von Omb-Zielgenen ist auch ein erster Schritt zur Lösung der allgemeinen Frage, wie DNA-Bindungsproteine aus einer Genfamilie mit sehr ähnlicher *in vitro* Spezifität *in vivo* unterschiedliche regulatorische Funktionen wahrnehmen können. Dazu wird auch ein Blick auf das weniger gut untersuchte Tbx-Protein Org-1 geworfen. Wie von Schaub und Frasch 2012 gezeigt

wurde, reguliert Org-1 die Muskelidentitätsgene *lbl* und *slo* in der Embryonalentwicklung von *Drosophila*. Für diese aktivierende Funktion von Org-1 ist die Bindung an die TBEs in den entsprechenden *cis*-regulatorischen Modulen (CRMs) notwendig. Da in dem bereits publizierten Versuch allerdings alle TBEs mutiert wurden, stellt sich weiterhin die Frage, ob auch die Mutation einer einzelnen hoch-konservierten TBE ausreichend ist, um diesen Effekt zu reproduzieren. Dafür werden auf der Grundlage von Schaub *et al.* (2012) ebenfalls Enhancer-Reporter-Konstrukte hergestellt und einzelne TBEs mutiert. Der daraus resultierende Effekt sollte im Embryo analysiert werden.

Letztlich soll dadurch die Frage geklärt werden, ob die biologische Spezifität von Tbx-Proteinen durch die Unterschiede in den Sequenzen von nachgewiesenen genomischen TBEs bestimmt wird, die *in vivo* von unterschiedlichen Tbx-Proteinen gebunden werden oder ob diese durch die Interaktion mit anderen Faktoren entsteht.

Darüber hinaus ermöglicht die gründliche Analyse einzelner TBEs natürlich auch eine Anpassung der Suchkriterien nach Tbx-Zielgenen in anderen Entwicklungszusammenhängen, nicht nur in *Drosophila melanogaster*.

4. Material & Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

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

4.1.2 Enzyme

4.1.2.1 Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von NEB bezogen. Die entsprechenden Puffer und Reaktionsbedingungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers eingehalten.

4.1.2.2 RNA-Polymerasen

Folgende RNA-Polymerasen wurden für die *in vitro* Transkription verwendet:

Tab. 1: RNA-Polymerasen

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
SP6-RNA-Polymerase	10 810 274 001	Roche
T7-RNA-Polymerase	10 881 767 001	Roche
T3-RNA-Polymerase	11 031 163 001	Roche

4.1.2.3 Weitere Enzyme

Soweit nicht anders angegeben wurden die Reaktionsbedingungen entsprechend der Empfehlungen der Hersteller eingehalten.

Tab. 2: Weitere Enzyme

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
DNase RQ1 RNase-frei (1000 U)	M6101	Promega
T4 DNA-Ligase	15224017	Invitrogen

4.1.3 Bakterien

Für die Transformation von Plasmiden wurden entsprechend der Anwendung die folgenden kommerziell erhältlichen Bakterienstämme verwendet.

Tab. 3: Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Transformations-effizienz [cfu/μg]	Quelle/Firma
One Shot® TOP10 chemokompetente Bakterien (C4040-03)	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG λ-</i>	1 x 10 ⁹	Invitrogen
NEB Express Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency) (C2523I)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	0,6-1 x 10 ⁹	NEB

4.1.4 Oligonukleotid-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden mit dem Programm "Primer-BLAST" von NCBI konstruiert und mit dem "Oligonucleotide Properties Calculator" überprüft.

Die Synthese der Primer wurde von Eurofins MWG Biotech oder Sigma durchgeführt. Die Sequenzen der verschiedenen Primer sind im Anhang aufgestellt (7.9).

4.1.5 Vektoren

Die im Laufe dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Die dazugehörigen Vektorkarten befinden sich im Anhang (7.6 Vektorkarten).

Tab. 4: Vektoren

Vektor	Quelle	Zweck
pCR8®/GW/Topo	Qiagen	Herstellung eines Subklons
pCR®/XL/Topo	Qiagen	Herstellung eines Subklons
pGW-attB-lacZ	(Hoffmann, 2011)	Herstellung von Gateway lacZ-Enhancer-Reporter Konstrukten
pBluescript(BS)-SK-	BDGP	Synthese von RNA-Sonden für ISH
pFLC-1	BDGP	Synthese von RNA-Sonden für ISH
pOTB7	BDGP	Synthese von RNA-Sonden für ISH
pOT2	BDGP	Synthese von RNA-Sonden für ISH

4.1.6 Kits

Tab. 5: Kits

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
DIG Luminescent Detection Kit	11 363 514 910	Roche
Fast SYBR® Green Master Mix (2x)	4385612	Applied Biosystems
Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix	11791-020	Invitrogen
GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit	NA0160-1KT	Sigma

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit	PLD35-1KT	Sigma
High Pure PCR Product Purification Kit	11 732 668 001	Roche
Hispeed Plasmid Maxi Kit	12663	Qiagen
KAPAHIFI PCR Kit	07-KK2100-02	peqlab
LongRange PCR Kit	206402	Qiagen
pCR8®/GW/Topo® TA Cloning® Kit	K2500-20	Invitrogen
QIAprep Spin Miniprep Kit	27106	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	205311	Qiagen
QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	200521	Stratagene
RNeasy Plus Mini Kit	74134	Qiagen
Taq DNA Polymerase Kit	201205	Qiagen
Topo® XL PCR Cloning Kit	K4750-20	Invitrogen
TSA™ Cyanine 5 System	NEL705A001KT	Perkin Elmer

4.1.7 Lösungen und Puffer

4.1.7.1 X-Gal Färbung

10x PBS	1,3M NaCl; 0,07M Na ₂ HPO ₄ ; 0,03M NaH ₂ PO ₄ mit H ₂ O dd 1:10 verdünnen
Fixierlösung	1ml 0,1M Nacacodylat (pH 7.3) + 0,75% (15µl) Glutaraldehyd mischen, vortexen
Färbelösung	1,5ml 50mM K ₄ (FeII(CN) ₆); 1,5ml 50mM K ₃ (FeIII(CN) ₆); 5ml 10x PBS; 42ml ddH ₂ O; 50µl 1M MgCl ₂
X-Gal (8%)	800mg in 10ml DMF
Glycerol (50% und 70%)	Glycerin in 1x PBS verdünnt

4.1.7.2 X-Gal Färbung an Flügeln pharat adulter Fliegen

Ringer-Lösung (1x)	3mM CaCl ₂ ·2H ₂ O; 182mM KCl; 46mM NaCl; 10mM Tris; mit HCl auf pH 7.2 einstellen; sterilfiltrieren und autoklavieren
--------------------	--

4.1.7.3 Fluoreszente Antikörperfärbung an L3-Larven

4% Paraformaldehyd (PFA)	4g PFA werden in 80ml H ₂ O dd auf 80°C auf dem Magnetrührer erhitzt, dann werden 3 Tropfen 1M NaOH zugeben. Nach dem Abkühlen werden 10ml 10x PBS zugesetzt und der pH-Wert auf 7.2 eingestellt. Mit H ₂ O dd wird auf 100ml aufgefüllt.
--------------------------	---

PBT (1% BSA)	0,3% Triton-X-100; 1% BSA; 0,02% NaN_3 ; mit 1x PBS auffüllen
PBT(2,5% BSA)	0,3% Triton-X-100; 2,5% BSA; 0,02% NaN_3 ; mit 1x PBS auffüllen
Vectashield Mounting Medium	von Vector; mit oder ohne DAPI; mit 70% Glycerol (in 1x PBS) 1:1 verdünnen

4.1.7.4 *In situ* Hybridisierung

DIG RNA Labeling Mix	11 277 073 910, Roche
RiboLock RNase Inhibitor	60 0381, Thermo Scientific
H ₂ O-DEPC (1l)	1l H ₂ O; 1ml DEPC; ÜN rühren, dann autoklavieren
20x SSC-DEPC (1l)	0,3M tri-Natriumcitrat; 3M NaCl; 1ml DEPC
10x PBS-DEPC (1l)	1,3M NaCl 5 ml; 0,07M Na ₂ HPO ₄ ; 0,03M NaH ₂ PO ₄ ; 1ml DEPC
PBTween (50ml)	10x PBS-DEPC; 45ml H ₂ O-DEPC; 50µl Tween 20
Hybridisierungspuffer A (5ml)	2,5ml Formamid; 1,25ml 20xSSC-DEPC; 100µl ssDNA (10mg/ml); 25µl tRNA; (10mg/ml); 2,5µl Heparin (100mg/ml); 1,12ml H ₂ O-DEPC
Hybridisierungspuffer B (50ml)	25ml Formamid; 12,5ml 20x SSC-DEPC; 12,5ml H ₂ O-DEPC; 0,1% Tween 20
AP-Puffer (100ml)	2ml 5M NaCl; 5ml 1M MgCl ₂ ; 10ml 1M Tris; 0,1ml Tween 20; 82,9ml H ₂ O-DEPC, pH 9.5
NBT/BCIP Ready-to-Use Tablets (Roche)	1 Tablette in 10ml DEPC-H ₂ O lösen
Glycerol	70% Glycerin in 1x PBS

4.1.7.5 Gelelektrophorese

5x Stop/Lade-Puffer	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 ₂ EDTA auf 2 L mit dH ₂ O auffüllen
Ethidiumbromid-Färbelösung	8-10 Tropfen wässriger Ethidiumbromidlösung (1mg/ml) pro 500ml dH ₂ O

4.1.7.6 ChIP-on-Chip

Die benutzten Materialien sind auf der FlyChip-Homepage (<http://www.flychip.org.uk/protocols/>) zu finden. Folgende Protokolle wurden verwendet:

- *ChIP for fly genomic DNA using Nimblegen arrays*
- *Nimblegen Processing of ChIP or DamID DNA on 2.1M Arrays*

4.1.8 Antikörper

Tab. 6: Primäre Antikörper

1° Antikörper	Spezies	Verdünnung	Quelle	Zweck
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	/	1:200	Molecular Probes™	Phalloidin
anti-β-Gal	Huhn	1:1000	abcam (ab9361)	IHC
anti β- Gal (10 mg/ml)	Kaninchen	5 µg/µl	abcam (ab616)	ChIP-chip
anti-DIG-AP	Schaf	1:1000	Roche (#11093274910)	ISH
anti-Fas2	Maus	1:10	DSHB	IHC
anti-Msh	Kaninchen	1:500	AG Urbach	IHC
anti-Omb (Xanthippe) (50 µg/µl)	Kaninchen	1:1000 (IHC) 1:20 (ChIP-chip)	GOP	IHC ChIP-chip
anti-Omb (7)	Maus	1:1000	GOP	IHC
anti-Ptc	Maus	1:5	GOP	IHC

DSHB: The Developmental Studies Hybridoma Bank

ISH: *in situ*-Hybridisierung

IHC: Immunhistochemische Färbung

GOP: Prof. Gert O. Pflugfelder, Mainz

Tab. 7: Sekundäre Antikörper

2° Antikörper	Spezies	Verdünnung	Quelle	Zweck
anti-Kaninchen-Alexa568	Ziege	1:500	Thermo Fisher Scientific	anti-Msh
anti-Maus-Alexa488	Esel	1:500	Thermo Fisher Scientific	anti-Omb (7)
anti-Kaninchen-DyLight405	Esel	1:250	Jackson ImmunoResearch	anti-Omb
anti-Maus-Alexa647	Esel	1:500	Thermo Fisher Scientific	anti-Fas2/Ptc
anti-Huhn-FITC	Esel	1:250	Thermo Fisher Scientific	anti-β-Gal

4.1.9 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

4.1.9.1 Generelle Verbrauchsmaterialien

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

4.1.9.2 Materialien für die qPCR

Tab. 8: Materialien für die qPCR

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
FastSYBR® Green Master Mix	4385612	Applied Biosystems
MicroAmp® Fast Optical 96-well Reaction Plate	4346906	Applied Biosystems
MicroAmp Optical Adhesive Film	4311971	Applied Biosystems
QIASHredder	79654	Qiagen

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
SafeSeal-Tips professional 10µl	770005	Biozym
SafeSeal-Tips professional 200µl	770200	Biozym
Water, nuclease-free	R0582	Thermo Scientific

4.1.9.3 Laborgeräte

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

4.1.9.4 PCR-Gerät

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

4.1.9.5 Gelkammern für Elektrophorese

Elektro 4	Hybaid
Sub Cell® GT	Bio-Rad

4.1.9.6 Gel-Dokumentationssystem

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

4.1.9.7 Pipetten

Labmate 100 - 1000 µl	Abimed
Labmate 10 - 100 µl	Abimed
Labmate 0,5 - 10 µl	Abimed
Pipette 0,5 - 10 µl	Eppendorf

4.1.9.8 Zentrifugen

Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Centrifuge 5424	Eppendorf
Rotina 35	Hettich

4.1.9.9 Binokulare und Mikroskope

Binokular	Leica L2
Fluoreszenzbinokular	Leica MZFLIII
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX50WI
Lichtmikroskop	Axioplan 2 imaging, Zeiss
Kamera	Axiocam, Zeiss
LSM	Leica TCS SP5 2

4.1.9.10 Sonstige Geräte

StepOnePlus™	Applied Biosystems
--------------	--------------------

4.1.10 Verwendete Computerprogramme

Kamera-Software	Axio Vision Release 4.8.2
Illustrator CS5	Adobe
Photoshop CS5	Adobe
LAS AF Lite	Leica
Integrated Genome Browser	Affymetrix, Version 8.3.4 (Genom von April_2006)
Step One Software v 2.3	Applied Biosystems
Finch TV	Geospiza
Nucleotide BLAST	NCBI
Genome Browser (Apr. 2006/BDGP R5/dm3)	UCSC (University of California, Santa Cruz)
Flybase	FB2012_06, r5.48
Statistica 13	StatSoft Europe
CorelDRAW X8	COREL™

4.1.11 Fliegenstämme

Tab. 9: Fliegenstämme

Die Fliegenstämme sind nach der Stamm-Nr. der jeweiligen Quelle (GOP, BDSC, Janelia, VDRC) geordnet.

Stamm-Nr.	Bezeichnung	Genotyp	Zweck	Quelle
255 (GOP)	<i>UAS-omb</i> 4-15	$w^{1118}; P[w^+ UAS-omb]4-15$ (II)	Omb-GOF	GOP
256 (GOP)	<i>UAS-omb</i> 2-17	$w^{1118}; P[w^+ UAS-omb] 2-17$ (III)	Omb-GOF	GOP
304 (GOP)	<i>bifid</i>	$w; omb^{bi}$	Omb-Allel	GOP
568 (GOP)	<i>omb</i> ¹⁵	$omb^{15}/FM-GFP$	Omb-Mutante	GOP
577 (GOP)	<i>dpp-Gal4/TM6, Tb</i>	$w; dpp-Gal4/TM6, Tb$	Treiber für <i>omb</i> -LOF/GOF	GOP
957 (GOP)	<i>hh-RNAi</i>	$y[1] sc[*] v[1]; P\{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.HMS00492\}attP2/TM3, Sb[1]$	Funktionstest	GOP
965 (GOP)	<i>l(1)omb</i> ³¹⁹⁸	$l(1)omb^{3198}/FM-GFP$	Omb-Nullmutante	GOP
1004 (GOP)	<i>UAS-ombRNAi</i>	$w; UAS-ombRNAi/CyO$	Omb-LOF	GOP
1007 (GOP)	<i>UAS-ombRNAi</i>	$w; UAS-ombRNAi$ (III)	Omb-LOF	GOP
(GOP)	<i>Drop1.7-Gal4</i>	$Drop1.7-Gal4/CyO$	Analyse der embryonalen Expression	GOP/ Christian Gadowski
(GOP)	<i>Drop4.8-Gal4</i>	$Drop1.7-Gal4/CyO$	Analyse der embryonalen Expression	GOP/ Christian Gadowski
/	w^{1118}	w^{1118}/w^{1118}	Kreuzung mit Transformanten	Olaf Vef
1016	<i>en-Gal4</i>	$w/w; en>GFP/en>GFP$	Treiber für <i>omb</i> -LOF/GOF	Olaf Vef
1017	<i>en-Gal4</i>	$w/w; en>GFP/en>GFP$	Treiber für <i>omb</i> -LOF/GOF	Olaf Vef
5397	<i>UAS-dally</i>	$w[*] P\{w[+mc]=UAS-dally.J\}SJ1$	Funktionstest	BDSC
15899	<i>shf-EP</i>	$y^1 w^{67c23} P\{EPgy2\}shf^{EY03173}/FM7c, sn^+$	Funktionstest	BDSC
17003	<i>boi-EP</i>	$P\{EP\}boi^{EP1385} w^{1118}$	Funktionstest	BDSC
19963	<i>boi-EP</i>	$y^1 P\{EPgy2\}boi^{EY09847} w^{67c23}$	Funktionstest	BDSC
24483	Landing Line	$y^1 M\{vas-int.Dm\}ZH-2A w^+; M\{3xP3-RFP.attP\}ZH-51D$	Injektionslinie (chromosomale Lokalisation: 2R, 51D)	BDSC (Henry Sun, Taiwan)

Stamm-Nr.	Bezeichnung	Genotyp	Zweck	Quelle
24484	Landing Line	y ¹ M{vas-int.Dm}ZH-2A w*, M{3xP3-RFP.attP}ZH-58A	Injektionslinie (chromosomale Lokalisation: 2R , 58A3)	BDSC (Rainbow Transgenic Flies, Inc.)
25709	Landing Line	y ¹ v ¹ P{nos-phiC31\int.NLS}X; P{CaryP}attP40	Injektionslinie (chromosomale Lokalisation: 2L , 25C6)	BDSC (Joachim Urban)
28747	<i>dally-RNAi</i>	y ¹ v ¹ ; P{TRiP.JF03175}attP2	Funktionstest	BDSC
30154	<i>disp-EP</i>	w ¹¹¹⁸ ; P{EP}disp ^{G5372} /TM6C, Sb ¹	Funktionstest	BDSC
32582	<i>boi-EP</i>	P{EP}boi ^{G656} z ^{G656} w*	Funktionstest	BDSC
33541	<i>Flo-2-EP</i>	w* P{EP}Flo2 ^{G1271}	Funktionstest	BDSC
34089	<i>dlp-RNAi</i>	y ¹ sc* v ¹ ; P{TRiP.HMS00875}attP2	Funktionstest	BDSC
34091	<i>dlp-RNAi</i>	y ¹ sc* v ¹ ; P{TRiP.HMS00903}attP2	Funktionstest	BDSC
39447	<i>e-Gal4</i> (Linie 1)	w ¹¹¹⁸ ; P{y[+t7.7] w[+mC]=GMR67F01-GAL4}attP2	Analyse der Expression in Flügelscheiben	Janelia/BDSC
41298	<i>e-Gal4</i> (Linie 2)	w ¹¹¹⁸ ; P{y[+t7.7] w[+mC]=GMR67C05-GAL4}attP2	Analyse der Expression in Flügelscheiben	Janelia/BDSC
46444	<i>e-Gal4</i> (Linie 3)	w ¹¹¹⁸ ; P{y[+t7.7] w[+mC]=GMR60H08-GAL4}attP2	Analyse der Expression in Flügelscheiben	Janelia/BDSC
3060	<i>boi-RNAi</i>	w ¹¹¹⁸ ; P{GD2556}v3060	Funktionstest	VDRC
29593	<i>boi-RNAi</i>	w ¹¹¹⁸ ; P{GD14979}v29593	Funktionstest	VDRC
105890	<i>shf-RNAi</i>	P{KK103848}VIE-260B	Funktionstest	VDRC
201784	<i>y-Gal4</i> (Linie 6)	P{VT054795-GAL4}attP2	Analyse der Expression in Flügelscheiben	VDRC
200409	<i>y-Gal4</i> (Linie 2)	P{VT054791-GAL4}attP2	Analyse der Expression in Flügelscheiben	VDRC
200410	<i>y-Gal4</i> (Linie 3)	P{VT054792-GAL4}attP2	Analyse der Expression in Flügelscheiben	VDRC
200411	<i>y-Gal4</i> (Linie 4)	P{VT054793-GAL4}attP2	Analyse der Expression in Flügelscheiben	VDRC
213804	<i>y-Gal4</i> (Linie 1)	P{VT054789-GAL4}attP2	Analyse der Expression in Flügelscheiben	VDRC
213805	<i>y-Gal4</i> (Linie 5)	P{VT054794-GAL4}attP2	Analyse der Expression in Flügelscheiben	VDRC

BDSC: Bloomington *Drosophila* Stock Center, Indiana, USA

VDRC: Vienna *Drosophila* Resource Center, Wien, Österreich

GOP: Prof. Gert O. Pflugfelder, Mainz

Tab. 10: Enhancer-Reporter Fliegenstämme (basierend auf selbst hergestellten Konstrukten)

Bezeichnung	Genotyp	Zweck	Injektionslinie*	Insertionsort*
<i>al[5,2kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>al[5,2kb]TBEmut-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	25709	2L, 25C6
<i>ap[1,2kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24483	2R, 51D
<i>ap[3,2kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>ap[3,2kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24483	2R, 51D
<i>ap[3,2kb]TBEmut-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24483	2R, 51D
<i>BH1[5kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>brk[1,6kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>Cad74A[1,4kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>crc[2,1kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>Cyp310a1[2,7kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	25709	2L, 25C6
<i>dve[3kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>fz3[2,5kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	25709	2L, 25C6
<i>midH15[4,1kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	25709	2L, 25C6
<i>rn[4,3kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>Sox15[2,8kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>tty[0,7kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>vvl[2,6kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>wg[3,6kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3
<i>zfh1[2,6kb]-lacZ</i>	<i>w/w; lacZ/lacZ</i>	Enhancer-Reporter-Analyse	24484	2R, 58A3

*genauere Information: siehe Tab. 9

4.2 Methoden der Fliegenarbeit

4.2.1 Fliegenzucht

Die Einhaltung optimaler Zuchtbedingungen ist essentiell für die Nutzung von *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus.

In unserem Institut wird *Drosophila* in Plastikröhrchen auf einem Standardnährboden gehalten. Die Hauptbestandteile sind Maismehl, Sojamehl, Hefeflocken, Malzextrakt, Zuckerrübensirup und Agar. Zur Konservierung und zum Schutz vor Schimmelpilzen werden Propionsäure und Nipagin zugegeben.

Fliegen, die häufig in Verwendung sind, werden bei 25°C und 70% Luftfeuchtigkeit gelagert. Bei diesen Bedingungen dauert der Lebenszyklus von *Drosophila* ungefähr 10 Tage. Stammsammlungen werden im Gegensatz dazu in der Regel bei 18°C gehalten, wodurch sich die Generationszeit auf ca. 20 Tage verlängert.

In Abhängigkeit von der Zuchttemperatur werden die Fliegen alle zwei bis fünf Wochen auf neue Nährböden umgesetzt. Häufiges Umsetzen wirkt der Kontamination durch Milben und Pilze entgegen.

4.2.2 Eiablagen

Um Embryonen verschiedener Stadien für Färbungen zu sammeln, werden Ablageröhrchen vorbereitet. Dafür werden 28g Agar mit 1l Apfelsaft in der Mikrowelle aufgekocht, bis der Agar vollständig gelöst ist. Mithilfe eines Trichters wird der flüssige Agar dann möglichst zügig auf große Plastikröhrchen verteilt, etwa 1-2 cm dick. Zum Abkühlen werden die Röhrchen mit einem Leinentuch abgedeckt, bevor sie zur Lagerung bei 4°C mit den üblichen Schaumstoffstopfen verschlossen werden.

Vor einer geplanten Färbung wurde der jeweilige Fliegenstamm 2-3 Tage vorher bereits auf Ablageröhrchen mit ein wenig Trockenhefe angefüttert. Die Fliegen benötigen diesen Zeitraum um sich an die neuen Bedingungen zu gewöhnen und wieder effizient Eier zu legen.

Für die Färbungen wurden in der Regel über Nacht- und über Tag-Ablagen verwendet, die bei 25°C durchgeführt wurden. Die Fixierung erfolgte dann erst gegen Nachmittag, so dass möglichst alle embryonalen Stadien in der Ablage enthalten waren.

4.2.3 Herstellung transgener Fliegenstämme

Zur Untersuchung der potentiellen Enhanceraktivität bestimmter Genabschnitte und deren Omb-Abhängigkeit dienen sogenannte *Enhancer Reporter*-Konstrukte. Diese werden mittels Mikroinjektion in den posterioren Pol des synzytialen Blastoderms des *Drosophila* Embryos

eingbracht. Bei der Zellularisierung gelangt im Optimalfall das Plasmid in die Polzellen und somit in das Genom.

Die Injektionen wurden in von Rainbow Transgenic Flies, Inc., Sebastian Jansen vom Institut für Genetik (Mainz) sowie von der Arbeitsgruppe Herny Sun (Taiwan) durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde zur stabilen Integration in das Genom ausschließlich das phiC31-System verwendet.

4.2.4 Das phiC31-System zur Keimbahntransformation

Das phiC31-System basiert auf der Aktivität der Integrase des Bakteriophagen phiC31, welche die irreversible und hoch effiziente, sequenzspezifische Rekombination zwischen einer bakteriellen Erkennungssequenz (*attB*) und der Erkennungssequenz (*attP*) des Phagen vermittelt. Für die Keimbahntransformation werde daher Plasmide mit einer entsprechenden *attB*-Stelle verwendet, über die das Plasmid an einer definierten *attP*-Stelle in das Genom der entsprechenden Injektionslinie (4.1.11) integriert. Durch diese ortsgenaue Integration können Positionseffekte, die durch zufällige Integration von P-Elementen (*Enhancer Trap*) entstehen können, minimiert werden.

4.2.5 Etablierung transgener Fliegenstämme

Nach der Injektion unter Verwendung des phiC31-Systems erfolgt die Identifizierung der Transformanten über die Augenfarbe bzw. die Verwendung des Markergens *white*, welches auf den Injektionsplasmiden kodiert ist. Der Injektionsstamm ist ebenfalls *white*-positiv (w^+).

Für die Herstellung transgener Fliegenstämme wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Injektionsstämme verwendet (Tab. 9). Die Etablierung eines homozygoten Enhancer-Reporter Stamms wird nachfolgend am Beispiel der Injektionslinie BDSC 25709 dargestellt (Abb. 8).

Von den geschlüpften Fliegen, der sogenannten Generation 0 können nur die Männchen für die weitere Kreuzung mit *white*¹¹¹⁸-Jungfrauen (weißäugig) verwendet werden (Abb. 8). Ebenso von der F1-Generation, bei der die Männchen orangefarbene Augen aufweisen. Hier kann nur das w^+ des Injektionsplasmids die Augenfarbe verursachen. Die weiblichen Nachkommen tragen noch das w^+ Gen von der phiC31-Integrase, wodurch sie tiefrote Augen zeigen und die Anwesenheit des w^+ Gens des Injektionsplasmids nicht zum Tragen kommt.

Die dritte Kreuzung (*inter se*) erfolgt zwischen den für den Enhancer heterozygoten Fliegen, wodurch in der nächsten Generation unter anderem homozygote Tiere schlüpfen, die dann wiederum untereinander zur Etablierung des Enhancer-Reporter Stamms verkreuzt werden. Da diese Fliegen auch homozygot für w^+ sind, weisen sie eine tiefrote Augenfarbe auf.

Injektionslinie: 25709 (BDSC)

$$\frac{x(\{nos - PhiC31\}w^+)}{x \text{ oder } y}; \frac{attP40}{attP40}; \frac{+}{+}$$

1. Kreuzung:

$$\frac{w^-}{w^-}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+} \quad \times \quad \frac{x(\{nos - PhiC31\}w^+)}{y}; \frac{lacZ, w^+}{attP40}; \frac{+}{+}$$

2. Kreuzung:

$$\frac{w^-}{w^-}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+} \quad \times \quad \frac{x(von w^-)}{y}; \frac{lacZ, w^+}{+}; \frac{+}{+}$$

3. Kreuzung:

$$\frac{x(von w^-)}{x(von w^-)}; \frac{lacZ, w^+}{+} \quad \times \quad \frac{x(von w^-)}{y}; \frac{lacZ, w^+}{+}$$

4. Kreuzung:

$$\frac{x}{x}; \frac{lacZ, w^+}{lacZ, w^+} \quad \times \quad \frac{x}{y}; \frac{lacZ, w^+}{lacZ, w^+}$$

Abb. 8: Schema der Kreuzungen zur Etablierung eines homozygoten Enhancer-Reporter Stamms nach der Injektion am Beispiel der Injektionslinie BDSC 25709.

Die Injektionslinie 25709 trägt ein PhiC31-Gen auf dem X-Chromosom und die Insertionsstelle auf dem 2. Chromosom. Die Identifizierung der Transformanten erfolgt über die Augenfarbe bzw. die Verwendung des Markergens *white*, welches auf den Injektionsplasmiden kodiert ist.

Von den geschlüpften Fliegen, der sogenannten Generation 0 können nur die Männchen für die Kreuzung mit *white*¹¹¹⁸-Jungfrauen (weißäugig) verwendet werden. Das gleiche gilt für die Nachkommen der ersten Kreuzung. Die Männchen weisen hier orangefarbene Augen auf. Hier kann nur das *w*⁺ des Injektionsplasmids die Augenfarbe verursachen. Die dritte Kreuzung (*inter se*) erfolgt zwischen den für den heterozygoten Fliegen, wodurch in der nächsten Generation unter anderem homozygote Tiere schlüpfen, die dann wiederum untereinander zur Etablierung des Enhancer-Reporter Stamms verkreuzt werden. Da diese Fliegen auch homozygot für *w*⁺ sind, weisen sie eine tiefroten Augenfarbe auf.

Um die Abhängigkeit eines Enhancers von Omb festzustellen, wurden die *lacZ*-Enhancer-Reporter Stämme mit *omb*-Nullmutanten verkreuzt. Dies wird im Ergebnisteil genau beschrieben (5.3.4).

4.2.6 Verwendung des Gal4/UAS-Systems zur Analyse von *omb loss-of-function* und *omb gain-of-function* Effekten

Das 1993 von Brand und Perrimon (Brand und Perrimon, 1993) entwickelte Gal4/UAS-System ist eine mittlerweile etablierte und stetig weiterentwickelte Technik, mit deren Hilfe die ektopische Expression einer Zielsequenz in einem bestimmten Gewebe und somit die Analyse von Genfunktionen ermöglicht wird.

Das System basiert auf der transkriptionellen Regulation in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und besteht aus zwei Komponenten. Zum einen dem Transkriptionsfaktor Gal4, welcher für die Regulation des Galaktose-Stoffwechsels verantwortlich ist und zum anderen dessen Zielsequenz, der *upstream activation sequence* (UAS) (Phelps und Brand, 1998). Um das System in *Drosophila* nutzbar zu machen, benötigt man eine sogenannte Treiber-Linie, die Gal4 in einem bekannten

räumlichen Muster exprimiert und eine Reporter-gen-Linie, in der die Expression eines Reportergens (z.B. *lacZ*) von der Bindung der UAS-Sequenzen durch den Transkriptionsfaktor Gal4 abhängig ist (Abb. 9). Die Expression kann mittels X-Gal-Färbung oder einer Antikörperfärbung gegen die β -Galactosidase nachgewiesen werden.

Die Kombination von Gal4-Linien wie *en*-Gal4 oder *dpp*-Gal4 mit UAS-*ombRNAi* oder UAS-*omb* wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Effekte von ektoischem Omb (*gain-of-function*) oder der Reduktion von Omb (*loss-of-function*) auf die Expression bestimmter Gene zu untersuchen.

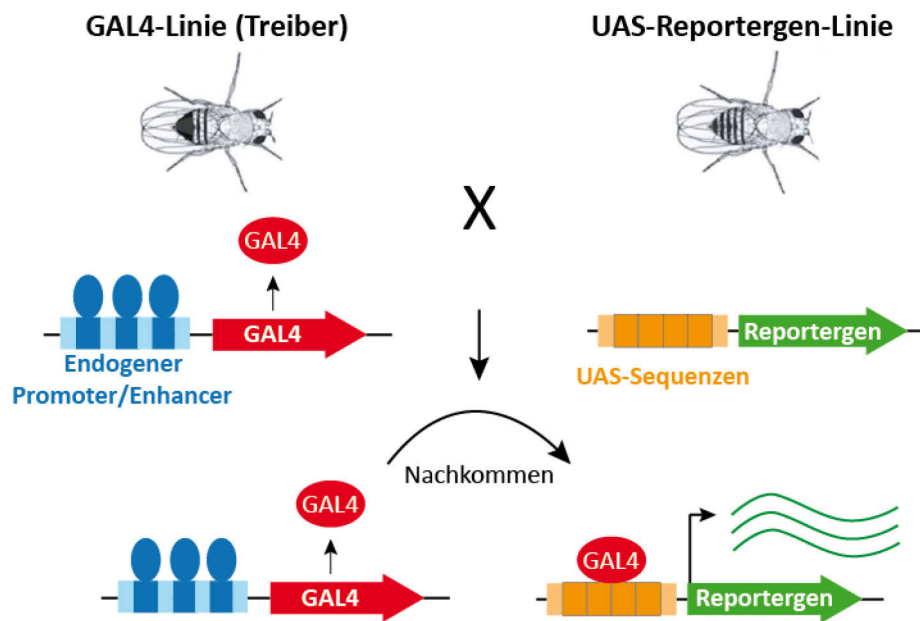


Abb. 9: Das GAL4-/UAS-System (verändert nach (Elliott und Brand, 2008).

Um das System in *Drosophila* nutzbar zu machen, wird eine Treiber-Linie benötigt, die Gal4 (rot) in einem bekannten räumlichen Muster exprimiert und eine Reporter-gen-Linie, in der die Expression eines Reportergens (grün, z.B. *lacZ*) von der Bindung der UAS-Sequenzen (orange) durch den Transkriptionsfaktor Gal4 abhängig ist. Nach der Kreuzung der beiden Linien kann in den Nachkommen die Expression des Reportergens in einem gewebespezifischen Muster mittels X-Gal-Färbung oder einer Antikörperfärbung gegen die β -Galactosidase nachgewiesen werden.

4.3 Histologische Methoden

4.3.1 Präparation von *Drosophila* L3-Larven

In dieser Arbeit wurden verschiedene Färbemethoden an Imaginalscheiben von *Drosophila* L3-Wanderlarven durchgeführt. In der Regel wurden die Larven in gekühltem 1x PBS in einem Blockschälchen nach Weibchen und Männchen sortiert.

Die Imaginalscheiben von Interesse (Auge/Antenne, Beine, Flügel) befinden sich ausschließlich in der anterioren Hälfte der Larve. Daher wird zunächst mit zwei Pinzetten der hintere Teil der Larve abgetrennt. Das Umstülpen der Larve erfolgt mit einer Pinzette durch Eindrücken des Gewebes im Bereich der Mundwerkzeuge, während mit der zweiten Pinzette der Körper über die vordere Pinzette geschoben wird.

Besonders bei *in situ* Hybridisierungen und Antikörperfärbungen ist es wichtig, dass die Sonde bzw. der Antikörper ungehindert in das Gewebe der Imaginalscheiben eindringen kann. Daher wird zusätzlich überflüssiges Gewebe wie Fett und Darm vorsichtig entfernt. Nachdem genug Larven gesammelt und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit 1xPBS überführt wurden, erfolgte stets die Fixierung.

4.3.2 X-Gal Färbung

Mithilfe der X-Gal Färbung können *Enhancer-Reporter* oder *Enhancer-Trap* Linien, welche das *lacZ*-Gen tragen, hinsichtlich ihrer Reportergen-Expression untersucht werden. Das *lacZ*-Gen aus *Escherichia coli* kodiert für das Enzym β -Galactosidase, welches natürlicherweise das Disaccharid Lactose abbaut. Es kann jedoch auch das chromogene Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid) spalten, wodurch letztlich ein blauer Indigofarbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) entsteht, der sich dann im Gewebe niederschlägt.

4.3.2.1 X-Gal Färbung an L3-Larven

Nach der Präparation (4.3.1 Präparation von *Drosophila* L3-Larven) werden die L3-Larven 15 min auf dem Schüttler in 0,1M Nacacodylat (pH 7.3) und 0,75% Glutaraldehyd fixiert. Während die Larven danach dreimal je 5 min mit 1x PBS gewaschen werden, kann die Färbelösung vorbereitet werden. Dafür werden 580 μ l Färbelösung (4.1.7.1 X-Gal Färbung) und 20 μ l 8%iges X-Gal miteinander gemischt, 5-10 min auf 37°C erwärmt und anschließend bis zur Verwendung (mind. 5 min) bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Hierdurch werden Pigmentkristalle abgesetzt, die sich ansonsten im Gewebe einlagern. Die Färbelösung wird nach den drei Waschrissen auf die Larven gegeben. Die Färbung erfolgt so lange im Dunkeln bis eine deutliche Blaufärbung des Gewebes zu erkennen ist. Dies kann je nach Linien zwischen 2 und 20 Stunden variieren.

Zum Abstoppen der Färbereaktion werden die Larven wieder dreimal je 5 min mit 1x PBS gewaschen. Zur Aufbewahrung wird das PBS gegen 50%iges Glycerol ausgetauscht, welches nach 1 bis 3 Stunden wieder durch 70%iges Glycerol ersetzt wird. Die Larven werden dann bis zur Präparation bei 4°C aufbewahrt.

4.3.2.2 X-Gal Färbung an Flügeln pharat adulter Fliegen

Die X-Gal Färbung an pharat adulten Tieren erfolgt in ähnlicher Weise wie die Färbung an L3-Larven (Wolfgang *et al.*, 1996). Die pharat adulten Tiere müssen vor der Fixierung jedoch zunächst aus der Puppe befreit werden. Auch die dünne pupale Cuticula muss mithilfe von sehr feinen Pinzetten entfernt werden, zu mindestens von den Flügeln. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Flügel nicht beschädigt werden. Diese Präparation erfolgt in 1x PBS. Dann werden die Fliegen in ein Blockschälchen mit 1x Ringer-Lösung überführt, welche 4-fach mit ddH₂O verdünnt wird, bis sich die Flügel entfalten (2-3 min). Die Fixierung erfolgt dann in 1% Glutaraldehyd in PBS für 15 min.

4.3.3 Fluoreszente Antikörperfärbung an Embryonen

Zur Entfernung des Chorions, der äußersten Eihülle, werden die Embryonen in den Ablagerörchen für 2 min mit 6%iger Chlorbleichlauge überschichtet. Dechorionisierte Embryonen treiben an der Oberfläche und werden mit reichlich Wasser in die Embryonennetze gespült. Mit einem Skalpell werden die Embryonen von den Netzen abgeschabt und in das vorbereitete Fixativ, bestehend aus PEMS, Formaldehyd und Heptan, überführt. Die Embryonen werden 25 min bei RT auf dem Schüttler fixiert. Dabei sammeln sich die Embryonen an der Phasengrenze zwischen Heptan und PEMS. Die untere Phase (PEMS) wird nach der Fixierung abgezogen. Dann werden 500µl Methanol zugegeben und 2 min gevortext. Dabei platzt die bereits poröse Vitellinmembran, die zweite Eihülle ab. Devitellinisierte Embryonen sinken zu Boden.

Der Vorgang wird zweimal mit einer Minute vortexen wiederholt. Zum Schluss werden beide Phasen abgezogen und Methanol zugegeben. Die Embryonen können so bei -20°C aufbewahrt werden.

Eine Ausnahme bilden Stämme mit endogenem GFP. Diese werden in Ethanol gelagert, da Methanol GFP zerstört.

Für die Antikörperfärbung werden die Embryonen zunächst wieder in ein wässriges Milieu überführt. Dafür werden sie viermal mit 0,3% PBT gespült und viermal 10 min auf dem Schüttler gewaschen. Zwischendurch wird das PBT immer wieder gewechselt. Der primäre Antikörper wird dann auf die Embryonen gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wird der primäre AK abgezogen und bei 4°C aufbewahrt. Die Embryonen werden wieder viermal mit 0,3% PBT gespült und viermal 10 min gewaschen. Dann erfolgt die Zugabe des

sekundären Antikörpers. Dieser inkubiert je nach Antikörper für 30 min bis 2 Stunden auf dem Schüttler. Abschließend werden die Embryonen nochmals viermal mit 0,3% PBT gespült und viermal 10 min gewaschen, dann noch einmal mit 1x PBS gespült und in Vectashield/70% Glycerol (1:1) eingebettet.

Um das Nervensystem der Embryonen zu analysieren wurden sogenannte Filet-Präparate hergestellt. Dafür werden die Embryonen geöffnet und von Darm und Fett befreit, so dass am Schluss das Zentrale und das Periphere Nervensystem freigelegt sind.

4.3.4 Fluoreszente Antikörperfärbung an L3-Larven

Nach der Präparation werden die Larven 40 min bei RT in 4% PFA auf dem Schüttler fixiert. Danach wird die Fixierlösung durch viermaliges Spülen mit PBT (1% BSA) entfernt. Im Anschluss an einen einstündigen Waschriff in PBT (2,5% BSA) erfolgt die Zugabe des primären (1°), in PBT verdünnten Antikörpers (AK). Dieser wird nun über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wird ungebundener Antikörper durch dreimaliges Spülen und eine Stunde waschen mit PBT aus dem Gewebe entfernt. Der sekundäre (2°) AK ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und bindet an den primären. Er wird in PBT (2,5% BSA) verdünnt auf die Larven gegeben und je nach Antikörper 30 bis 120 min bei RT inkubiert. Die Alexa Fluor-Farbstoffe benötigen nur eine relativ kurze Inkubationszeit (30 min), da ansonsten der Hintergrund zu hoch wird. DyLight-Farbstoffe sowie Cy3, Cy5, FITC und TRITC wurden je 2 Stunden inkubiert. Zum Schluss wird wieder dreimal mit PBT gespült und 1 Stunde gewaschen. Danach werden die Larven in Vectashield/70% Glycerol (1:1) aufgenommen und bei 4°C gelagert.

4.3.5 Phalloidin-färbung an L3-Larven

Phalloidin stammt aus einer Familie von Toxinen, die aus dem Grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) isoliert werden. In der Histologie wird Phalloidin zur selektiven Färbung von F-Actin in fixierten Zellen verwendet.

Um die Faltenbildung in L3-Flügelimaginalscheiben darzustellen, wurde eine Actinfärbung mit TexasRed-Phalloidin durchgeführt. Da diese in Kombination mit anderen Antikörperfärbungen erfolgt, ist der Phalloidinschritt nur eine Erweiterung des Protokolls der Antikörperfärbung (4.3.4). Nachdem der 2° Antikörper abgenommen und 1 Stunde mit PBT gewaschen wurde, wird die TR-Phalloidin-Färbelösung (1:200 in PBT mit 2,5% BSA) auf die Larven gegeben. Die Färbereaktion erfolgt im Dunkeln für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Im Anschluss wird 4x mit PBT gespült und 1 Stunde mit PBT gewaschen, bevor die Larven zur Lagerung in Vectashield/70% Glycerol (1:1) aufgenommen werden.

4.3.6 *In situ* Hybridisierung (sichtbar) an L3-Larven

Die *in situ* Hybridisierung (ISH) ist eine Methode, mit der sich Nukleinsäuren mittels einer künstlich hergestellten Sonde direkt im Gewebe (*in situ*) nachweisen lassen.

Die Herstellung der antisense RNA- Sonde erfolgt durch die *in vitro* Transkription (4.4.14). Dabei werden unter anderem DIG-markierte UTPs in die RNA eingebaut, wodurch später der Nachweis im Gewebe ermöglicht wird. Nach der Hybridisierung der Sonde an die komplementäre *mRNA* erfolgt indirekt die Detektion über einen anti-DIG-Antikörper. Dieser ist an eine Alkalische Phosphatase gekoppelt, die als Substrat BCIP und NBT zu einem blauvioletten Präzipitat umsetzt. Somit kann letztlich die spezifische *mRNA*- Verteilung im Gewebe unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Am ersten Tag werden die Larven nach der Präparation und der 20-minütigen Fixierung in 4% PFA zweimal je 5 min in PBTween gewaschen sowie einmal 5 min in DEPC-H₂O. Nach einer 1-stündigen Inkubation in 1ml TEA-Puffer und 2,5 µl Essigsäureanhydrid erfolgen zwei weitere Waschschrte à 5 min in PBTween.

Die weiteren Schritte werden ohne Schütteln durchgeführt. Zunächst wird 5 min in PBTween/Hybridisierungspuffer B (Hyb B) 1:1 gewaschen, danach nur im Hyb B. Die Prähybridisierung erfolgt 4 Stunden bei 65°C in Hybridisierungspuffer A (Hyb A). Dabei werden unspezifische Bindungsstellen im Gewebe abgedeckt. Die DIG-markierte Sonde wird 2 Minuten bei 100°C denaturiert, sofort auf Eis gestellt, dann zu den Larven gegeben und hybridisiert über Nacht bei 65°C. Die Verdünnung der Sonden erfolgt mit Hyb A.

Am nächsten Tag wird die Sonde abpipettiert und bei -20°C aufbewahrt. Bei 65°C werden die Larven nacheinander jeweils 15 min in vorgewärmtem Hyb B, Hyb B/25% 2x SSC, Hyb B/ 50% 2x SSC, Hyb B/75% 2x SSC und 2x SSC inkubiert sowie zweimal 20 min in 0,2 x SSC.

Die nachfolgenden Schritte erfolgen wieder bei Raumtemperatur mit Schütteln. Jeweils 10 min werden die Larven in 0,2x SSC/25% PBTween, 0,2x SSC/ 50% PBTween, 0,2x SSC/ 75% PBTween und in PBTween gewaschen. Die Waschschrte dienen insgesamt der Entfernung von Sonden, die nicht spezifisch gebunden wurden. Im Anschluss wird der AP-gekoppelte anti-DIG-Antikörper (1:1000 in PBTween) zugegeben. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur werden die Larven dreimal mit PBTween gespült. Danach erfolgen vier 10-minütige Waschschrte in PBTween sowie zwei 5-minütige in AP-Puffer.

Abschließend werden die Larven in die NBT/BCIP-Färbelösung überführt. Die Färbung wird unter dem Binokular bis zum Erreichen einer optimalen Intensität beobachtet. Zum Abstoppen der Färbereaktion wird dreimal mit PBTween gespült und 10 min in Methanol gewaschen. Nach wiederum dreimaligem Spülen in PBTween werden die Larven einmal mit 1x PBS gespült und

anschließend in 70% Glycerol eingebettet. Bis zur Präparation der Imaginalscheiben lagert man die Larven bei 4°C.

4.3.7 Mikroskopie

Die fluoreszenten Antikörperfärbungen an Embryonen wurden jeweils als Maximumprojektionen mit einer 63x-Vergrößerung am Laser Scanning Microscope Leica TCS SP5 2 aufgenommen, L3-Imaginalscheiben mit einer 20x-Vergrößerung. Die Analyse der Aufnahmen wurden mit Hilfe der Software LAS AF Lite von Leica durchgeführt.

Präparate von sichtbaren Färbungen der L3-Imaginalscheiben wurden stets mit einer 10x-Vergrößerung am Lichtmikroskop Axioplan 2 imaging von Zeiss dokumentiert.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode zur Auftrennung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld und zur Bestimmung der Fragmentgrößen im Vergleich mit einem Standard. Für die Auftrennung von Fragmenten mit einer Länge von 0,1 bis 20 kb werden Gele mit einem Agaroseanteil von 0,6 bis 2% verwendet. Kleinere Fragmente werden in der Regel mit Hilfe von Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

Die Agarose bildet entsprechend ihrer Konzentration unterschiedlich große Poren aus. Durch diese wandern die DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen Richtung Anode. Zum Lösen der Agarose wird 1x TBE-Puffer verwendet, der gleichzeitig als Laufpuffer dient. Vor dem Auftragen auf das Gel wird den Proben ein Ladepuffer zugesetzt. Durch das SDS im Ladepuffer werden Proteine besser denaturiert. Anhand der Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau im Ladepuffer kann die Wanderung der DNA im Gel verfolgt werden. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von etwa 90V-120V.

Nach Beendigung der Elektrophorese können die DNA-Banden mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid gefärbt und im UV-Licht durch die orangefarbene Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Die Fragmentgrößen werden anhand eines Größenmarkers (hier: „MassRuler DNA Ladder Mix“ von Fermentas) bestimmt.

4.4.2 Gelextraktion

Die Agarose-Gelelektrophorese kann sowohl analytische als auch präparative Zwecke verfolgen. Nach der Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem präparativen Gel kann die Bande von Interesse aus dem Gel isoliert werden. Dazu wird sie unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ von Qiagen gereinigt. Dieser Vorgang ist vor allem dann notwendig, wenn möglichst reine Nukleinsäuren für eine direkte Sequenzierung, Ligation und Transformation oder *in vitro* Transkription benötigt werden.

Das Prinzip der Gelextraktion ist die Adsorption der DNA an eine Silica-Membran, wobei eine hohe Salzkonzentration und ein pH-Wert von ≤ 7.5 notwendig sind. Diese Bedingungen werden durch das Auflösen der Gelbande in einem entsprechenden Bindepuffer (Puffer QG) hergestellt. Unerwünschte Bestandteile wie Primer, Enzyme, Nukleotide, Agarose usw. binden nicht an die Membran und werden dementsprechend entfernt. Im Anschluss an die Adsorption werden die Salze mit Hilfe eines ethanolhaltigen Puffers (Puffer PE) herausgewaschen.

Die DNA wird in 30 μ l EB-Puffers aus der Membran eluiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

4.4.3 Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Basensequenzen in der DNA erkennen und den Doppelstrang entweder an dieser Stelle oder in definiertem Abstand dazu schneiden. Die in dieser Arbeit verwendeten Typ II-Enzyme erkennen und schneiden eine palindromische DNA-Sequenz von meist vier bis acht Basenpaaren. Dabei entstehen entweder überhängende oder glatte Enden mit einem freien 5'-Phosphat- und einem freien 3'-Hydroxyl-Ende.

Die optimalen Bedingungen für den jeweiligen Restriktionsverdau wurden gemäß den Angaben des Herstellers gewählt.

Im Folgenden ist ein Restriktionsansatz aufgeführt, wie er in dieser Arbeit standardmäßig verwendet wurde:

1 µl	DNA
2 µl	10x Enzym-Puffer (NEB1-4 bzw. CutSmart)
(2 µl	10x BSA)
0,5 µl	<u>Restriktionsenzym</u>

mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20µl auffüllen.

In manchen Fällen wurde auch ein Doppelverdau, also eine Restriktion mit zwei Enzymen, durchgeführt. Hierzu wurde jeweils ein Puffer verwendet, in dem beide Enzyme nach Angaben des Herstellers eine ausreichend hohe Aktivität aufweisen.

Die Inkubation erfolgt beim jeweiligen Temperaturoptimum des verwendeten Restriktionsenzyms für 90 Minuten. Im Anschluss wird die Reaktion durch Zugabe von 5x Stopp-Puffer abgebrochen. Mit einer Agarose-Gelelektrophorese wird die Vollständigkeit der Restriktion überprüft.

4.4.4 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung ist eine gängige Methode, um DNA-Lösungen von Salzen und Proteinen zu reinigen und so optimale Bedingungen für weitere Enzymreaktionen zu schaffen. Die Fällung erfolgt durch Zugabe von 1/10 Vol. 3M Natriumacetat und dem 2,5-fachen Vol. an Ethanol absolut. Natriumacetat neutralisiert dabei das durch die Phosphatgruppen negativ geladene Rückgrat der DNA-Doppelhelix. Ethanol entzieht daraufhin die Hydrathülle, die DNA verliert ihre Löslichkeit und fällt aus. Die Fällung wird 60 Minuten bei -20°C durchgeführt. Im Anschluss wird die ausgefällte DNA durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C pelletiert. Danach wird das Pellet noch mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, eine Minute zentrifugiert und bei 37°C getrocknet. Die DNA wird zur Aufbewahrung und weiteren Verwendung in EB-Puffer oder ddH₂O gelöst.

4.4.5 Klonierung

4.4.5.1 TA Topo-Klonierung

Das sogenannte "Topo Cloning" ist eine einfache und zeitsparende Variante der Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor. In dieser Arbeit wurden sowohl das „Topo[®] XL PCR Cloning Kit“ als auch das „pCR[®]8/GW/Topo[®] TA Cloning[®] Kit“ von Invitrogen verwendet.

Bei der Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte mittels Taq-Polymerase entstehen PCR-Produkte, welche ein einzelnes Desoxyadenosin (A) am 3'-Ende aufweisen. Der linearisierte Topo-Vektor, der im Kit enthalten ist, besitzt hingegen ein einzelnes überhängendes 3' Desoxythymidin (T) (Abb. 10). Dadurch können die beiden DNA-Moleküle effizient miteinander verknüpft werden. Die Ligation erfolgt in diesem Fall aber nicht über eine T4-DNA-Ligase, sondern über die Topoisomerase I des Vaccinia-Virus. Dieses Enzym bindet spezifisch an einen DNA-Strang und spaltet das Rückgrat der Doppelhelix nach einem 5'-CCCTT. Die Energie der Spaltung wird durch die Entstehung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat-Ende des Vektors und der Topoisomerase I konserviert. Diese Verknüpfung wird durch den Angriff des 5'-Hydroxyl-Endes des PCR-Produktes wieder gelöst, wodurch dieses unter Freisetzung der Topoisomerase in den Vektor hinein ligiert wird. Dieser Vorgang dauert insgesamt nur fünf Minuten.

In der Regel wurde für die PCR-Amplifikation jedoch die KAPA Hifi PCR Polymerase von peqlab verwendet. Diese generiert sogenannte *blunt ends*, d.h. den Amplifikaten fehlen A-Überhänge am 3'-Ende. Hier ist vor der Topo-Klonierung ein A-tailing (0) notwendig.

Im Anschluss wird eine definierte Menge der „Topo Cloning“-Reaktion direkt in chemokompetente Zellen transformiert. Bei Verwendung des pCR[®]8/GW/Topo-Vektors wurden die Rekombinaten auf LB-Platten mit Spectinomycin selektiert, beim pCR[®]-XL-Topo-Vektor auf Platten mit Kanamycin. Die genaue Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Im Gegensatz zu dem pCR[®]-XL-Topo-Vektor kann der pCR[®]8/GW/Topo-Vektor für die sogenannte Gateway-Technologie verwendet werden.

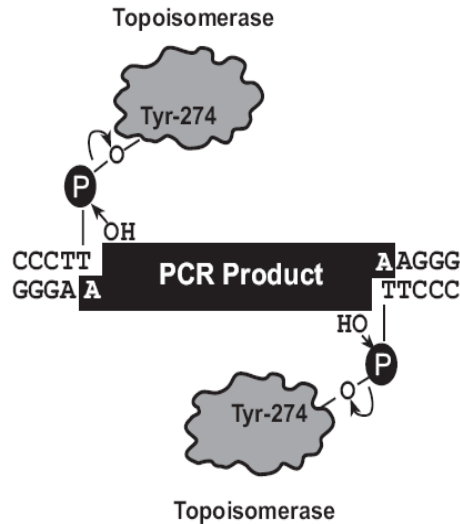


Abb. 10: Das Prinzip der "Topo-Cloning" Reaktion (aus dem pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit User Guide).

Der linearisierte pCR®8/GW/Topo-Vektor verfügt über einzelne 3'-Desoxy-thymidinüberhänge. Diese ermöglichen die Integration von PCR-Produkten mit einem einzelnen Desoxyadenosin am 3'-Ende. Das Enzym Topoisomerase I des Vaccinia-Virus bindet an spezielle Sequenzen der DNA (CCCTT) und spaltet das Phosphodiester-Rückgrat. Die Energie dieser Spaltung wird dabei in einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat und dem Tyrosyl-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I konserviert. Diese Bindung zwischen der Vektor-DNA und dem Enzym kann durch das 5'-Hydroxylende des PCR-Produkts wieder aufgelöst werden, wobei die Topoisomerase I freigesetzt wird. Die „Topo-Cloning“ Reaktion nutzt diese Reaktion, um PCR-Produkte effizient zu klonieren.

4.4.5.2 Gateway-Technologie

Das „pCR8®/GW/Topo® TA Cloning® Kit“ von Invitrogen kombiniert die „Topo-Cloning“- mit der Gateway®-Technologie. Diese Methode ermöglicht die schnelle und effiziente Klonierung bestimmter DNA-Abschnitte zwischen multiplen Vektor-Systemen, basierend auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda. Dieser injiziert die lineare DNA in die Bakterienzelle, wo sie in das bakterielle Genom eingefügt werden kann. Die Integration erfolgt mit Hilfe des Rekombinationsproteins Integrase sowie dem *E. coli*-kodierten Protein Integration Host Factor an einer definierten Position, der *attachment site* (*att*). Für das Herausschneiden der DNA aus dem bakteriellen Chromosom wird ein anderes phagencodiertes Enzym, die Excisionase benötigt.

Diese ortspezifische Rekombination liegt der Gateway®-Technologie zugrunde. Dabei wird zu Beginn das PCR-Produkt in den pCR®8/GW/Topo-Vektor kloniert. In diesem Vektor, der hier als *entry vector* bezeichnet wird, flankieren zwei Kassetten, die *attL*-Sequenzen, das klonierte DNA-Fragment. Nach erfolgter Selektion und Isolierung eines positiven Konstrukts erfolgt der Austausch des gewünschten DNA-Fragments zwischen dem *entry clone* und dem *destination vector* über die *att*-Erkennungssequenzen. Im Falle des *destination vectors* werden diese als *attR*-Sequenzen bezeichnet. Der Vorgang wird insgesamt als LR-Rekombination bezeichnet. In dieser Arbeit sollte

der von mir während meiner Diplomarbeit hergestellte Vektor pGW-attB-lacZ als *destination vector* dienen.

Die LR-Rekombination wird mit Hilfe des "Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mixes" durchgeführt. Dieser Mix enthält die bereits erwähnten Rekombinationsproteine Integrase und Excisionase sowie das *E. coli*-kodierte Protein Integration Host Factor. Der Enzym-Mix katalysiert die *in vitro* Rekombination (*attL1*-Gen-*attL2* × *attR1*-*ccdB*-Gen-*attR2*) zwischen den att-Sequenzen der beiden Vektoren. Dabei entsteht neben dem Expressionsvektor mit *attB*-Sequenzen (*attB1*-Gen-*attB2*) ein Plasmid mit dem Suizidgen *ccdB*. Dieses führt zum Absterben der betreffenden Bakterien und nur die gewünschten Transformanten können wachsen. Die LR-Rekombination wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.4.6 Transformation

Der letzte Schritt einer Klonierung ist die Transformation, also das Einschleusen der rekombinanten DNA in Bakterienzellen und die daraus resultierende Vermehrung der Plasmide. Die Eigenschaft von Bakterien fremde DNA aufzunehmen wird als Kompetenz bezeichnet. Da viele Bakterien nicht auf natürliche Weise kompetent sind, wurden verschiedene Methoden etabliert um dies zu umgehen. Bei der Elektroporation werden die Zellen einer elektrischen Gleichspannung ausgesetzt, wodurch sich die Lipide in der Membran für kurze Zeit so verschieben, dass die DNA ins Cytoplasma gelangen kann. In dieser Arbeit wurden ausschließlich chemokompetente Zellen verwendet.

Für die Transformation wird den aufgetauten Bakterien 1-5µl (10pg bis 100ng) Plasmid-DNA hinzugefügt. Daraufhin erfolgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis. In dieser Zeit lagert sich die DNA an der Zellwand der Bakterien an. Im Anschluss erfolgt der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C und eine sofortige Überführung auf Eis für 2 Minuten. Nach Zugabe von 250µl S.O.C.-Medium werden die Ansätze 60 Minuten bei 37°C horizontal geschüttelt. Anschließend plattiert man die Bakterien auf entsprechenden selektiven Platten (LB-Medium und Antibiotikum) aus und lässt sie über Nacht bei 37°C wachsen.

4.4.7 Bakterienkultur

Im Anschluss an eine Transformation ist es notwendig einzelne Bakterienkolonien in Flüssigkulturen zu vermehren. Dadurch wird ausreichend Zellmaterial für eine Plasmidpräparation gewonnen. Üblicherweise wird dafür LB-Medium mit dem gleichen Antibiotikum versetzt, welches für die Selektion der transformierten Bakterien verwendet wurde. Einzelne Kolonien werden gepickt und in das Medium überführt. Die Kulturen werden über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

4.4.8 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation ist eine Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA nach der Vermehrung in Bakterienkulturen. Die Plasmide werden dabei über spezielle Kits für Mini- oder Midipräparation (GenElute Plasmid Mini- oder Midiprep Kit) von Sigma oder Maxipräparation (QIAprep Hispeed Plasmid Maxi Kit) von Qiagen aufgereinigt.

Eine über Nacht-Kultur transformierter *E. coli* Zellen wird dabei durch Zentrifugation geerntet und das Pellet einer alkalischen SDS-Lyse unterzogen. Dieser folgt in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen die Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silica-Membran in einer Säule. Verunreinigungen wie RNA und Proteine werden durch Waschschriffe entfernt. Die gebundene DNA wird letztlich mit EB-Puffer oder TE-Puffer eluiert. Durch eine ethanolische Fällung (4.4.4) kann die DNA noch weiter aufgereinigt und konzentriert werden.

4.4.9 Konzentrationsbestimmung am NanoDrop™ 1000

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA wurden in dieser Arbeit der NanoDrop™ 1000 von Thermo Scientific verwendet. Dieser bestimmt die Absorption von Nukleotiden, RNA, ssDNA und dsDNA bei 260nm.

Neben der Bestimmung der Konzentration werden zwei weitere Werte beachtet, die die Reinheit der DNA oder RNA angeben sollen. Beim Verhältnis „260/280“ wird bei DNA ein Wert von 1,8 akzeptiert, bei RNA 2,0. Unterschreitet der Wert diese Grenzen kann von einer Kontamination durch Proteine ausgegangen werden.

Als zweiter Wert für die Reinheit wird das „260/230“-Verhältnis bestimmt. Dies sollte sich zwischen 2,0 und 2,2 bewegen. Niedrigere Werte weisen auf Kontaminationen mit EDTA, Kohlenhydraten, Phenol oder Guanidin-HCl hin.

4.4.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, kurz: PCR) ist eine wichtige molekulargenetische Methode um *in vitro* einen bestimmten DNA-Abschnitt in großen Mengen zu amplifizieren. Die Grundlage dafür bildet die *Taq*-Polymerase, ein spezielles thermostabiles Enzym, das ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Zusätzlich benötigt man als Ausgangsmaterial eine DNA-Matrize, weiterhin zwei Oligonukleotidprimer sowie Nukleotide zur Synthese der Kopien.

In dieser Arbeit wurde in der Regel die KAPAHiFi™ Polymerase von peqlab verwendet. Dieser ist in Bezug auf die Fehlerrate (2.8×10^{-7}) und Prozessivität (>100 Nukleotide) eine enorme Weiterentwicklung im Vergleich zur *Taq* (2.6×10^{-5} und >42 Nukleotide).

Die Angabe zum Reaktionsansatz und den Reaktionsbedingungen entsprechen den Angaben des Herstellers und wurden je nach Ansatz entsprechend passend abgeändert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in zu finden.

4.4.11 A-tailing

Voraussetzung für die TA Topo-Klonierung sind PCR-Fragment mit einzelnen A-Überhängen am 3'-Ende. Manche DNA-Polymerase wie die *Taq* generieren diese Überhänge automatisch während der Amplifikation, andere wiederum fehlt diese Eigenschaft. Die in dieser Arbeit häufig verwendete KAPAHiFi™ Polymerase erzeugt glatte Enden ohne Überhänge, *blunt ends*. Hier müssen in einem zusätzlichen Schritt A-Überhänge durch die *Taq*-Polymerase angefügt werden. Folgender Ansatz wird für das A-tailing verwendet:

6µl	PCR-Amplifikat (aufgereinigt)
1µl	10x PCR-Puffer (Qiagen)
1µl	25mM mgCl ₂
1µl	2mM dATP
1µl	<i>Taq</i> -Polymerase

Der Ansatz wird 15 min bei 72°C, dem Temperaturoptimum der *Taq* inkubiert und dann direkt für die TA-Topo-Klonierung eingesetzt.

4.4.12 Site-directed Mutagenesis

Mithilfe des QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene können in kürzester Zeit Punktmutationen in Plasmide eingefügt werden. In dieser Arbeit wurden TBEs in potentiellen Enhancer-Regionen mutiert, um die Notwendigkeit dieser Bindestelle für Omb zu untersuchen.

Für die Mutagenese werden zwei Oligonukleotid-Primer verwendet, die beide die gewünschte Mutation tragen und an die komplementären Stränge des Plasmids binden. Die *PfuUltra™ high-fidelity* (HF) DNA-Polymerase katalysiert die Replikation des Plasmids mithilfe der Mutagenese-Primer.

Der parentale DNA-Strang wird im Anschluss an die Mutagenese-PCR durch einen *DpnI*-Verdau abgebaut. Die Endonuklease *DpnI* restringiert spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA wie sie aus den meisten *E. coli*-Stämmen (*dam*⁺) isoliert wird. Die mutagenisierte Plasmid-DNA wird schließlich in XL10-Gold ultrakompetente Zellen transformiert.

Die Angaben zur Herstellung der Mutagenese-Primer sowie der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen im Thermocycler wurden gemäß den Angaben des QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene befolgt.

4.4.13 Sequenzierung

Die Firma StarSEQ® GmbH (Mainz) führte alle Sequenzierungen von Plasmiden durch, welche im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden. Für die Sequenzierung wurden 7µl Gesamtvolumen in einem ThermoTube 0,2ml (peqlab) abgegeben:

xµl	DNA (550ng in H ₂ O oder Tris-HCl, pH 7-8)
1µl	Primer (10µM)
Xµl	H ₂ Odd (Roth)
7µl	Gesamt

Die Sequenzen der genutzten Primer sind in Tab. 33 (7.9.4) zu sehen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt mit der Software FinchTV von Geospiza. Das Alignment der Sequenzen wurde mit dem Nucleotide BLAST-Programm von NCBI durchgeführt.

4.4.14 *In vitro* Transkription zur Sondenherstellung

Die *in vitro* Transkription wurde in dieser Arbeit für die Herstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten antisense mRNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen an *Drosophila* L3- Imaginalscheiben eingesetzt. Vor der eigentlichen Sondenherstellung muss eine DNA-Matrize zur Verfügung gestellt werden. Dies geschieht entweder über die Verwendung bzw. die Herstellung eines cDNA-Klons oder aber über eine PCR-Reaktion. Beide Varianten wurden in dieser Arbeit angewandt.

Soll ein cDNA-Klon verwendet werden erfolgt zunächst die Klonierung des gewünschten DNA-Abschnitts, welcher als Synthesevorlage dienen soll, in einen entsprechenden Vektor mit einer RNA-Polymerase-Bindestelle. In einigen wenigen Fällen wurden auch kommerzielle EST-Klone verwendet. Damit die Sonde nach der *in vitro* Transkription keine Vektorsequenz enthält und aus einer definierten Länge besteht, wird die Plasmid-DNA am zukünftigen 3'-Ende der Sonde in einem präparativen Restriktionsansatz linearisiert.

Vor Beginn der *in vitro* Transkription wird die DNA zunächst gefällt. Dazu versetzt man die DNA mit 1/10 Volumen 2M NaCl-DEPC und 2,5 Volumen Ethanol abs. und inkubiert 1 Stunde bei -20°C. Im Anschluss wird die Fällung bei 14 000rpm und 4°C 45 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgt die Zugabe von 500 µl 70% Ethanol-DEPC und eine erneute Zentrifugation bei 14 000rpm und 4°C für 10 Minuten. Im Anschluss wird das Pellet in 20µl DEPC-H₂O gelöst.

Die schnellere Methode um eine DNA-Matrize zu erhalten ist die Amplifikation eines Exons mittels PCR (siehe Abschnitt 4.4.10). Dabei wird lediglich die T7-Promotor-Sequenz an den 3'-Primer angefügt. Nach einer PCR-Aufreinigung mittels „High Pure PCR purification Kit“ von Roche kann die DNA direkt für die *in vitro* Transkription eingesetzt werden.

Im Folgenden ist der Ansatz für eine *in vitro* Transkription aufgeführt, wie er in dieser Arbeit standardmäßig eingesetzt wurde:

14µl	gefällter Verdau
2µl	10x Transkriptionspuffer (Roche)
2µl	DIG RNA labeling mix (Roche)
2µl	T7-RNA-Polymerase (Roche)
<u>0,5µl</u>	<u>RNase-Inhibitor (Fermentas)</u>
20,5µl	Gesamt

Die Inkubation erfolgt für 2 Stunden bei 37°C. Dabei synthetisiert die RNA-Polymerase durch Einfügen der Nukleotide, unter anderem DIG-markierter UTPs, die RNA-Sonde. Durch die Zugabe von 2µl DNase I und Inkubation für 15 min bei 37°C wird die verbliebene Plasmid-DNA abgebaut. Mit 2µl 0,2M EDTA-DEPC wird die DNase-Aktivität gestoppt. Zum Schluss wird die RNA bei -20°C über Nacht mit 2,5µl 2M LiCl-DEPC und 70µl Ethanol abs. gefällt.

Der Erfolg der *in vitro* Transkription wurde in der Regel mithilfe eines Tüpfel-Tests überprüft.

4.4.15 Tüpfel-Test

Der Tüpfel-Test, welcher hier (Daten nicht gezeigt) mit dem „DIG Luminescent Detection Kit“ von Roche durchgeführt wurde, ist eine Möglichkeit zur Abschätzung der Sonden-Konzentrationen nach der *in vitro* Transkription. Dabei werden verschiedene Verdünnungen der DIG-markierten Sonden sowie eine Kontrolle mit bekannter Konzentration auf eine positiv geladenen Nylonmembran (Boehringer Mannheim) punktförmig aufgetragen.

Das Prinzip der Detektion basiert auf der Bindung eines anti-DIG-Antikörpers, an den eine Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Die anschließende Visualisierung erfolgt über das chemilumineszente Substrat CSPD, wobei die enzymatische Dephosphorylierung durch die AP zu einer Lichtemission mit einer Wellenlänge von 477 nm führt.

Die Sonden werden durch kurzzeitige Bestrahlung mit UV-Licht auf der Membran fixiert. Nach der Hybridisierung wird die Membran fünf Minuten in Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgt eine 30-minütige Inkubation in 100 ml 1x Blockierlösung, wodurch unspezifische Bindungsstellen abgedeckt werden. Danach wird 30 Minuten in 20 ml Antikörperlösung inkubiert. Es folgen zwei 15-minütige Waschschrte mit je 100 ml Waschpuffer. Abschließend wird die Membran mit 20 ml Detektionspuffer 5 min inkubiert, bevor sie mit 2 ml CSPD-Lösung bedeckt wird. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten, wird die Membran 10 min bei 37°C gelagert um die Lumineszenz zu verstärken. Die Exposition erfolgt für 3 Minuten auf einem Röntgenfilm von Amersham (Boehringer Mannheim). Nach der Entwicklung kann anhand der Schwärzung des Films die Sondenkonzentration im Vergleich mit der Kontrolle abgeschätzt werden.

4.4.16 RNA-Isolation

Aus Flügelimaginalscheiben vom Stamm 965 *l(1)omb³¹⁹⁸/FM-GFP* sollte RNA für eine anschließende Real-Time PCR isoliert werden. Dafür wurde das „RNeasy Plus Mini Kit“ von Qiagen verwendet.

Dieses ermöglicht vor allem eine Anreicherung der *mRNA*, da nur RNA-Moleküle mit mehr als 200 Nukleotiden isoliert werden können.

Die männlichen Larven des Stamms wurden nach Mutante und Kontrolle getrennt und separat präpariert. In 1x PBS-DEPC wurden die Flügelscheiben von den Larven entfernt, gesammelt und je ca. 20 Stück in ein Reaktionsgefäß mit 50µl Lysepuffer (RLT Plus-Puffer von Qiagen) überführt. Dieser Puffer enthält Guanidin-Isothiocyanat, welches zur sofortigen Inaktivierung von RNasen führt und somit die Isolierung intakter RNA ermöglicht. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Scheiben bei -80°C gelagert.

Für die RNA-Isolation wurden die Scheiben auf Eis aufgetaut und ca. 1 min mit einem Einweg-Pistill homogenisiert. Es wurden je sechs Präparate mit je 50µl Lysepuffer zusammengeführt und zum weiteren Homogenisieren auf eine *QIAshredder Spin Column* (Qiagen) gegeben und 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde dann wie im Handbuch des „RNeasy Plus Mini Kit“ von Qiagen beschrieben weiter verarbeitet. Genomische DNA wird effizient durch den Einsatz einer *gDNA Eliminator Spin Column* entfernt.

Die Konzentration der eluierten RNA in RNase-freien Wasser wurden am NanoDrop™ 1000 (siehe Abschnitt 4.4.9) bestimmt.

4.4.17 Reverse Transkription

Für die an die RNA-Isolation anschließende cDNA-Synthese wurde das „QuantiTect Reverse Transcription Kit“ von Qiagen verwendet. Die Prozedur umfasst zwei Schritte: Die Entfernung genomischer DNA und die Reverse Transkription. Bei der Durchführung wurde sich genau an die Angaben im Handbuch gehalten.

Die Quantiscript Reverse Transkriptase transkribiert zum einen cDNA von der RNA-Matrize, zum anderen verfügt sie über eine RNase H-Aktivität. Dadurch wird die RNA in RNA:DNA-Hybriden degradiert, wodurch nur cDNA übrig bleibt.

Ein weiterer Vorteil des Kits ist die Verwendung eines Primer-Mix, der sowohl oligo-dT als auch *random* Primer enthält. Somit wird eine hohe cDNA-Ausbeute von allen Regionen des RNA-Transkripts ermöglicht, auch von der 5'-Region.

4.4.18 qPCR

Die quantitative PCR (qPCR), oder Real-Time-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von DNA, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion beruht. Im Unterschied zu dem herkömmlichen Verfahren ermöglicht die qPCR eine Kombination der Amplifikation eines bestimmten Genabschnitts mit der direkten Detektion des Produkts im Reaktionsgefäß.

4.4.18.1 Primerdesign

Für das Design der Primer wurde das Programm Primer BLAST von NCBI verwendet. Grundsätzlich wurde angestrebt Primerpaare zu wählen, bei dem einer der Primer auf einer Exon-Exon-Verbindung liegt. Das ist von Vorteil um die Amplifikation von genomischer DNA und somit eine Kontamination auszuschließen. Um eine möglichst hohe PCR-Effizienz zu gewährleisten wurden Amplikonlängen zwischen 100 und 150bp angestrebt. Die Primerpaare sollte zudem eine vergleichbare Schmelztemperatur aufweisen (ΔT_m : maximal 2°C), um eine unspezifische Initiation auszuschließen. Weiterhin sollten Wiederholungen identischer Nukleotide (besonders G's) und Komplementaritäten in oder zwischen den Primern vermieden werden. Das hat ebenfalls zum Ziel, die Effizienz der Reaktion zu erhöhen und das Risiko von Primer-Dimeren zu verhindern.

Um die Spezifität der Primer zu bestätigen wurde eine BLAST-Analyse durchgeführt. Diese soll sicherstellen, dass die Primer nur den Abschnitt von Interesse amplifizieren.

4.4.18.2 Vorbereitung der 96well-Platte und Durchführung der qPCR

Vor dem eigentlichen Experiment wurde die Belegung der 96well-Platte mit der StepOnePlus™-Software (v2.3) geplant. Das Programm führt durch die einzelnen Schritte. Wenn jedes Kandidatengen und die Wasser-Kontrolle (*Non Template Control, NTC*) in Triplikaten analysiert werden soll, dann können pro Platte zehn Gene inklusive der endogenen Kontrolle *rp49* untersucht werden. Bei allen beschriebenen Arbeitsschritten wurde auf besondere Sauberkeit geachtet, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die cDNA von *FM-GFP*- und *omb*³¹⁹⁸-Flügelimaginalscheiben (4.4.16, 4.4.17) wurde mit RNase-freiem Wasser (4.1.9.2) auf 200ng/μl verdünnt. Dann wurde für alle zu untersuchenden Gene ein Master-Mix vorbereitet. Die Berechnungen sind nachfolgend angegeben:

Für einen Ansatz:

Fast SYBR Green Master Mix (2x)	10μl
Primer forward (20pm/μl)	0,1μl
Primer reverse (20pm/μl)	0,1μl
H ₂ O RNase-frei	7,8μl
Gesamtvolumen	18μl

Für den Master-Mix (10 Ansätze):

Fast SYBR Green® Master Mix (2x)	100μl
Primer forward (20pm/μl)	1μl
Primer reverse (20pm/μl)	1μl
H ₂ O RNase-frei	78μl
Gesamtvolumen	180μl

Eine finale Konzentration von 100nM pro Primer wurde als effektiv für die meisten Reaktionen angesehen.

Beim Pipettieren der Platte auf Eis wurde zunächst anhand des Pipettierschemas 18μl des Master-Mix pro Well vorgelegt (pro Master-Mix neun Wells). Im Anschluss wurden 2μl der entsprechenden cDNA oder des Wassers dazupipettiert. Die Platte wurde dann mit einem adhesiven Film (4.1.9.2) verschlossen und kurz abzentrifugiert. Im StepOnePlus™ kann nach der vorherigen Programmierung des Reaktionsverlaufs die PCR direkt gestartet werden. Dabei ist darauf zu

beachten, welcher Master-Mix verwendet wurde, da das Gerät zwischen einer Fast-Version (ca. 40min) und der Standard-Version (ca. 2h) unterscheidet und die Master-Mixe entsprechend darauf ausgelegt sind. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Fast-Variante durchgeführt.

4.4.18.3 Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Reaktionsspezifität

Der Nachteil der SYBR®-Green-Methode ist die unspezifische Bindung des Farbstoffs, wodurch nicht zwischen verschiedenen PCR-Produkten unterschieden werden kann. Trotz eines guten Primer-Designs können die Primerpaare Dimere bilden oder ein unspezifisches Produkt amplifizieren. Deshalb wird nach der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abb. 11). Das Prinzip beruht auf den spezifischen Schmelztemperaturen (T_m) einzelner Produkte, die abhängig sind von der Fragmentlänge bzw. des GC-Gehalts. Dazu wird die Temperatur langsam von 60°C auf 95°C erhöht. Bei einer bestimmten Schmelztemperatur liegt der DNA-Doppelstrang vollständig denaturiert vor, wodurch das SYBR®-Green freigesetzt wird und eine Abnahme der Fluoreszenzintensität detektiert werden kann. Primer-Dimere weisen eine geringere Schmelztemperatur auf als das Amplikon (Abb. 11A). Da sie die PCR-Effizienz reduzieren sind sie natürlich nicht erwünscht. In der Regel treten Primer-Dimere allerdings in den Kontrollansätzen, den Non-Template Controls (NTCs) auf, da dort die Primer im Überfluss vorhanden sind und nicht an einen cDNA-Template binden können. Idealerweise sollte in jeder Reaktion mit cDNA als Template ein einzelner *peak* auftreten, in den NTCs keiner. Die Amplifikation unspezifischer Produkte ist ebenfalls insofern ein Problem, als das diese Amplifikate ebenfalls zur Fluoreszenz beitragen und somit den C_T -Wert künstlich beeinflussen. Beim Auftreten von Primer-Dimeren und unspezifischer Produkte müssen die Primer neu entworfen werden.

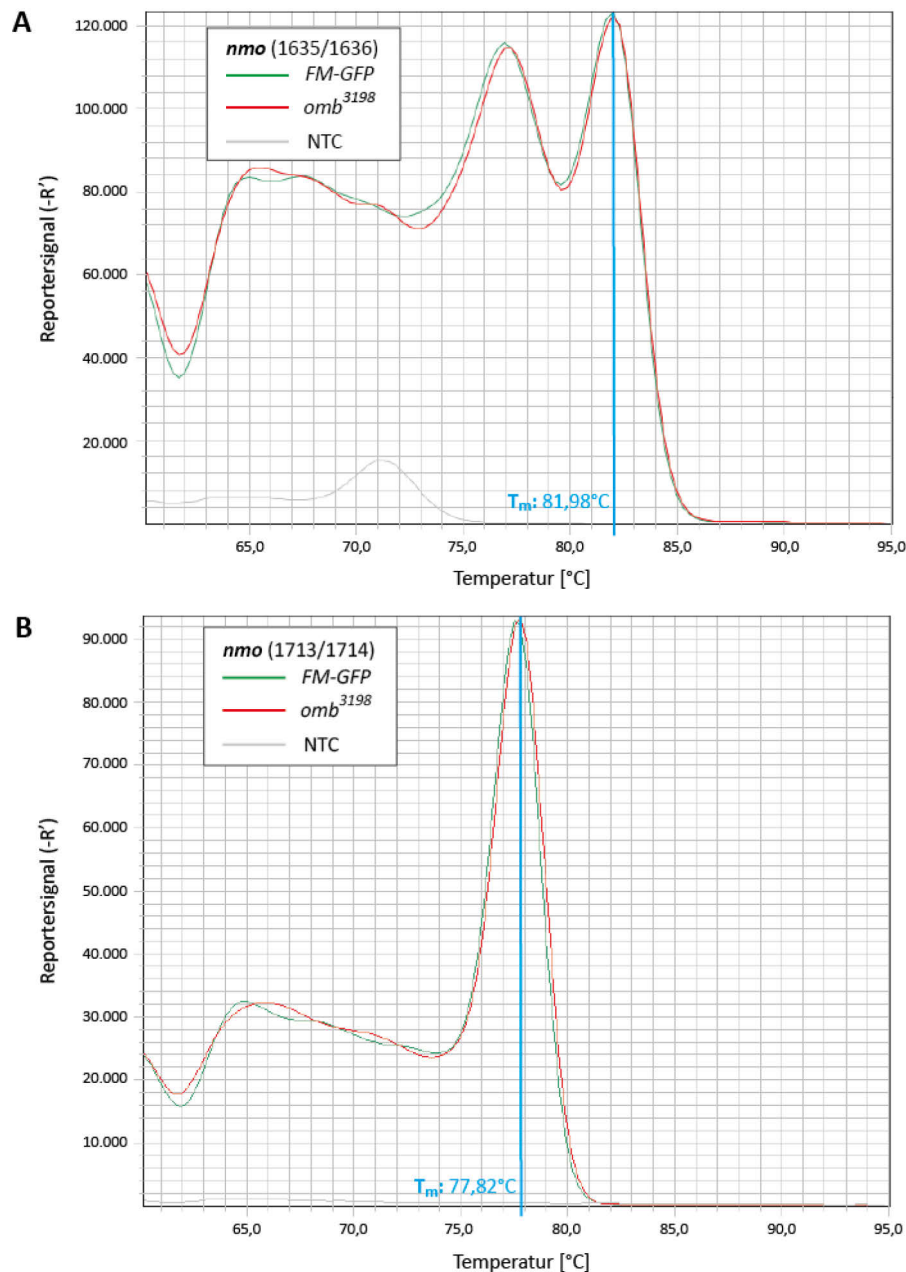


Abb. 11: Darstellung der Schmelzkurven von *nmo*-Amplifikaten bei der Verwendung unterschiedlicher Primer-Paare.

Um die Amplifikationsreaktion auf unspezifische Produkte zu untersuchen wird nach der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wird die Temperatur langsam von 60°C auf 95°C erhöht. Bei einer bestimmten Schmelztemperatur liegt der DNA-Doppelstrang vollständig denaturiert vor, wodurch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität detektiert werden kann. In (A) und (B) sind die jeweiligen Schmelzkurven der *nmo*-Amplifikation in verschiedenen Experimenten mit unterschiedlichen Primer-Paaren dargestellt. In beiden Diagrammen sind die Schmelzkurven je eines *Wells* mit der *Non-Template* Kontrolle (NTC, graue Kurve), mit der *omb*³¹⁹⁸- (rote Kurve) sowie der FM-GFP-cDNA (Kontrolle, grüne Kurve) abgebildet. Die spezifischen Schmelztemperaturen (T_m) der Produkte werden durch einen blauen Balken verdeutlicht. Aufgetragen ist die erste negative Ableitung des normalisierten Reportersignals (-R'), also der Fluoreszenz, auf der y-Achse gegen die Temperatur [°C] auf der x-Achse. (A) Die Amplifikation von *nmo* wurde mit den Primern 1635 und 1636 (Tab. 34) durchgeführt. Die Schmelzkurven der der Proben mit der Kontroll-cDNA und der mutanten cDNA weisen je zwei *peaks* mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen auf. Darüberhinaus zeigt auch die NTC-Probe eine Amplifikation auf. Da beide Effekte auf eine Dimer-Bildung der Primer hinweisen, wurden neue Primer hergestellt. (B) Mit den Primern 1713 und 1714 (Tab. 34) findet in der NTC keine Amplifikation statt, wohingegen die Proben mit der Kontroll-cDNA und der mutanten cDNA einen einzelnen *peak* aufweisen, der somit die spezifische Amplifikation des Produkts bestätigt.

4.4.18.4 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Analyse der qPCR-Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Statistica 13 von StatSoft. Dabei wurden Mittelwerte aus den RQ-Werten der *FM-GFP*- und *omb*³¹⁹⁸-Proben aus unabhängigen Experimenten berechnet. Signifikante Unterschiede der unabhängigen Stichproben wurden mit dem zweiseitigen, studentischen t-Test ermittelt. * signifikant: $p < 0,05$, ** hochsignifikant: $p < 0,01$, *** höchst-signifikant: $p < 0,001$.

Die Rohdaten der statistischen Auswertung wurden in Excel zusammengefasst und sind im Anhang (Tab. 25, Tab. 26) einsehbar. Die in Statistica generierten Mittelwertplots wurden anschließend noch mit CorelDRAW X8 bearbeitet.

4.4.19 ChIP-on-CHIP

Ein *ChIP-on-CHIP* oder *ChIP-CHIP* kombiniert eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit einem DNA-Microarray (Chip) und ermöglicht somit die Bestimmung von Protein-DNA-Interaktionen *in vivo*.

Im Folgenden werden nur die groben Abläufe und Hintergründe beschrieben. Die genauen, sehr aufwendigen Protokolle sind auf der FlyChip-Homepage (<http://www.flychip.org.uk/protocols/>) zu finden. Folgende Protokolle wurden verwendet:

- *ChIP for fly genomic DNA using Nimblegen arrays*
- *Nimblegen Processing of ChIP or DamID DNA on 2.1M Arrays*

4.4.19.1 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Für die Chromatin-Immunopräzipitation wurden die Augen- und Flügelimaginalscheiben von *w*¹¹¹⁸-Larven zunächst präpariert und in Formaldehyd fixiert. Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten wurden für die Augen- und Flügelimaginalscheiben die Versuche mit je drei biologischen Replikaten durchgeführt.

Für die weitere Verarbeitung werden die Scheiben homogenisiert, die Zellkerne aufgespalten und das Chromatin durch Sonifizierung mit dem Biorupter UCD-200 in Fragmente mit etwa 500 bp gesichert. Vor der eigentlichen Chromatin-IP ist eine Überprüfung der Chromatinextraktion und der Fragmentierung in die erwartete Größe notwendig. Dafür werden in einem Teil des sonifizierten Materials die Proteine durch Zugabe von SDS und Proteinase K denaturiert, die DNA mittels Phenol-Chloroform-Isoamyalkohol-Extraktion präzipitiert und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wird die sonifizierte DNA mit dem Omb-Antikörper immunopräzipitiert. In diesem Versuch wurde neben dem anti-Omb Antikörper als Kontrolle ein polyklonaler anti- β -Galactosidase Antikörper (sogenannte *mock IP*) eingesetzt:

Antikörper: rabbit anti-Omb (Xanthippe)

- vorverdünnt 1:10 [5-10 µg/µl]
- für jede IP: 2,5-5 µg/µl

Kontrolle: rabbit β-Galaktosidase, polyklonal

- abcam (ab616)
- 10 mg/ml
- für jede IP: 2,5-5 µg/µl

Die spezifischen Antikörper-Protein-Chromatin-Komplexe werden mit Hilfe Protein A-gekoppelter Agarose-Kügelchen (Sigma) isoliert. Protein A von *Staphylococcus aureus* hat eine sehr hohe Affinität für Fc-Regionen von IgG-Molekülen und kann somit zur Aufreinigung von Antikörper-Komplexen verwendet werden. Die immunpräzipitierten Komplexe werden nachfolgend gesammelt und gewaschen, um unspezifisch gebundenes Chromatin zu entfernen.

4.4.19.2 PCR-Amplifikation und *Cy5/Cy3-Labeling* der Proben

Das Protokoll sieht nach der DNA-Aufreinigung zwei PCR-Reaktionen vor, um ausreichend Material für den Microarray zu erhalten. Dafür werden die Enden der Chromatin-Fragmente mittels T4-DNA-Polymerase aufgefüllt, sodass *blunt ends* entstehen und über T4-Ligation mit *Linkern* versehen. *Linker* sind kurze doppelsträngige Oligonukleotide, die einen Einzelstrang-Überhang aufweisen. Somit können *Linker* an die Enden anderer DNA-Moleküle ligieren. Über diese *Linker* wird die PCR-Amplifikation überhaupt möglich, da die Sequenzen der präzipitierten DNA bis dato nicht bekannt sind.

Sequenz der *Linker*:

- 24-mer Oligonukleotid: 5'-AGA AGC TTG AAT TCG AGC AGT CAG-3',
5' phosphorylated
- 20-mer Oligonukleotid: 5'-CTG CTC GAA TTC AAG CTT CT-3'

Um die PCR-Reaktionen zu überprüfen wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die DNA wird mittels „QIAQuick PCR purification Kit“ von Qiagen aufgereinigt und die Konzentration am NanoDrop bestimmt.

Im Anschluss erfolgt die Fluoreszenz-Markierung der Proben mit den Cyanine-Farbstoffen Cy5 bzw. Cy3.

4.4.19.3 Microarray-Hybridisierung und Scannen mit dem GenePix 4000B

Für den Microarray wurden der „2.1M Whole Genome Tiling Array“ von NimbleGen (Roche) verwendet. Bei diesem Array sind auf einem Glaträger 2,1 Millionen DNA-Sonden aufgetragen, die das komplette *Drosophila melanogaster* Genom in 55bp-Abständen abdecken. Die Sonden sind jeweils zwischen 50 und 75bp lang.

Die genaue Durchführung der Proben-Hybridisierung auf dem Array und der Scan-Vorgang mit dem GenePix 4000B sind ebenfalls auf der FlyChip-Homepage beschrieben (Protokoll: siehe oben).

4.4.19.4 Datenanalyse

Für den Import der Rohdaten sowie deren Normalisierung und die Ermittlung angereicherter Regionen wurde die frei erhältlich Software Ringo (Bioconductor) verwendet (Toedling *et al.*, 2007).

Zur Visualisierung der angereicherten Regionen im Vergleich mit den bioinformatisch bestimmten TBEs wurde der Integrated Genome Browser (IGB; gesprochen "IG-bee") verwendet. Das Programm kann von der Internetseite <http://bioviz.org/igb/index.html> heruntergeladen werden.

Das genaue Vorgehen bei der Datenanalyse wird im Ergebnisteil besprochen.

5. Ergebnisse & Diskussion

5.1 Identifizierung von Omb-Bindestellen mittels ChIP-on-chip

Protein-DNA-Interaktionen können *in vivo* durch einen sogenannten ChIP-on-Chip bestimmt werden. Dabei wird eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit einem DNA-Microarray (Chip) kombiniert (4.4.19). In diesem Fall ist die Methode ein Versuch, Omb-Bindestellen im gesamten Genom zu identifizieren und Übereinstimmungen mit den bioinformatisch bestimmten TBEs zu ermitteln. Die Experimente führte ich im FlyChip-Labor von Prof. Steven Russel in Cambridge, UK unter Anleitung von Bettina Fischer durch.

In getrennten Ansätzen wurden Augen- und Flügelimaginalscheiben von wildtypischen L3-Larven (*w¹¹¹⁸*) verwendet. Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten wurden die Versuche mit je drei biologischen Replikaten (aus 10) à 50 Imaginalscheiben durchgeführt:

- Wing disc Sample 1 (WS1)
- Wing disc Sample 2 (WS2)
- Wing disc Sample 3 (WS3)

- Eye disc Sample 3 (ES3)
- Eye disc Sample 4 (ES4)
- Eye disc Sample 5 (ES5)

Da die Versuchsdurchführung und Protokollierung in Englisch erfolgte, wird in der Darstellung der Ergebnisse die englische Beschriftung der Proben beibehalten. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Zwischenschritte, die Datenauswertung und die Endergebnisse beschrieben.

5.1.1 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) beruht darauf, dass an die DNA gebundene Proteine, somit auch der Transkriptionsfaktor Omb, durch eine Formaldehyd-Behandlung fixiert werden. Die Chromatinextraktion und die anschließende Sonifizierung in 500bp-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese überprüft (Abb. 12). Diese bestätigte zwar den Erfolg der Chromatinextraktion, lies aber trotz der entsprechenden Einstellungen des Biorupters UCD-200 keine spezifische Anreicherung im Bereich von 500bp erkennen. Trotzdem wurde beschlossen, mit diesem Ausgangsmaterial die Immunpräzipitation durchzuführen.

Dabei wurden die Omb-gebundenen Chromatinfragmente mit einem anti-Omb Antikörper präzipitiert. Als Kontrolle wurden in einem separaten Ansatz die Immunpräzipitation mit einem anti- β -Galaktosidase Antikörper durchgeführt. Die spezifischen Antikörper-Protein-Chromatin-Komplexe wurden anschließend isoliert und die DNA aufgereinigt. Die DNA-Sequenzen, welche an Omb gebunden sind, wurden also selektiv angereichert und letztlich wieder aus den Protein-Antikörper-Komplexen befreit.

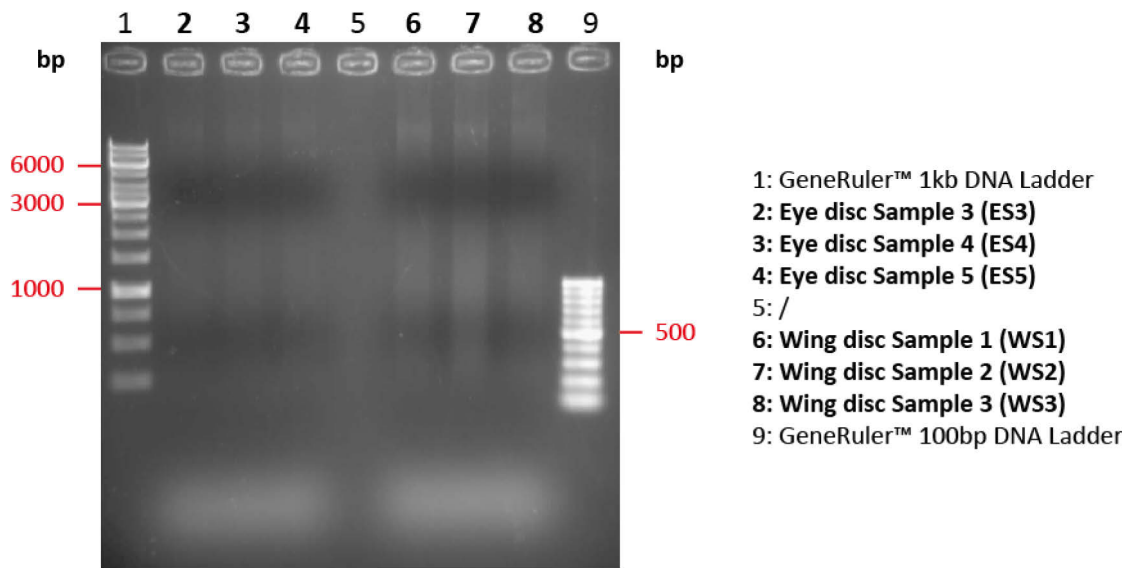


Abb. 12: 1% Agarosegel mit Chromatinfragmenten nach der Sonifizierung.

Von jedem Ansatz (Augen 3-5 und Flügel 1-3) wurden je 5µl mit 1µl Ladepuffer (Fermentas) vermischt und aufgetragen. Das Auftragungsschema ist rechts des Gels dargestellt. Als Größenmarker wurden der GeneRuler™ 1kb DNA Ladder sowie der GeneRuler™ 100bp DNA Ladder von Fermentas zu je 3µl aufgetragen. Einzelne Fragmentgrößen sind zur Orientierung in Rot angegeben. Die Elektrophorese wurde bei 80V durchgeführt.

5.1.2 PCR-Amplifikation

Um ausreichend Material für den Microarray zu erhalten wurde die isolierte DNA in zwei PCR-Reaktionen amplifiziert (4.4.19.2). Zur Überprüfung der PCR-Reaktionen wurde wieder eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 13). Tatsächlich bestätigt das Gelbild eine erfolgreiche Amplifikation in allen Ansätzen. Im Gegensatz zum ersten Gel nach der Sonifizierung (Abb. 12) sind jetzt auch die 500bp-Fragmente erkennbar.

Auch in der Negativkontrolle *blunt end* (Abb. 13, Spur 15 bzw. 19) war DNA zu erkennen. Diese Anreicherung kann z. B. durch Linker-Linker-Amplifikation entstanden sein. Da das Signal aber deutlich schwächer war als in den richtigen Proben wurde der Versuch weiter verfolgt.

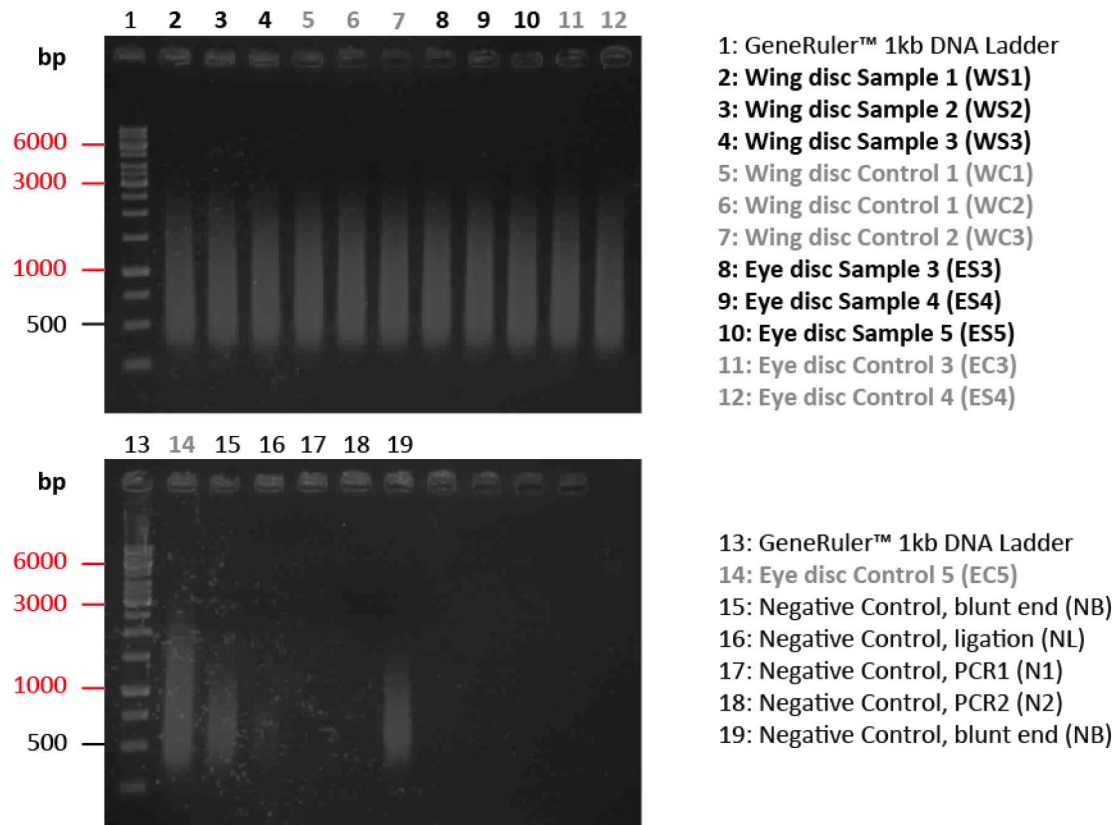


Abb. 13: 1% Agarosegel mit Chromatinfragmenten nach der 2. PCR-Amplifikation.

Von jedem Ansatz (Augen 3-5, Flügel 1-3, Kontrollen und Negativkontrollen) wurden je 5µl mit 1µl Ladepuffer (Fermentas) vermischt und aufgetragen. Die Auftragungsschemata sind rechts der Gele dargestellt. Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1kb DNA Ladder von Fermentas zu je 3µl aufgetragen. Einzelne Fragmentgrößen sind zur Orientierung in Rot angegeben. Die Elektrophorese wurde bei 80V durchgeführt.

Die DNA aus der PCR wurde mittels „QIAquick PCR purification Kit“ von Qiagen aufgereinigt und die Konzentration am NanoDrop (4.4.9) bestimmt (Tab. 11).

Tab. 11: Konzentrationsbestimmung der DNA nach der PCR (NanoDrop)

Sample	Konzentration [ng/µl]	260/280*	260/230*	Volumen [µl]	Gesamtmenge [ng]
WS1	285,4	1,86	2,28	25	7135
WS2	275,03	1,86	2,11	25	6875,75
WS3	277,15	1,86	2,27	25	6928,75
WC1	277,54	1,86	2,26	25	6938,5
WC2	285,62	1,85	2,26	25	7140,5
WC3	313,29	1,86	2,27	25	7832,25
ES3	264,24	1,86	2,27	25	6606
ES4	280,78	1,87	2,28	25	7019,5
ES5	305,49	1,85	2,23	25	7637,25
EC3	275,03	1,85	2,26	25	6875,75
EC4	242,06	1,87	2,27	25	6051,5
EC5	294,19	1,86	2,26	25	7354,75

*Anmerkung: siehe auch 4.4.9

5.1.3 Microarray

Im Anschluss an die PCR-Amplifikation erfolgte die Fluoreszenz-Markierung der Proben mit den Cyanine-Farbstoffen Cy5 bzw. Cy3. Für die jeweils ersten beiden Arrays wurde die anti-Omb-DNA mit Cy5 markiert und die Kontrolle mit Cy3, im jeweils dritten Experiment wurden die Farbstoffe gewechselt (anti-Omb Cy3 vs. anti- β -Gal Cy5). Die anti- β -Gal-DNA lieferte die Kontrolle für unspezifische Anreicherungen in der IP und bildet das Referenzsignal (*baseline*) im Array. Die einzelnen Replikate wurden in aufeinanderfolgenden Versuchsansätzen behandelt. Für den ersten Array wurden WS1 und WC1 verwendet, für den nächsten ES3 und EC3 und so weiter.

Der verwendete „2.1M Whole Genome Tiling Array“ von NimbleGen (Roche) deckt mit 2,1 Millionen DNA-Sonden das komplette *Drosophila melanogaster* Genom ab. Die isolierte, immunpräzipitierte DNA hybridisiert an den komplementären Sequenzen auf dem Chip. Die Position und Farbe eines jeden Hybridisierungsorts (*spot*) ermöglicht dann eine Aussage über die Sequenz, die durch Omb gebunden wird.

5.1.3.1 Normalisierung, Visualisierung und Analyse der Daten

Rohdaten aus der Microarray-Analyse sind nicht direkt verwertbar. Zunächst müssen einige bioinformatische Schritte durchgeführt werden. Für den Import der Rohdaten sowie deren Normalisierung und die Ermittlung angereicherter Regionen wurde die frei erhältlich Software Ringo (Bioconductor) eingesetzt. Ringo („R Investigation of NimbleGen Oligoarrays“) ist eine Erweiterung der Programmiersprache R und wurde eigens zur Analyse von *two-colour* Microarrays der Firma NimbleGen (Toedling *et al.*, 2007) entwickelt.

Um Signalunterschiede, vor allem bei besonders schwachen Hybridisierungssignalen, beurteilen zu können muss eine Hintergrundkorrektur durchgeführt werden. Bei dieser wird von jedem gemessenen Signal das Hintergrundsignal abgezogen.

Normalisierungsstrategien sollen zum einen die Unterscheidung zwischen angereicherten und nicht-angereicherten Komponenten in den Daten erhalten, zum anderen aber auch die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Arrays erhöhen. Anstelle der jeweiligen Spot-Intensitäten werden dafür normalisierte Werte gebildet und miteinander verglichen. Für diesen Vergleich werden allerdings nicht absolute Werte genutzt, sondern die $\log_2$ -ratio. Dies vereinfacht die visuelle und mathematische Darstellung der Rohdaten, da mit dem $\log_2$ differentielle Repressionswerte und Induktionswerte gleich behandelt und verglichen werden können.

Für die Normalisierung wurde die sogenannte Quantile-Normalisierung (quant-all) verwendet. Diese Methode basiert auf der Annahme, dass die Lokalisation der Sonden im gesamten Genom eine gleiche Intensitätsverteilung aufweist. Die Werte werden dann so angepasst, dass die Quantilen jedes Chips gleich sind und somit die Histogramme aller Experimente identisch sind.

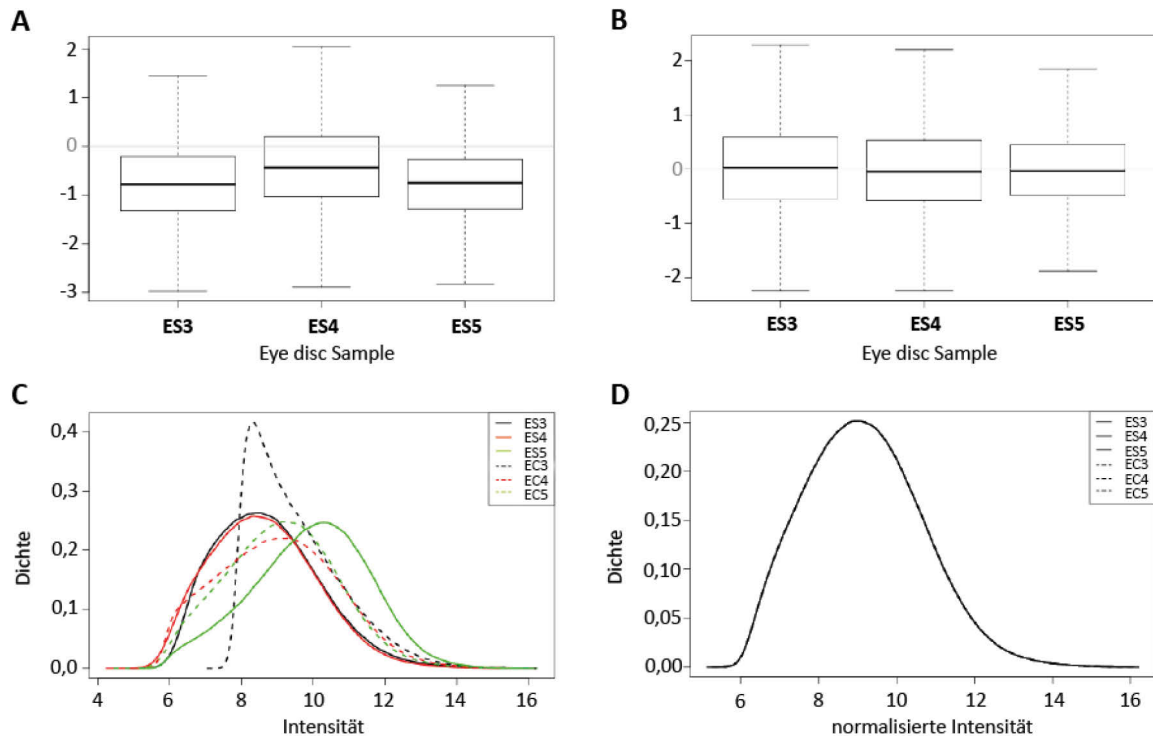


Abb. 14: Box-Plots und Density-Plots der Augendaten vor und nach der Normalisierung.

(A+B) Box-Plots der Augendaten vor **(A)** und nach **(B)** der Normalisierung. **(A)** Der Box-Plot ist eine graphische Darstellung der Datenverteilung. Die Box stellt die mittleren 50% der Daten dar. Der Median wird durch den Strich innerhalb der Box angezeigt. ES3, ES4 und ES5 weisen vor der Normalisierung eine etwas unterschiedliche Datenverteilung auf. **(B)** Die Datenverteilung nach der Normalisierung ist sehr ähnlich.

(C+D) Density Plots der Augendaten vor **(C)** und nach **(D)** der Normalisierung. **(C)** Der Density-Plot zeigt die Verteilung der beiden Signalintensitäten [log] (Cy3 und Cy5) über den gesamten Chip für die einzelnen Proben (ES3 und EC3= schwarz, ES4 und EC4= rot, ES5 und EC5= grün). Die Probe ist immer durch eine durchgezogene Linie dargestellt, die Kontrolle durch eine gestrichelte. Die Verteilung der Signalintensität von EC3 (schwarz gestrichelte Linie) unterscheidet sich deutlich zu den anderen. Dies war ein Grund für den Ausschluss der Daten aus der weiteren Analyse. **(D)** Der Density-Plot zeigt die Verteilung der Signalintensitäten [log] nach der quant-all Normalisierung. Die Plots wurden alle mithilfe von Ringo (Bioconductor) erstellt.

Die Daten aus den verschiedenen Arrays wurden zunächst mithilfe von Ringo in Form von Box- und Density-Plots vor und nach der Normalisierung visualisiert und analysiert. Der Box-Plot stellt graphisch die Verteilung der einzelnen Chip-Daten als log-ratio dar. Die Box visualisiert die mittleren 50% der Daten. Der Median wird durch den Strich innerhalb der Box angezeigt. Oberhalb bzw. unterhalb der Box sind die sogenannte Whisker bzw. "Antennen" eingezeichnet. Diese stellen den größten bzw. kleinsten Datenwert ohne Ausreißer dar. Ausreißer können zusätzlich durch Punkte außerhalb der Antennen eingetragen werden. Box-Plots helfen Rückschlüsse auf den Erfolg der Normalisierung zu ziehen und problematische Arrays zu identifizieren. Im Fall der Augen- (Abb. 14) und Flügel-Daten (Abb. 15) war die Normalisierung erfolgreich und lies keine Probleme in Bezug auf einzelne Arrays erkennen.

Zur Qualitätsbeurteilung der Experimente wurden auch die sogenannten Density-Plots (Abb. 14, Abb. 15C und D) herangezogen. Diese geben einen Eindruck von der Signalverteilung auf dem Chip, also von der Verteilung der roten und grünen Fluoreszenzintensität in Bezug auf die einzelnen Proben. Sofern Arrays eine sehr unterschiedliche Verteilung aufweisen und auch die anderen Qualitätskontrollen (Box-Plots, Histogramme) Auffälligkeiten zeigen, sollten sie gegebenenfalls von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Dies war bei der Auswertung der Augendaten der Fall. Die Omb-Probe ist in der Abbildung (Abb. 14C) immer durch eine durchgezogene Linie dargestellt, die Kontrolle durch eine gestrichelte. Die Verteilung der Signalintensität von EC3 (schwarz gestrichelte Linie) unterschied sich deutlich zu den anderen. Dies war, neben des schlechtes Histogramms (Abb. 16A), ein Grund für den Ausschluss der Daten aus der weiteren Analyse.

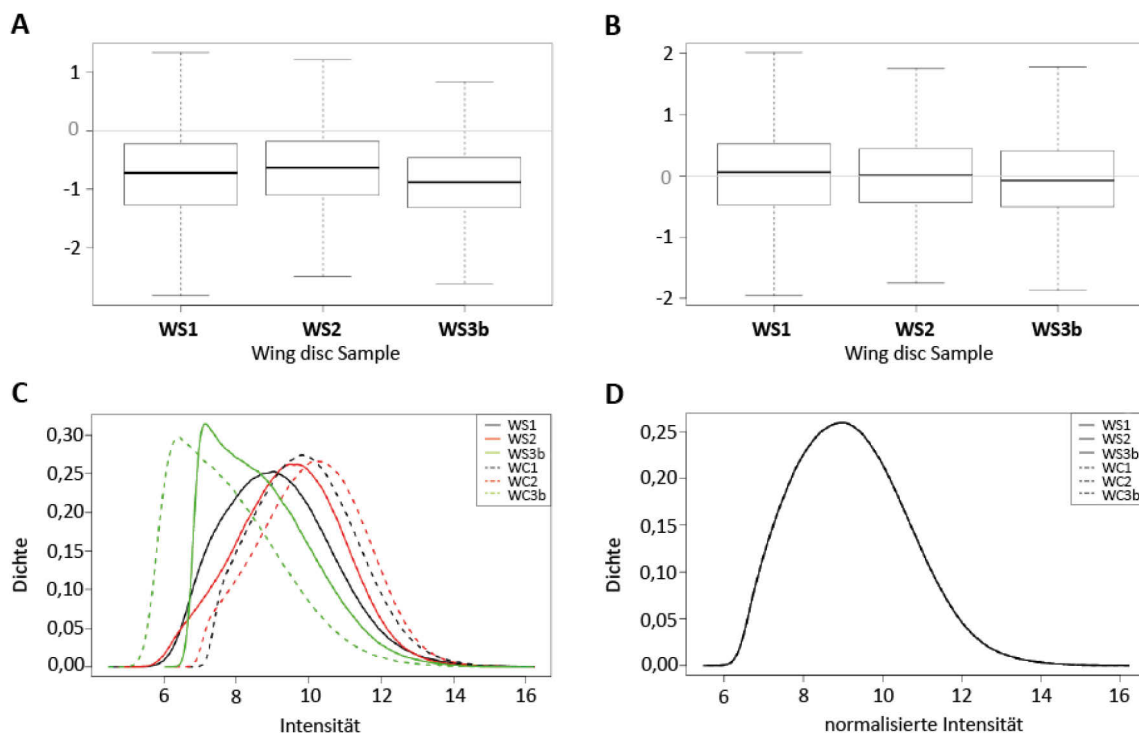


Abb. 15: Box-Plots und Density-Plots der Flügeldata vor und nach der Normalisierung.

(A+B) Box-Plots der Flügeldata vor **(A)** und nach **(B)** der Normalisierung. **(A)** Der Box-Plot ist eine graphische Darstellung der Datenverteilung. Die Box stellt die mittleren 50% der Daten dar. Der Median wird durch den Strich innerhalb der Box angezeigt. WS1, WS2 und WS3b weisen vor der Normalisierung eine etwas unterschiedliche Datenverteilung auf. **(B)** Die Datenverteilung nach der Normalisierung ist sehr ähnlich.

(C+D) Density Plots der Flügeldata vor **(C)** und nach **(D)** der Normalisierung. **(C)** Der Density-Plot zeigt die Verteilung der beiden Signalintensitäten [log] (Cy3 und Cy5) über den gesamten Chip für die einzelnen Proben (WS1 und WC1= schwarz, WS2 und WC2= rot, WS3b und WC3b= grün). Die Probe ist immer durch eine durchgezogene Linie dargestellt, die Kontrolle durch eine gestrichelte. **(D)** Der Density-Plot zeigt die Verteilung der Signalintensitäten [log] nach der quant-all Normalisierung. Die Plots wurden alle mithilfe von Ringo (Bioconductor) erstellt.

Auch die Verteilung der Signalintensität von WS3b und WC3b (Abb. 16B'', grüne Linien) unterschied sich etwas zu den anderen. Aufgrund des Histogramms (Abb. 16B'') war dies aber kein Grund für den Ausschluss der Daten aus der weiteren Analyse. Wie nachfolgend beschrieben, schien dieser Datensatz, im Vergleich zu den anderen, das beste Ergebnis zu liefern.

Nach der Normalisierung wurden die genomischen Regionen bestimmt, welche im immuno-präzipitierten Ansatz eine Anreicherung im Vergleich zur Kontrolle aufweisen. Störendes Hintergrundsignal, welches z. B. durch präzipitierte DNA auftritt, die nicht an den Antikörper gebunden war und somit falsch-positive Signale verursacht, kann problematisch sein. Um die Qualität der einzelnen Arrays beurteilen zu können, wurden aus den Datensätzen Histogramme erstellt (Abb. 16). Histogramme dienen zur Darstellung von Häufigkeitsverteilungen. In Bezug auf die Arrays wird die Stärke der Fluoreszenzintensität gegen die einzelnen Ereignisse (Dichte) aufgetragen und betrachtet.

Die Histogramme der Augen-Daten (Abb. 16A-A'') lassen klar erkennen, dass im ersten Ansatz (ES3) ein erhöhtes Hintergrundsignal auftrat. Das Hintergrundsignal ist das Signal unter 0 und wird durch die graue Fläche dargestellt. Im Histogramm wird dieses Signal auf die rechte Seite projiziert und mit dem „echten“ Signal (rote Fläche) verglichen. Die rote Fläche zeigt dementsprechend das Signal über dem Hintergrundsignal an. Im Histogramm von ES3 ist die graue Fläche größer als die rote (Abb. 16A). ES4 und ES5 sehen im Gegensatz dazu sehr gut aus (Abb. 16A' und A'').

Für die Ermittlung der angereicherten Regionen (*peaks*) wurden alle drei Replikate zunächst zusammen analysiert. In einem weiteren Schritt wurden dann nur die vermeintlich besseren Daten der Arrays ES4 und ES5 verwendet. Zwar erscheint die Anzahl der ermittelten *peaks* im Vergleich ähnlich, bei einer genaueren Betrachtung wurde jedoch deutlich, dass die Überlappung nicht sehr hoch ist. Die ES3-Daten zeigen, im genomischen Kontext betrachtet (*.sgr files in IGB), einen wesentlich höheren Hintergrund als die beiden anderen Datensätze. Da bei ES4 und ES5 von den zuverlässigeren Ergebnissen auszugehen war, wurde der ES3-Datensatz aus der weiteren Analyse herausgenommen. Auf ähnliche Weise wurde bei den Flügel-Daten vorgegangen. Auch hier zeigte der erste Array (WS1) ein sehr starkes Hintergrundsignal (Abb. 16B). Bei den weiteren Schritten wurde daher nur mit den Datensätzen von WS2 und WS3b (Abb. 16B' und B'') gearbeitet. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass die Daten hauptsächlich von den Ergebnissen des WS3b-Arrays beeinflusst werden.

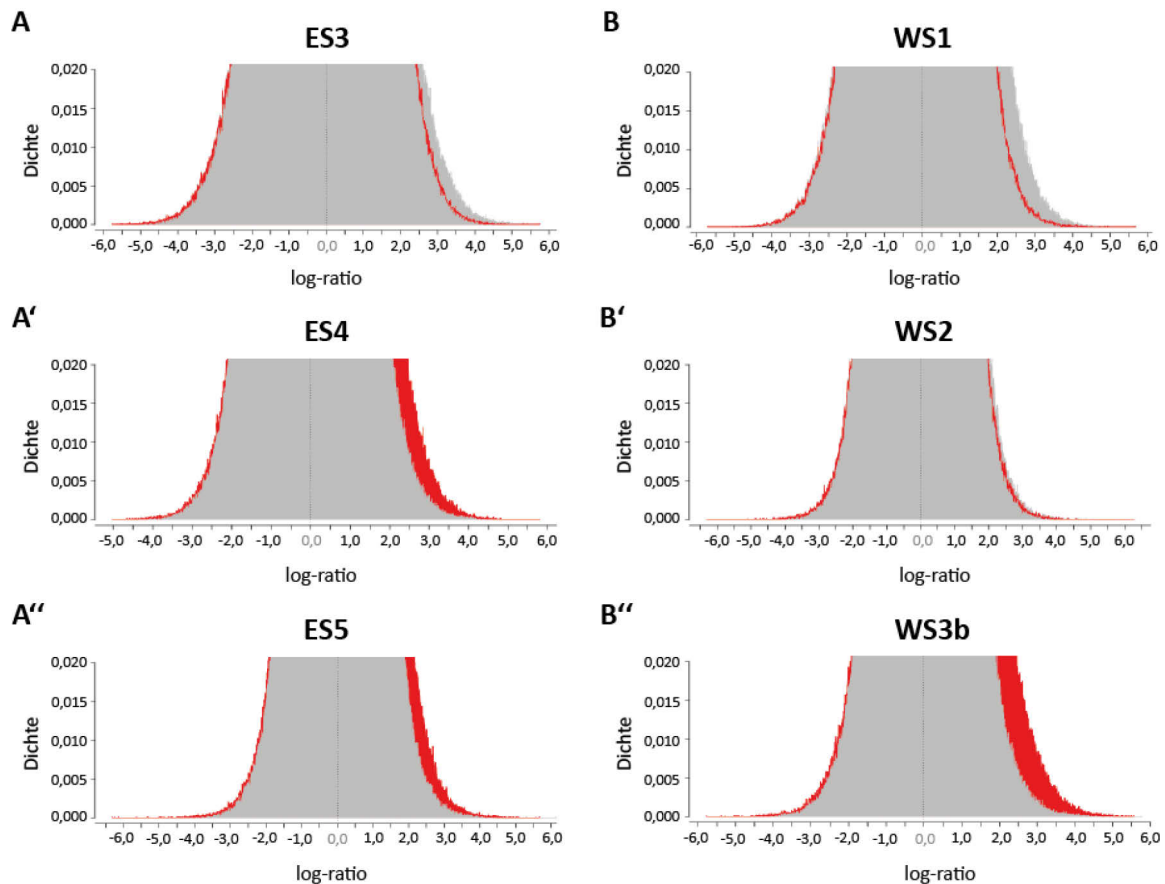


Abb. 16: Histogramme der normalisierten Augen- und Flügeldata der einzelnen Arrays.

Die Abbildungen **(A-A'')** zeigen die Histogramme der Augendaten, die Abbildungen **(B-B'')** diejenigen der Flügeldata. **(A)** Die log-ratio Daten der Probe ES3 zeigen ein stark erhöhtes Hintergrundsignal (graue Fläche), das höher als das echte Signal (rote Fläche) ist. **(B + C)** Die Histogramme der Datensätze ES4 und ES5 weisen ein deutliches Signal über dem Hintergrundsignal auf. Diese Daten wurden für die weitere Auswertung verwendet. **(B)** Die log-ratio Daten der Probe WS1 zeigen ein stark erhöhtes Hintergrundsignal. **(B')** Die Daten von WS2 weisen ebenfalls noch ein deutliches Hintergrundsignal auf, die Daten sind aber prinzipiell besser als von WS1. **(B'')** WS3b liefert den besten Datensatz. Das Signal liegt deutlich über dem Hintergrund.

Zur Visualisierung der angereicherten Regionen (*ChIP-enriched regions*) im genomischen Kontext wurde der Integrated Genome Browser (IGB; gesprochen "IG-bee") verwendet. Dabei wurde als Referenz das *Drosophila melanogaster*-Genom von April_2006 genutzt. Das nahe gelegenste Gen, das innerhalb von 10kb rund um eine angereicherte Region lag, wurde als mögliches Zielgen von Omb festgelegt. Außerdem wurde nach Überlappungen zwischen den Augen-, Flügel- und TBE-Daten gesucht. Die Visualisierung der Daten in IGB ist nachfolgend am Beispiel von *apterous* (*ap*) dargestellt (Abb. 17).

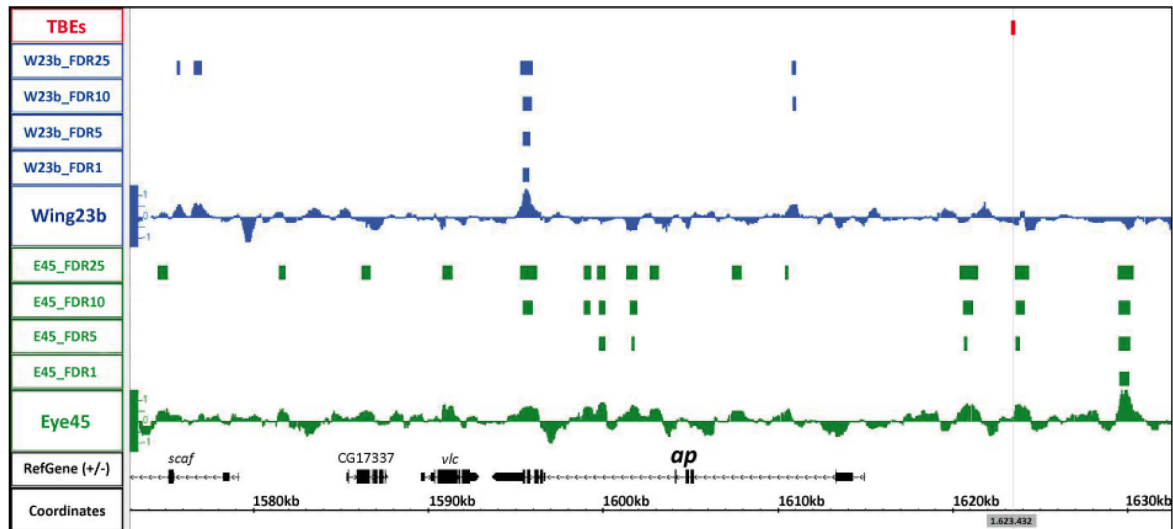


Abb. 17: Visualisierung der identifizierten Omb-Bindestellen im genomischen Kontext mithilfe des Integrated Genome Browsers (IGB).

Als Beispiel dienen hier ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung des Gens *apterous* (*ap*) befinden. Der *ap*-Locus befindet sich auf dem Chr. 2R: 1,593,707-1,615,030. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse für eine FDR von 1%, 5%, 10% und 25%. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Zusätzlich ist eine bioinformatisch ermittelte TBE (bei 1,623,432 Basen, roter Balken) eingetragen. Diese überlappt nicht mit den ChIP-chip definierten Bindestellen.

E45 und W23b bedeutet, dass nur die Replikate Eye4 und 5 bzw. Wing2 und 3b analysiert wurden. Für die Normalisierung wurde die quant-all Methode verwendet. Die angereicherten Regionen wurden dem nahe gelegenen Gen innerhalb von 10kb zugeordnet. Nach einer Lücke von 200bp wurde eine angereicherte Region in zwei Regionen aufgeteilt.

In Microarray-Experimenten ist die Rate falsch-positiver Ergebnisse meist sehr hoch. Daher wird bei der statistischen Auswertung nicht der sonst übliche p-Wert verwendet, sondern die *false discovery rate* (FDR). Der p-Wert wurde zum Testen individueller Hypothesen entwickelt, die FDR ist eine statistische Methode, die beim Testen multipler Hypothesen eingesetzt wird (Pawitan *et al.*, 2005). Die FDR ist der erwartete Anteil falsch-positiver unter allen signifikanten Hypothesen (Benjamini und Hochberg, 1995). Wird zum Beispiel in einer Kollektion von 100 differenziell exprimierten Genen ein FDR von 10% festgelegt, bedeutet dies, dass maximal 10 Gene als falsch-positiv betrachtet werden. In dieser Arbeit wurden FDRs von 1%, 5%, 10% und 25% angewandt (Abb. 18A und C).

Bei einer FDR1 wurden für die Augendaten noch 3959 angereicherten Regionen (*peaks*) festgestellt, für die Flügelaten 3750 (Abb. 18A und C). Davon überlappen nur 1086 Gene. Wiederum nur 65 Genen sind in den Augen-, Flügel- und TBE-Daten zu finden.

Die TBE-Liste enthält 228 Kandidatengene. Davon überlappen 117 mit den ermittelten Bindestellen in den Augendaten und 96 mit denen der Flügelaten (Abb. 18B und D; Tab. 22, Tab. 23). Wobei klar zu stellen ist, dass die potentiellen TBEs dabei in der Regel nicht mit den ermittelten *peaks* direkt überlappen.

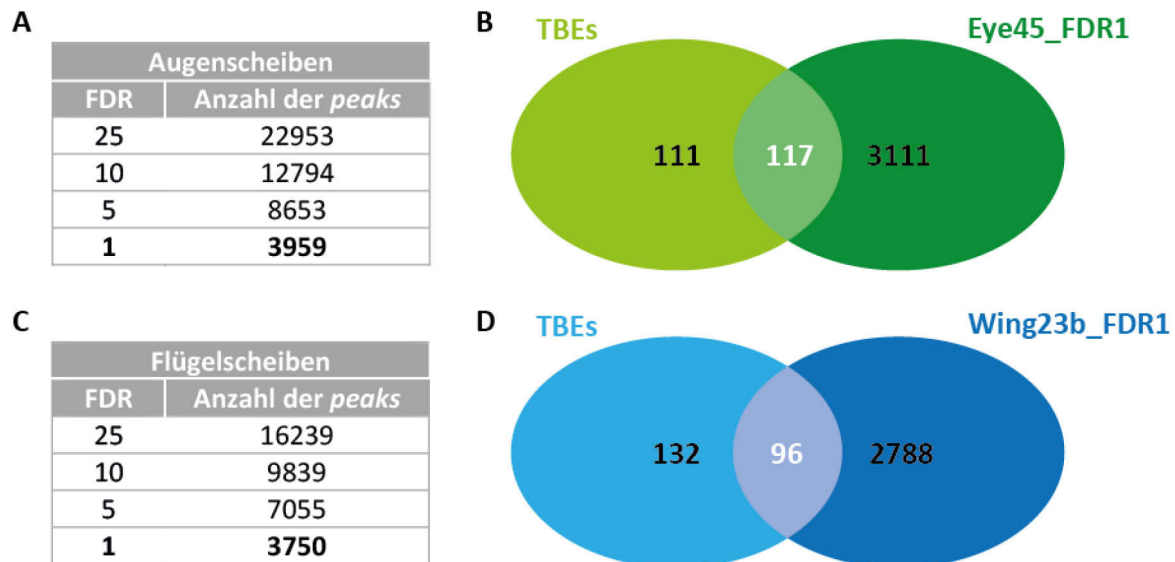


Abb. 18: Vergleich der ermittelten Bindestellen im ChIP-chip mit den bioinformatischen Ergebnissen der TBE-Suche.

(A) Mit dem isolierten Chromatin aus den Augenscheiben konnte bei einer FDR von 1% **3959** Bindestellen (*peaks*) ermittelt werden. (B) Von den ermittelten Bindestellen im Chromatin der Augenscheiben (dunkelgrün) überlappen 117 mit den bioinformatisch vorhergesagten TBEs (hellgrün). (C) Mit dem isolierten Chromatin aus den Flügelscheiben konnte bei einer FDR von 1% **3750** Bindestellen (*peaks*) ermittelt werden. (D) Von den ermittelten Bindestellen im Chromatin der Flügelscheiben (dunkelblau) überlappen 96 mit den bioinformatisch vorhergesagten TBEs (hellblau).

Die weiteren Abbildungen der ChIP-chip-Ergebnisse sind bei der Besprechung der einzelnen Gene in den kommenden Kapiteln bzw. im Anhang dargestellt.

5.1.3.2 Diskussion

Die Anzahl der vermeintlich durch Omb gebundenen Stellen im Genom von *Drosophila melanogaster* ist laut unserer ChIP-chip-Experimente sehr hoch. Die Ergebnisse sollten unsere Kenntnisse aus der bioinformatischen Suche nach TBEs verifizieren bzw. erweitern. Dies ist tatsächlich kaum gelungen. Nur wenige der zugeordneten Gene aus dem ChIP-chip und der Bioinformatik überlappten (Abb. 18), die Bindestellen auf den Chromosomen stimmten nie genau überein. Wo genau nun die Problematik in den beiden Herangehensweisen liegt, ist schwer zu bestimmen.

Im Falle der ChIP-chip-Experimente ist in erster Linie die Frage, ob der Antikörper überhaupt für diesen Versuchsansatz in der verwendeten Verdünnung geeignet ist. In immunhistochemischen Färbungen zeigt er jedoch eine hohe Spezifität und Zuverlässigkeit (Abb. 6). Weiterhin kann es sein, dass die Menge des Ausgangsmaterials nicht ausreichend war.

In Bezug auf die statistische Auswertung ist natürlich bei einer Verwendung der FDR von 1% der Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse recht hoch, sie führt aber auch zu vielen falsch-negativen Ergebnissen. Bei einer so hohen Anzahl an potentiellen Bindestellen musste allerdings eine Eingrenzung stattfinden.

Beide Experimente können somit nur als Ergänzung oder Anregung für weitere Experimente herangezogen werden. Bei der Auswertung dieses Experiments muss auch in Betracht gezogen werden, ob Omb möglicherweise als Co-Repressor oder Co-Aktivator agiert. Zumindest ist in Bezug auf den paralogen Transkriptionsfaktor Tbx2 bekannt, dass die Proliferation in Brustkrebszellen unabhängig von einer TBE gefördert wird. In diesem Fall wirkt Tbx2 als Co-Repressor durch Bindung an EGR1, wodurch das Tumorsuppressorgen *NDRG1* reprimiert wird (Redmond *et al.*, 2010). Ob ein ähnlicher Mechanismus auch für Omb oder andere *Drosophila* Tbx-Proteine in Frage kommt ist nach wie vor unbekannt.

5.2 Untersuchungen zur Expression potentieller Omb-Zielgene in Abhängigkeit von Omb

5.2.1 Bestimmung des Expressionsmusters potentieller Omb-Zielgene in L3-Imaginalscheiben mittels *in situ*-Hybridisierung (ISH)

Basierend auf den Erkenntnissen aus der Bioinformatik und den Chip-on-chips (5.1) sollten einige in der Flügelentwicklung bedeutende Gene auf eine Regulation durch den Transkriptionsfaktor Omb histologisch untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden *in situ*-Hybridisierungen (ISH) an *Drosophila* Imaginalscheiben von *omb*³¹⁹⁸-mutanten Larven im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt.

Die *in situ*-Hybridisierung (ISH), wie sie hier praktiziert wurde, dient dem direkten und spezifischen Nachweis von *mRNA* im Gewebe (*in situ*) der Imaginalscheiben (4.3.6). Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Erkennung der jeweiligen RNA durch Hybridisierung einer Digoxigenin (DIG)-markierten *antisense* Sonde (4.4.14). Der Nachweis erfolgt über die Bindung eines Antikörpers, an den eine Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Dieses Enzym setzt das Substrat NBT/BCIP zu einem blau-violetten Präzipitat um, wodurch die Expression eines bestimmten Gens visualisiert werden kann. Somit kann letztlich die spezifische *mRNA*-Verteilung im Gewebe unter dem Mikroskop betrachtet werden. Die *in situ*-Hybridisierung ermöglicht demnach die Bestimmung der örtlichen und zeitlichen Expression eines Gens und liefert dadurch unter anderem Hinweise auf seine mögliche Funktion.

In der nachfolgenden Tabelle sind diejenigen Sonden aufgelistet, die in dieser Arbeit besprochen werden (Tab. 12). Die Darstellung der Expressionsmuster erfolgt in den nachfolgenden Kapiteln. Weitere Sonden, die nicht zum Einsatz kamen, befinden sich im Anhang (Tab. 24).

Tab. 12: *antisense* RNA-Sonden für *in situ*-Hybridisierungen (Teil 1)

Bezeichnung	Gen	Verdünnung	Primer*	Länge [bp]	RNA-Pol	Matrize**
<i>al</i>	<i>aristaless</i>	1:100	1821, 1822	186	T7	PCR-Produkt
<i>ap</i>	<i>apterous</i>	1:100	1819, 1820	96	T7	PCR-Produkt
<i>boi</i>	<i>brother of ihog</i>	1:100	1737, 1738	342	T7	PCR-Produkt
<i>botv</i>	<i>brother of tout-velu</i>	1:100	1727, 1728	386	T7	PCR-Produkt
CR42862	CR42862	1:500	1591, 1592	293	T7	PCR-Produkt
<i>dally</i>	<i>division abnormally delayed</i>	1:100	1731, 1732	393	T7	PCR-Produkt
<i>disp</i>	<i>dispatched</i>	1:100	1723, 1724	483	T7	PCR-Produkt
<i>dlp</i>	<i>dally-like</i>	1:500	1587, 1588	369	T7	PCR-Produkt
<i>Flo-2</i>	<i>Flotillin 2</i>	1:100	1739, 1740	304	T7	PCR-Produkt
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>	1:100	1733, 1734	483	T7	PCR-Produkt
<i>ihog</i>	<i>Interference hedgehog</i>	1:100	1735, 1736	343	T7	PCR-Produkt
MMP1	<i>Matrix metalloproteinase 1</i>	1:100	1896, 1897	134	T7	PCR-Produkt
MMP2	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>	1:100	1424, 1425	1128	T7	cDNA

Bezeichnung	Gen	Verdünnung	Primer*	Länge [bp]	RNA-Pol	Matrize**
<i>msh</i>	<i>muscle segment homeobox</i>	1:100	/	2546	T7	LD04235
<i>shf</i>	<i>shifted</i>	1:100	1729, 1730	345	T7	PCR-Produkt
<i>ttv</i>	<i>tout-velu</i>	1:100	1725, 1726	336	T7	PCR-Produkt

Pol: Polymerase

* **Anmerkung:** Die Sequenzen der genutzten Primer sind in Tab. 30 (7.9.1) zu finden.

****Anmerkungen** (zur Herstellung der Sonden, siehe auch 4.4.14):

PCR-Produkt: über T7-Promotor-Sequenz an 3'-Primer der relevanten DNA-Sequenz

cDNA: selbst hergestellte cDNA im pCR-XL-Topo-Vektor

EST-Klon LD04235: cDNA im Vektor pBS SK-; mit XbaI linearisiert

5.2.2 Etablierung der quantitativen RealTime-PCR (qPCR) für Expressionsstudien in *omb*-mutanten Flügelscheiben im Vergleich zum Wildtyp

Die quantitative PCR (qPCR) sollte in dieser Arbeit genutzt werden, um die relative Expression bestimmter potentieller Zielgene von Omb in Lysaten aus L3-Flügelimaginalscheiben von *omb*³¹⁹⁸-mutanten und *FM-GFP*-Kontrolltieren zu ermitteln.

Im Unterschied zu dem herkömmlichen Verfahren ermöglicht die qPCR eine Kombination der Amplifikation eines bestimmten Genabschnitts mit der direkten Detektion des Produkts im Reaktionsgefäß. Bei der Primerwahl wurde vor allem darauf geachtet, dass die Primerpaare eine Exon-Exon-Verbindung einschließen und somit während der Amplifikation die Differenzierung der cDNA von einer Kontamination mit genomischer DNA ermöglicht wird.

Die Quantifizierung des PCR-Produkts erfolgt durch die Nutzung des unspezifischen DNA-Farbstoffs SYBR®-Green. Durch die Bindung an doppelsträngige DNA-Abschnitte entsteht ein Fluoreszenzsignal, dessen Intensität proportional zur Konzentration der amplifizierten DNA ist. Das Gerät erstellt durch die Messung der Fluoreszenz am Ende eines jeden Zyklus einen Amplifikations-Plot, der die Akkumulation des PCR-Produkts über den zeitlichen Verlauf darstellt (Abb. 19).

Die relative Expression der Gene wird mithilfe des C_T-Werts (*cycle threshold*) ermittelt. Dieser gibt an, in welchem Zyklus erstmals ein PCR-Produkt und somit ein signifikantes Fluoreszenzsignal oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts entsteht (Abb. 19). Der Schwellenwert wird vom Gerät automatisch festgelegt. Der C_T-Wert ist umgekehrt proportional zur Expressionsrate eines Gens. Je höher der C_T-Wert ist, desto geringer ist die Expression des Gens und umgekehrt.

Die Normalisierung der Messung erfolgt über die endogene Kontrolle. In meinem Versuchsansatz wurde dafür das *rp49*-Gen verwendet, welches für ein ribosomales Protein in *Drosophila* kodiert. Das Expressionslevel der endogenen Kontrolle sollte in verschiedenen Versuchsansätzen oder verschiedenen Geweben nicht variieren. Um eine relative Quantifizierung durchzuführen wird der C_T-Wert des Zielgens vom C_T-Wert des jeweiligen Referenzgens abgezogen: $\Delta C_T = C_T(\text{rp49}) - C_T(\text{Zielgen})$. Anschließend wird die Differenz der ΔC_T -Werte der einzelnen Gruppen gebildet: $\Delta \Delta C_T = \Delta C_T(\text{omb}^{3198}) - \Delta C_T(\text{FM-GFP})$. Die relativen Expressionsraten (RQ-Werte) können dann anhand des

$2^{\Delta\Delta CT}$ -Werts miteinander verglichen werden. Werte kleiner 1 zeigen eine geringere Expression eines Gens im *omb*-mutanten Hintergrund verglichen mit der *FM-GFP*-Kontrolle.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Statistica 13. Die Rohdaten dieser Auswertung sind im Anhang (Tab. 25, Tab. 26) dargestellt.

Einige Kandidatengene wurden aufgrund unterschiedlicher Überlegungen von der weiteren Betrachtung ausgenommen. In diesen Fällen wurde das Experiment nur jeweils einmal in technischen Triplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt (Tab. 27).

Nachfolgend sind diejenigen Kandidatengene tabellarisch aufgelistet, welche weitergehend untersucht wurden (Tab. 13). Die Ergebnisse werden ab Abschnitt 5.4 im Detail besprochen.

Tab. 13: qPCR-Kandidatengene

Gen	Bezeichnung	CG-Nummer	Primer-Nr.*
<i>al</i>	<i>aristaless</i>	CG3935	1459/1460
<i>ap</i>	<i>apterous</i>	CG8376	1463/1464
<i>boi</i>	<i>brother of ihog</i>	CG32796	1607/1608
<i>botv</i>	<i>brother of tout-velu</i>	CG15110	1609/1610
CR42862	CR42862	/	1475/1476
<i>dally</i>	<i>division abnormally delayed</i>	CG4974	1621/1622
<i>disp</i>	<i>dispatched</i>	CG2019	1623/1624
<i>dlp</i>	<i>dally-like</i>	CG32146	1625/1626
<i>e</i>	<i>ebony</i>	CG3331	1552/1553
<i>Flo-2</i>	<i>Flotillin 2</i>	CG32593	1629/1630
<i>fz3</i>	<i>frizzled 3</i>	CG16785	1481/1482
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>	CG4637	1445/1446
<i>ihog</i>	<i>interference hedgehog</i>	CG9211	1633/1634
<i>msh</i>	<i>muscle-segment homeobox</i>	CG1897	1493/1494
<i>shf</i>	<i>shifted</i>	CG3135	1653/1654
<i>ttv</i>	<i>tout-velu</i>	CG10117	1717/1718
<i>wg</i>	<i>wingless</i>	CG4889	1455/1456
<i>y</i>	<i>yellow</i>	CG3757	1659/1660

*Anmerkung: Die Sequenzen der genutzten Primer sind in Tab. 34 (7.9.5) zu finden.

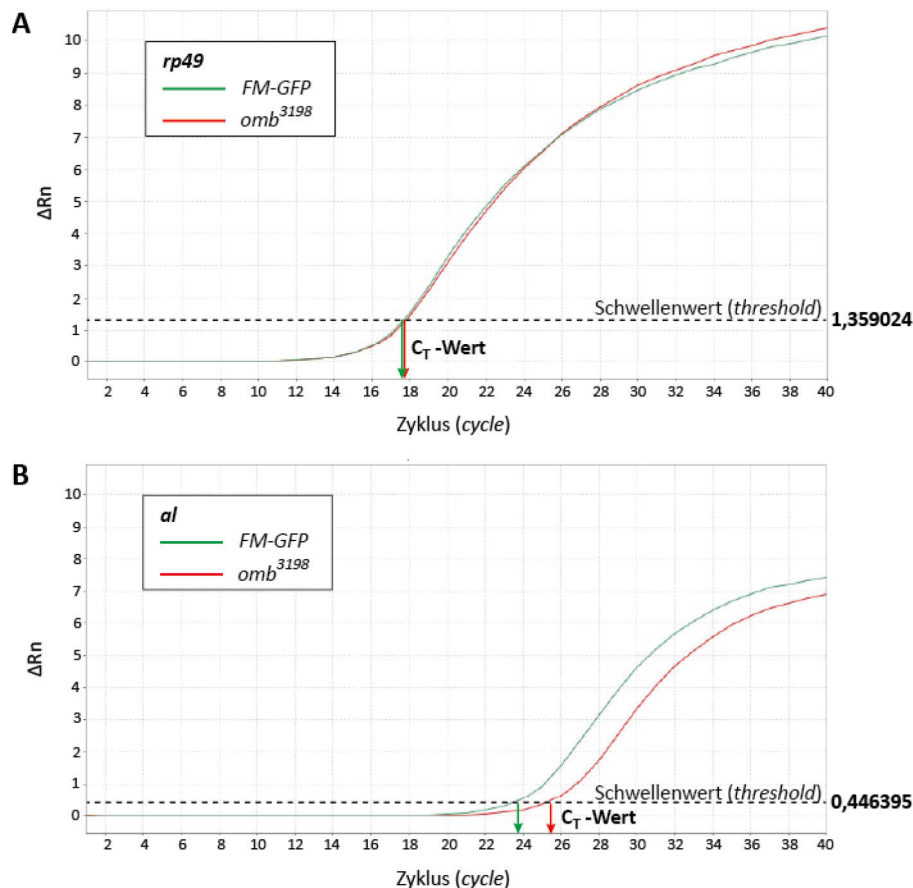


Abb. 19: Darstellung des Amplifikationsverlaufs in einer qPCR und Bestimmung des C_T-Wertes am Beispiel von *rp49* und *al*.

Die Quantifizierung des PCR-Produkts erfolgt durch die Bindung des unspezifischen DNA-Farbstoffs SYBR®-Green an doppelsträngige DNA-Abschnitte. Durch die Messung der Fluoreszenz am Ende eines jeden Zyklus erstellt der StepOnePlus™ einen Amplifikations-Plot, der die Akkumulation des PCR-Produkts über den zeitlichen Verlauf darstellt. In (A) und (B) ist die Amplifikation der endogenen Kontrolle *rp49* sowie des Kandidatengens *al* in der Kontrolle (FM-GFP, grüne Kurve) und der Mutante (rote Kurve) dargestellt. Aufgetragen ist das normalisierte, *baseline*-korrigierte Fluoreszenzsignal gegen die Zyklenzahl. Zur Normalisierung subtrahiert das Gerät das Fluoreszenzsignal des passiven Referenzfarbstoffs ROX vom Signal des SYBR®-Greens (Rn). Um den ΔRn-Wert zu erhalten wird dann die *Baseline* vom normalisierten Reportersignal abgezogen. Die *Baseline* ist das Hintergrund-Signal, welches in den frühen Zyklen ohne Amplifikation auftritt. Der Wert wird automatisch vom Gerät festgelegt. Die relative Expression der Gene wird mithilfe des C_T-Werts (*cycle threshold*) ermittelt. Dieser gibt an, in welchem Zyklus erstmals ein PCR-Produkt und somit ein signifikantes Fluoreszenzsignal oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts (*threshold*) entsteht. Der Schwellenwert wird vom Gerät jeweils auch automatisch festgelegt und ist in den Graphen durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben. Die C_T-Werte werden durch einen roten und grünen Pfeil dargestellt. (A) zeigt den Amplifikationsplot der endogenen Kontrolle *rp49*. Der C_T-Wert unterscheidet sich in der Kontrolle und der Mutante kaum und zeigt an, dass hier keine Regulation stattfindet, wie es für die endogene Kontrolle notwendig ist. In (B) zeigen die Amplifikationsverläufe des Produkts *al* deutliche Unterschiede. Der C_T-Wert der Kontrolle (FM-GFP) liegt bei 23,72 und derjenige der Mutante bei 25,46. Da der C_T-Wert umgekehrt proportional zur Expressionsrate eines Gens ist, bedeutet dies im mutanten Hintergrund eine geringere Expression von *al* als im Wildtyp.

5.3 Herstellung von *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukten und Analyse ihrer Aktivität in Abhängigkeit von Tbx-Proteinen

5.3.1 Strategie zur Herstellung der *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukte

Da für die Mehrzahl der potentiellen Omb-Zielgene keine kommerziellen *lacZ*-Enhancer-Reporter Linien zur Verfügung stehen, sollten im Rahmen dieser Arbeit einige ausgewählte *lacZ*-Enhancer-Reporter-Konstrukte hergestellt werden. Die Grundlage dafür bildet die bioinformatischen Suche nach TBEs im Genom von *Drosophila melanogaster* (Binbas, 2009). In *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukten steht das Reportergen *lacZ* unter der Kontrolle eines potentiellen Enhancer-Fragments eines bekannten Gens. Dieser Abschnitt regulatorischer DNA wurde hier jeweils aufgrund einer vorhergesagten TBE und einer starker Konservierung innerhalb der verschiedenen *Drosophila*-Spezies ausgewählt (Abb. 20, 1 und 2). Die chromosomale Lokalisation wurde gemäß Flybase Version FB2012_06, r5.48 festgelegt.

Die jeweilige genomische Region von Interesse wurde zunächst per Long Range PCR oder mit der KAPAHifi™ Polymerase (4.4.10) amplifiziert (Abb. 20, 3). Unter optimalen Bedingungen entstanden dabei spezifische Banden. In diesen Fällen wurde das Amplifikat mit dem High Pure PCR Product Purification Kit von Roche (4.1.6) für die weiteren Schritte aufgereinigt. Beim Auftreten unspezifischer Banden wurde hingegen eine Gelextraktion des PCR-Produkts durchgeführt (4.4.2). Im Anschluss erfolgte die Klonierung der PCR-Produkte in den pCR8®/GW/Topo®-Vektor (Abb. 20, 3.2), der als Subklonierungsvektor dient (4.4.5.1). Der Vorteil ist, dass dieser Vektor die "Topo-Cloning"-Strategie mit der Gateway-Technologie (4.4.5.2) kombiniert und so eine schnelle und effiziente Klonierungsarbeit ermöglicht.

Die rekombinanten Plasmide wurden mittels Minipräparation isoliert und durch eine Restriktionsanalyse mit nachfolgender Gelelektrophorese charakterisiert (4.4.1, 4.4.3 und 4.4.8). Sofern ein positiver Klon identifiziert wurde, erfolgte die LR-Rekombination (4.4.5.2) zwischen dem pCR8®/GW/Topo®-Vektor und dem Expressionsvektor pGW-attB-lacZ (Abb. 20, 3.3 und Abb. 51). Letzteren konstruierte ich während meiner Diplomarbeit (Hoffmann, 2011), basierend auf dem Vektor pBPGUw, in dem ich die GAL4-Kassette durch ein *lacZ*-Fragment aus dem pHPelican (Barolo *et al.*, 2000) ersetzte.

Da die LR-Rekombination sehr effizient abläuft wurden in der Regel nur zwei Klone mittels Minipräparation analysiert. Nach der Überprüfung der Sequenz durch eine Sequenzierung (Abb. 20, 3.4 und 4.4.13) wurden die Expressionskonstrukte per Midipräparation aufgereinigt (4.4.8), um eine ausreichende DNA-Menge für die nachfolgende Injektion (Abb. 20, 4) zu isolieren. Für die Injektion wurden spezielle Linien mit definierten Insertionsstellen verwendet (4.1.11). Nach der Fliegentransformation und anschließenden Kreuzungen zur Generierung eines homozygoten

Stamms (4.2.5 und Abb. 20, 5) konnte die Expression des Reportergens *lacZ* in Imaginalscheiben mittels X-Gal Färbung von L3-Larven analysiert werden (4.3.2.1 und Abb. 20, 6). Da der Expressionsvektor den jeweils zu untersuchenden DNA-Abschnitt enthält, ist das Expressionsmuster unabhängig vom Insertionsort des Konstrukts im Genom. Die Expression im *omb*-defizienten Hintergrund (5.3.4) kann darüber hinaus Aufschluss über eine mögliche Regulation des jeweiligen Gens durch Omb geben.

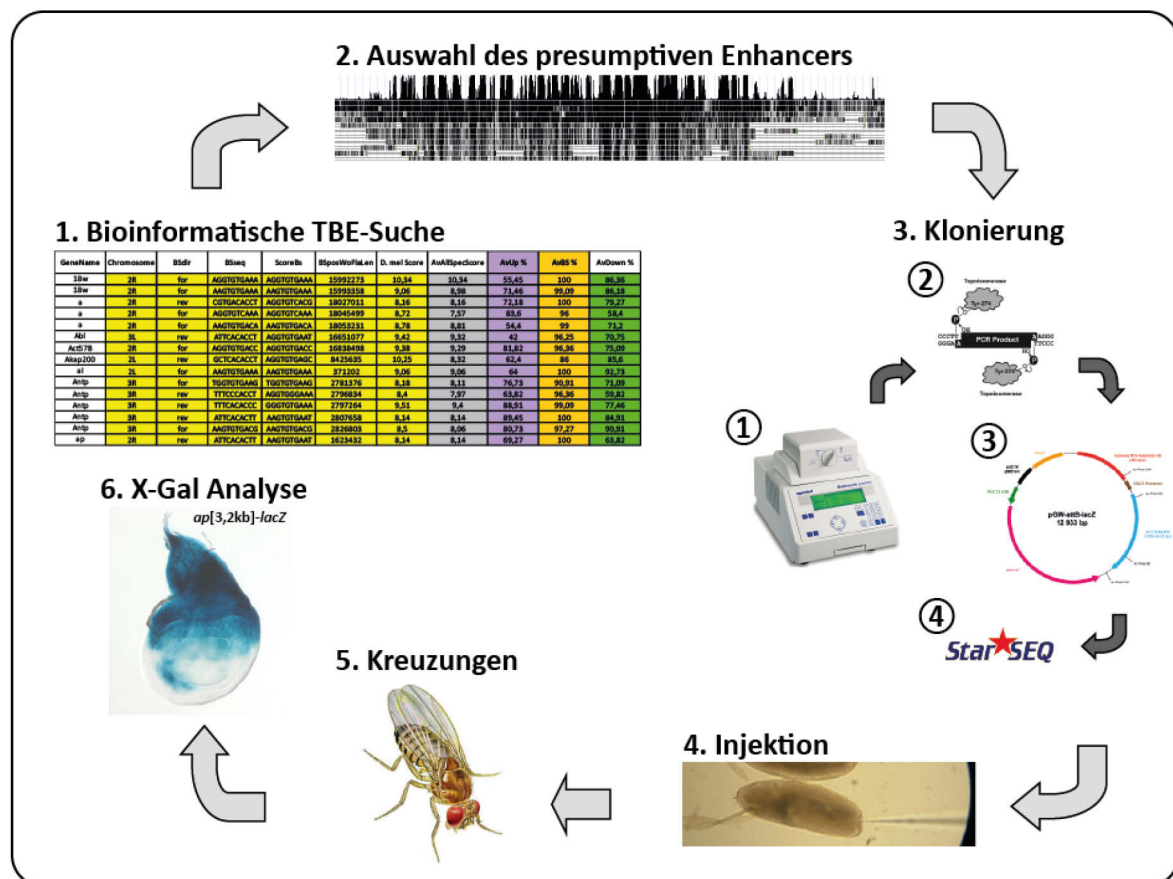


Abb. 20: Strategie zur Herstellung von *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukten (am Beispiel von *apterous*).

Vor der Herstellung des eigentlichen Konstrukts muss zunächst die zu klonierende Region definiert werden. Ausgangspunkt hierfür ist die bioinformatische Suche nach TBEs im Genom von *Drosophila* (Binbas, 2009) (1). Zu sehen ist ein Ausschnitt der vorliegenden TBE-Liste mit Daten wie z. B. der genauen Lokalisation und der Konservierung der TBE. Mithilfe des UCSC Genome Browser (Apr. 2006/BDGP R5/dm3) wird anschließend die potentielle Enhancer-Region ermittelt (2). Dargestellt ist die presumptive Enhancer-Region des Gens *apterous* (*ap*). Dieser hochkonservierte Bereich umfasst 3228bp und befindet sich im *upstream*-Bereich der für *ap* kodierenden Region auf dem 2. Chromosom (2R: 1,621,929-1,625,156). Die TBE ist im Bereich von 1,623,432 Basen lokalisiert. Für diesen 3,2kb-großen Bereich wurden spezifische Primer hergestellt, um die genomische Region mittels PCR zu amplifizieren (3.1) (siehe 4.4.10). Das Amplifikat wurde zunächst in den pCR8®/GW/Topo-Vektor (pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit User Guide; Abb. 10) kloniert (3.2), um ihn anschließend mittels Gateway-Klonierung in den Expressionsvektor pGW-attB-lacZ zu überführen (3.3) (siehe 4.4.5). Die Sequenz wurde mittels Sanger-Sequenzierung bei StarSEQ auf Fehler überprüft (3.4) (siehe 4.4.13). Im Anschluss wurden die Konstrukte in spezielle Linien injiziert, um transgene Fliegen herzustellen (4) (siehe 4.2.3, 4.2.4). Sofern nach der Injektion Transformanten schlüpfen wurden diese mehrfach verkreuzt, um schlussendlich einen homozygot transgenen Stamm zu erhalten (5) (siehe 4.2.5). Die Aktivität des presumptiven Enhancers wurde dann mittels X-Gal Färbung an Imaginalscheiben aus L3-Larven analysiert (6) (siehe 4.3.2.1). Dargestellt ist eine X-Gal Färbung an einer Flügelimaginalscheibe des Stamms *ap[3,2kb]-lacZ*. Zu erkennen ist die für *ap* typische Expressionsdomäne im Bereich des dorsalen Kompartiments.

5.3.2 Übersicht aller *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 32 *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukte hergestellt bzw. fertig gestellt. Für einige führte ich die Subklonierung bereits während meiner Diplomarbeit (Hoffmann, 2011) durch.

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Zusammenstellung aller Konstrukte, die bearbeitet wurden (Tab. 14). Einige Konstrukte konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr injiziert werden. Diese sind im Anhang tabellarisch aufgelistet (Tab. 28). Sofern die Konstrukte ein verwertbares Expressionsmuster wiedergaben, sind die entsprechenden Abbildungen der Imaginalscheiben in den nachfolgenden Kapiteln in der Besprechung der einzelnen Kandidatengene dargestellt.

Tab. 14: Aufstellung der *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukte

Bezeichnung	Gen	Primer*	Länge [bp]	Chromosomale Lokalisation**	TBE-Lokalisation
<i>al</i>	<i>aristaless</i>	1186, 1187	5244	2L: 368,956-374,199	371,202
<i>alTBEmut</i>	<i>aristaless</i>	1410, 1411	5244	2L: 368,956-374,199	371,202
<i>ap[1,2kb]</i>	<i>apterous</i>	1412, 1413	1231	2R: 1,622,935-1,624,166	1,623,432
<i>ap[3,2kb]</i>	<i>apterous</i>	1188, 1189	3228	2R: 1,621,929-1,625,156	1,623,432
<i>ap[3,2kb]TBEmut</i>	<i>apterous</i>	1408, 1409	3228	2R: 1,621,929-1,625,156	1,623,432
<i>BH1</i>	<i>Bar-H1</i>	1192, 1193	5001	X: 17,300,523-17,305,523	17,302,182/ 17,302,270/ 17,304,744
<i>brk</i>	<i>brinker</i>	1194, 1195	1621	X: 7,214,171-7,215,791	7,214,632
<i>crc</i>	<i>cryptocephal</i>	1202, 1203	2151	2L: 21,319,711-21,321,861	21,320,394
<i>dve</i>	<i>devective proventriculus</i>	1206, 1207	3009	2R: 18,164,903-18,167,911	18,165,193
<i>fz3</i>	<i>frizzled3</i>	1208, 1209	2483	X: 672,751-675,233	672,885
<i>midH15</i>	<i>midline/H15</i>	1390, 1391	4112	2L: 5,482,071-5,486,182	5,484,423
<i>rn</i>	<i>rotund</i>	1216, 1217	4269	3R: 3,122,174-3,126,442	3,122,397
<i>Sox15</i>	<i>Sox box protein 15</i>	1220, 1221	2788	2R: 10,094,120-10,096,907	10,095,372
<i>tty</i>	<i>tweety</i>	1224, 1225	762	X: 21,209,670-21,210,431	21,210,012
<i>vvl</i>	<i>ventral veins lacking</i>	1228, 1229	1211	3L: 6,777,873-6,779,083	6,778,400
<i>wg</i>	<i>wingless</i>	1232, 1233	3574	2L: 7,302,737-7,306,310	7,304,515
<i>zfh1</i>	<i>Zn finger homeodomain 1</i>	1234, 1235	2620	3R: 26,595,038-26,597,657	26,595,664

* **Anmerkung:** Die Sequenzen der genutzten Primer sind in Tab. 31 (7.9.2) zu finden.

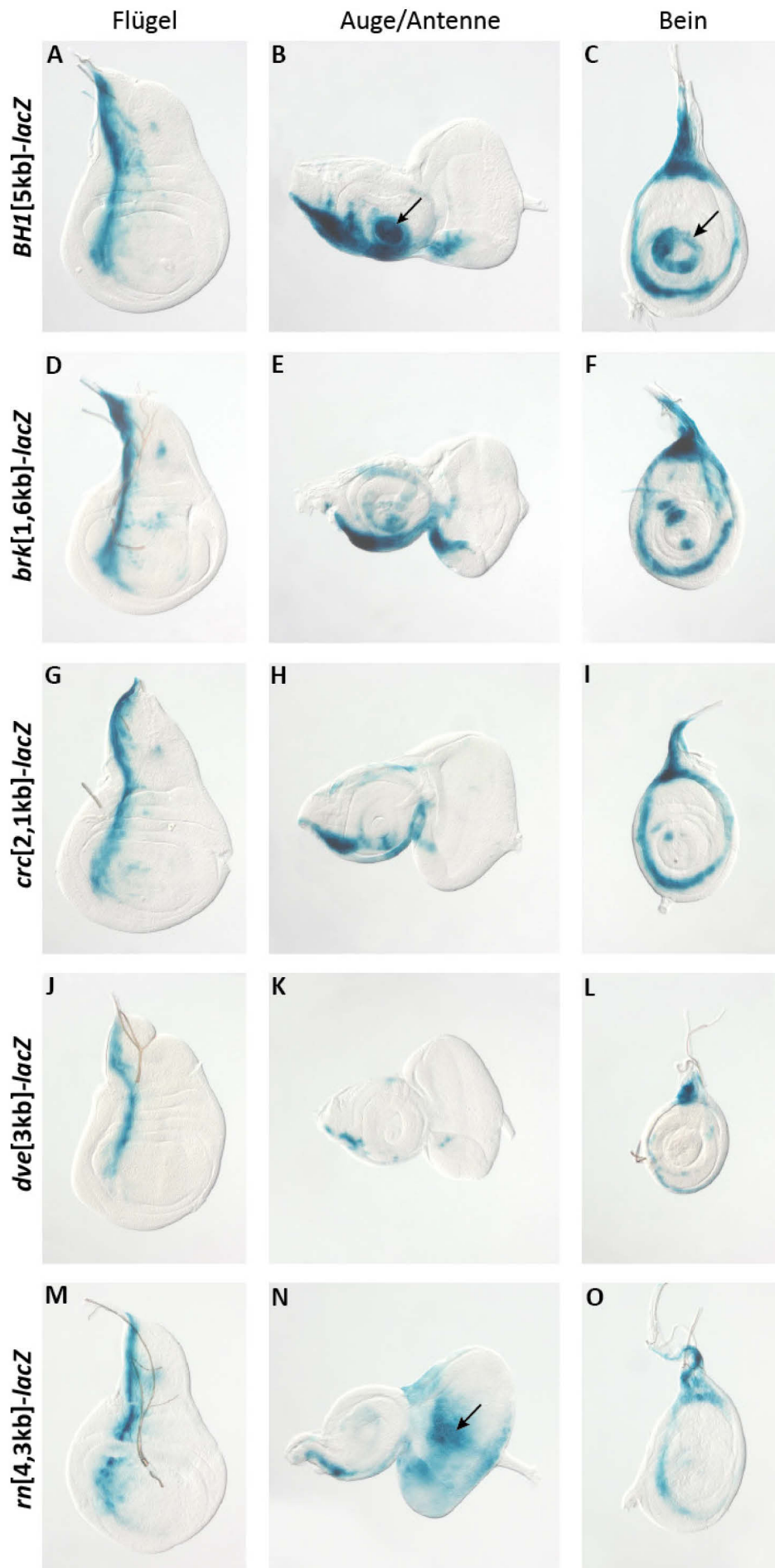
****Anmerkung:** gemäß Flybase Version FB2012_06, released November 6th, 2012

5.3.3 Der Insertionsort 58A führt zu einer Artefakt-Färbung in den Imaginalscheiben

Die ersten Konstrukten wurden über die Firma Rainbow Transgenic Flies, Inc. in die attP-Linie 24484 injiziert (Tab. 9). Dabei inseriert das Konstrukt an der chromosomalen Lokalisation 2R, 58A3. Obwohl bei einigen Larven in der späteren Analyse tatsächlich ein spezifisches Expressionsmuster zu erkennen war, wiesen alle Scheiben eine zusätzliche, unspezifische Färbung auf (Abb. 21, Abb. 22). In der Flügelscheibe war diese Färbung auf die Peripodialmembran begrenzt, einem dünnen Epithel, das dem dickeren Säulenepithel aufliegt. In den Augen-/Antennenimaginalscheiben trat eine Färbung am ventralen Rand unabhängig vom jeweiligen Enhancer auf, in den Beinimaginalscheiben war stets eine konzentrische Färbung am äußeren Rand zu beobachten. Nachfolgend ist eine Darstellung der Kandidaten zu sehen, die keine oder nur eine geringe spezifische Expression im wildtypischen Hintergrund aufwiesen. Zu sehen ist je ein Beispiel für die Flügel-, die Augen- und die Beinimaginalscheibe der Konstrukte für *BH1*, *brk*, *crc*, *dve*, *rn* (Abb. 21), *Sox15*, *tty*, *vvl*, *wg* und *zfh1* (Abb. 22). Die Abbildung soll das Auftreten der Artefakt-Färbung verdeutlichen.

Abb. 21 (auf der nachfolgenden Seite): Die Imaginalscheiben einiger *lacZ*-Enhancer-Reporter Stämme (*BH1*, *brk*, *crc*, *dve* und *rn*) weisen eine insertionsbedingte (58A) Artefakt-Färbung (X-Gal) auf.

Die Abbildung zeigt je ein Exemplar der verschiedenen Imaginalscheiben (Flügel, Auge/Antenne und Bein) von L3-Larven bestimmter *lacZ*-Enhancer-Reporter Stämme (Injektionsstamm: 24484, chr. L.; 2R, 58A3), welche mittels X-Gal gefärbt wurden: **(A-C)** *BH1*[5kb]-*lacZ*, **(D-F)** *brk*[1,6kb]-*lacZ*, **(G-I)** *crc*[2,1kb]-*lacZ*, **(J-L)** *dve*[3kb]-*lacZ*, **(M-O)** *rn*[4,3kb]-*lacZ*. Die Flügelimaginalscheiben der verschiedenen Stämme **(A, D, G, J, M)** zeigen alle eine sehr ähnliche Färbung im anterioren Bereich der Peripodialmembran. Die Augenimaginalscheiben **(B, E, H, K, N)** weisen eine Blau-Färbung am ventralen Rand der Antennenscheibe und am ventralen vorderen Rand der Augenscheibe auf. Diese Färbung war in allen Augen-/Antennenimaginalscheiben vorhanden. Die Scheiben der Stämme *BH1*[5kb]-*lacZ* **(B)** und *rn*[4,3kb]-*lacZ* **(N)** weisen jedoch eine zusätzliche Färbung auf. Im Falle von *BH1* **(B)** ist eine konzentrische Färbung des Arista-Vorläufers zu erkennen (Pfeil), die *rn* **(N)**-Scheibe zeigt eine diffuse Färbung im Bereich der Augenscheibe (Pfeil). Die Beinscheiben **(C, F, I, L, O)** weisen jeweils einen mehr oder weniger gut sichtbaren, konzentrischen Ring entlang des Scheibenrandes auf, der sich im dorsalen Bereich bis in den Strunk fortsetzte. Dieser verbindet die Scheibe mit der larvalen Epidermis. Einzelne punktuelle Färbungen sind darüber hinaus noch im mittleren Bereich der Scheiben zu sehen. Auch hier bildet die *BH1* **(C)**-Scheibe eine Ausnahme: die zentrale Falte ist ringförmig gefärbt (Pfeil). Die Scheiben wurden je über Nacht mit X-Gal gefärbt und mit einer 100-fachen Vergrößerung am Lichtmikroskop dokumentiert.



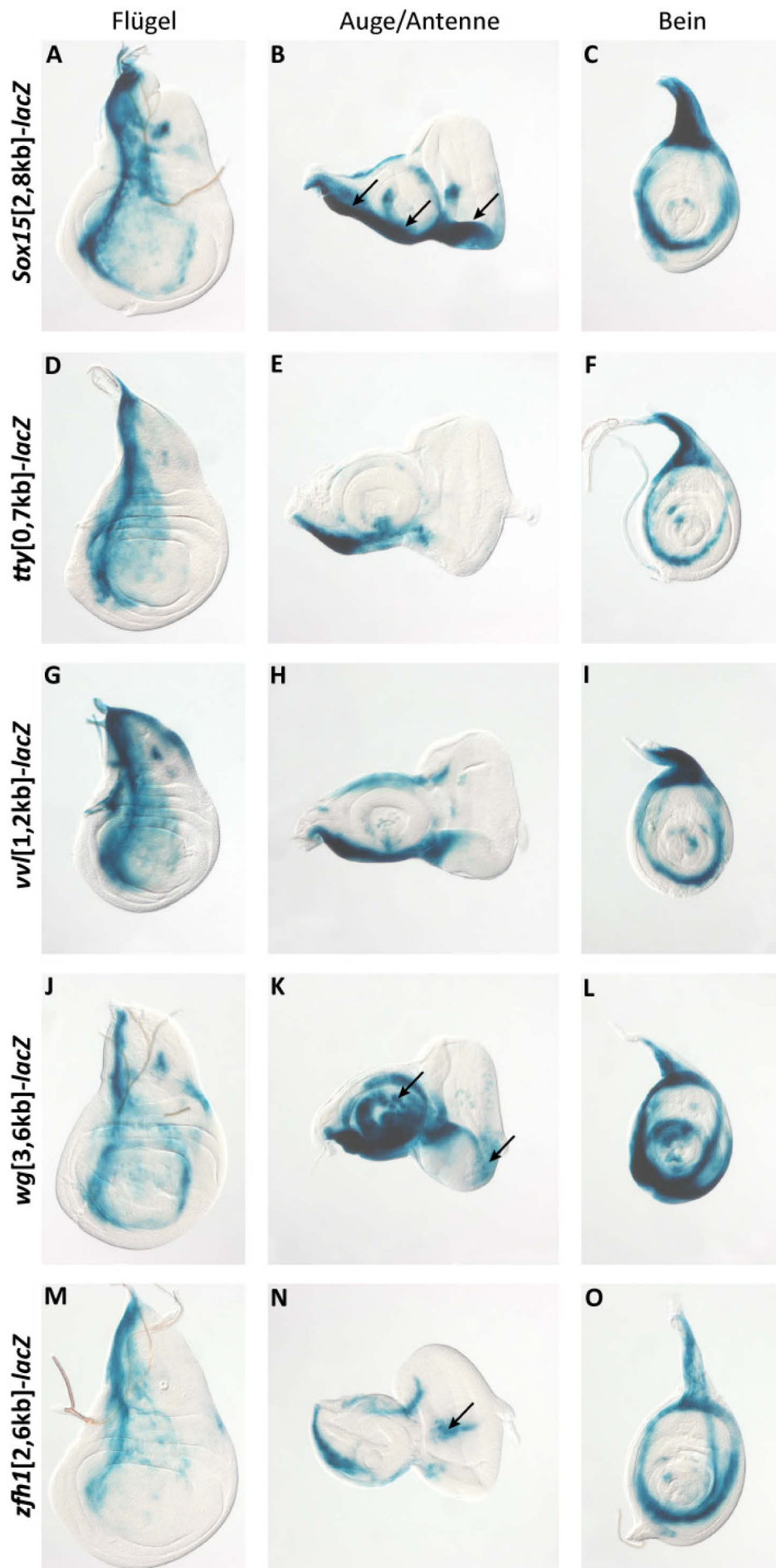


Abb. 22 (auf der vorherigen Seite): Die Imaginalscheiben einiger *lacZ*-Enhancer-Reporter Stämme (*Sox15*, *tty*, *vvl*, *wg* und *zfh1*) weisen eine insertionsbedingte (58A) Artefakt-Färbung (X-Gal) auf.

Die Abbildung zeigt je ein Exemplar der verschiedenen Imaginalscheiben (Flügel, Auge/Antenne und Bein) von L3-Larven bestimmter *lacZ*-Enhancer-Reporter Stämme (Injektionsstamm: 24484, chr. L.; 2R, 58A3), welche mittels X-Gal gefärbt wurden: **(A-C)** *Sox15*[2,8kb]-*lacZ*, **(D-F)** *tty*[0,7kb]-*lacZ*, **(G-I)** *vvl*[1,2kb]-*lacZ*, **(J-L)** *wg*[3,6kb]-*lacZ*, **(M-O)** *zfh1*[2,6kb]-*lacZ*. Die Flügelimaginalscheiben der verschiedenen Stämme **(A, D, G, J, M)** zeigen alle eine sehr ähnliche Färbung im anterioren und medialen Bereich der Peripodialmembran. Die Augen-/Antennenimaginalscheiben **(B, E, H, K, N)** weisen eine Blau-Färbung am ventralen und manchmal auch am dorsalen Rand der Antennenscheibe und am ventralen vorderen Rand der Augenscheibe auf. Diese Färbung war in allen Augen-/Antennenimaginalscheiben vorhanden. Die Scheiben der Stämme *Sox15*[2,8kb]-*lacZ* **(B)**, *wg*[3,6kb]-*lacZ* **(K)** und *zfh1*[2,6kb]-*lacZ* **(N)** weisen jedoch zusätzliche Färbungen auf. Im Falle von *Sox15* **(B)** ist die ventrale Färbung wesentlich ausgeprägter als in den anderen Fällen und nimmt auch den kompletten ventralen Rand der Augenscheibe ein (Pfeil). Die *wg* **(K)**-Scheibe zeigt eine ausgeprägtere Färbung im Bereich der Antennenscheibe (Pfeil) und in der ventralen Augenscheibe (Pfeil). In der *zfh1* **(N)**-Scheibe findet sich eine zusätzliche mediale Färbung im Bereich der Augenscheibe (Pfeil). Die Beinscheiben **(C, F, I, L, O)** weisen jeweils einen mehr oder weniger gut sichtbaren, konzentrischen Ring entlang des Scheibenrandes auf, der sich im dorsalen Bereich bis in den Strunk fortsetzt. Dieser verbindet die Scheibe mit der Larve. Einzelne punktuelle Färbungen sind darüber hinaus noch im mittleren Bereich der Scheiben zu sehen. Die Scheiben wurden je über Nacht mit X-Gal gefärbt und mit einer 100-fachen Vergrößerung am Lichtmikroskop dokumentiert.

Die unspezifischen Färbungen erschweren die Abgrenzung zu spezifischen Expressionsmustern, wenn diese eher subtil auftreten. Die Scheiben der Stämme *BH1*[5kb]-*lacZ* (Abb. 21B), *rn*[4,3kb]-*lacZ* (Abb. 21N), *Sox15*[2,8kb]-*lacZ* (Abb. 22B), *wg*[3,6kb]-*lacZ* (Abb. 22K) und *zfh1*[2,6kb]-*lacZ* (Abb. 22N) schienen eine zusätzliche Färbung in den Augen-/Antennenimaginalscheiben aufzuweisen. In der *BH1*-Antennenscheibe war eine konzentrische Färbung des Arista-Vorläufers zu erkennen (Abb. 21B, Pfeil), die *rn*-Scheibe zeigte eine diffuse Färbung im Bereich der Augenscheibe (Abb. 21N, Pfeil). Im Falle von *Sox15* war die ventrale Färbung wesentlich stärker als in den anderen Fällen und nahm auch den kompletten ventralen Rand der Augenscheibe ein (Abb. 22B, Pfeil). Die *wg*-Scheibe zeigte eine ausgeprägtere Färbung im Bereich der Antennenscheibe (Abb. 22K, Pfeil) und in der ventralen Augenscheibe (Pfeil). In der *zfh1*-Augenscheibe war zusätzlich eine mediale Expression (Abb. 22N, Pfeil) zu erkennen.

5.3.4 Analyse der Enhancer-Aktivität in Abhängigkeit von Omb

Um die Abhängigkeit eines Enhancers von Omb festzustellen, wurden die *lacZ*-Enhancer-Reporter Stämme mit *omb*-Nullmutanten verkreuzt (Abb. 23). Dazu wurden Jungfrauen des Stamms *omb*³¹⁹⁸/*FM-GFP* (4.1.11) verwendet. Das lethale *omb*³¹⁹⁸-Allel beinhaltet eine *nonsense*-Mutation, also eine Punktmutation, welche ein Stop-Codon verursacht und somit zur Herstellung eines verkürzten, funktionslosen Proteins führt (Poeck *et al.*, 1993a). Die Abbruch der Translation findet in diesem Fall im ersten Drittel hinter dem Beginn der Tbox (Tbox: AS 329 bis 516; Mutation bei 462) statt.

Zur Untersuchung der Enhancer-Reporter Expression im *omb*-mutanten Hintergrund wurden nur männliche Larven analysiert, da *omb* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und somit nur die

Männchen die *omb*-Nullmutation ausprägen. Die Mutanten zeichnen sich durch das Fehlen von Fluoreszenz aus. Als Kontrolle wurden die fluoreszierenden Tiere verwendet.

Kreuzung:

$$\frac{w}{y}; \frac{lacZ}{lacZ} \times \frac{l(1)omb^{3198}}{FM-GFP}; \frac{II}{II}$$

Nachkommen:

$$\frac{l(1)omb^{3198}}{x}; \frac{lacZ}{II} + \frac{FM-GFP}{x}; \frac{lacZ}{II} + \frac{l(1)omb^{3198}}{y}; \frac{lacZ}{II} + \frac{FM-GFP}{y}; \frac{lacZ}{II}$$

Mutante Kontrolle

Abb. 23: Kreuzung von homozygoten *lacZ*-Enhancer-Reporter Stämmen in den *omb*-mutanten Hintergrund.

Männchen des homozygoten *lacZ*-Enhancer-Reporter Stammes wurden mit Jungfrauen des Stamms *omb³¹⁹⁸/FM-GFP* gekreuzt. Von den Nachkommen wurden die männlichen L3-Larven verwendet, da nur diese die *omb*-Nullmutation ausprägen. Die mutanten Larven zeichnen sich durch das Fehlen von Fluoreszenz aus. Die fluoreszierenden Tiere wurden als Kontrolle verwendet.

Die Ergebnisse dieser Kreuzungen und Färbungen sind in den nachfolgenden Kapiteln im Zusammenhang mit der Beschreibung einzelner Gene dargestellt.

5.3.5 Mutagenesen von TBEs potentieller Tbx-Zielgene

In dieser Arbeit soll nicht nur untersucht werden, ob bestimmte Gene von Omb reguliert werden, sondern auch, ob diese Regulation gegebenenfalls über eine vorhergesagte TBE erfolgt. Die hergestellten *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukte enthalten alle mindestens eine TBE mit einer hohen Konservierung (Tab. 15). Im Falle von *al* und *ap* wurde diese TBE gezielt mutiert (Tab. 32, 4.4.12), um die Notwendigkeit dieser potentiellen Bindestelle zu überprüfen.

Tab. 15: *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukte mit mutierten TBEs

<i>lacZ</i> -Enhancer-Reporter Konstrukt	TBE <u>ohne</u> Mutation	TBE <u>mit</u> Mutation	R-Enzym
alTBEmut	TTTCACACTT	TTTC GA ACTT	BstBI[TTTCGAA]
ap[3,2kb]TBEmut	ATTCACACTT	ATT TA AACTT	DraI [TTTAAA]

R-Enzym: Restriktionsenzym

Durch das Einfügen einer neuen Restriktionsschnittstelle konnten die mutierten Konstrukte mittels Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese überprüft werden. Die abschließende Kontrolle vor der Injektion erfolgte über Sequenzierung.

Der Nachweis der Enhancer-Aktivität der injizierten Konstrukte wurde über X-Gal Färbungen an L3-Imaginalscheiben (4.3.2.1) der entsprechenden Stämme erbracht.

Die Ergebnisse dieser Analysen sind ebenfalls in den nachfolgenden Kapiteln im Zusammenhang mit der Beschreibung einzelner Gene dargestellt.

5.4 Omb reguliert Musterbildungsprozesse entlang der A/P- sowie entlang der D/V-Grenze in der Flügelscheibe

5.4.1 *apterous* (*ap*)

5.4.1.1 Hintergrund

Während der Entwicklung des Flügels bzw. der Imaginalscheiben spielt insbesondere die frühe Expression der Selektorgene *engrailed* (*en*) und *apterous* (*ap*) eine bedeutende Rolle. Während *en* die Spezifizierung des posterioren Kompartiments steuert, spezifiziert *ap*, das im zweiten larvalen Stadium durch den EGFR-Signalweg aktiviert wird, das dorsale Kompartiment (Díaz-Benjumea und Cohen, 1993) (Cohen *et al.*, 1992) (Wang *et al.*, 2000).

Bereits 2004 wurde in der Arbeitsgruppe um Fernando J. Díaz-Benjumea (del Alamo Rodriguez *et al.*, 2004) gezeigt, dass die *ap^{rK568}-lacZ*-Expression in *omb³¹⁹⁸*-Flügelscheiben im ventralen Kompartiment ektopisch exprimiert wird.

5.4.1.2 Ergebnisse & Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der für die *ap*-Expression zuständige Enhancer identifiziert und eine direkte Regulation über die TBE untersucht werden. Die *in silico* identifizierte TBE im *upstream*-Bereich von *ap* stimmt allerdings nicht mit der im ChIP-chip gefundenen Bindestelle im 3'-Bereich des Gens überein (Abb. 25A).

Für das *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukt wurde ein 3,2kb-großer Bereich *upstream* von *ap* ausgewählt. Dieser Abschnitt verfügt nicht nur über eine besondere hohe Konservierung innerhalb der verschiedenen Spezies sondern auch über eine gut konservierte TBE. Mittels Topo- und Gateway-Klonierung wurde der PCR-amplifizierte Abschnitt in den Expressionsvektor pGW-attB-lacZ überführt (5.3.1). Zunächst wurde das Konstrukt durch die Firma Rainbow Transgenic Flies, Inc. injiziert. Zwar konnte in den analysierten Imaginalscheiben tatsächlich das bekannte *ap*-Expressionsmuster beobachtet werden (Abb. 24), allerdings wurde zusätzlich eine peripodiale Färbung in der Flügelscheibe beobachtet, die sich als Artefakt auch bei anderen Konstrukten heraus stellte (5.3.3). Der Effekt ist wohl auf den Insertionsort 58A auf dem 2. Chromosom (Insertionsort: 2R, 58A3, Linie: 24484, Tab. 9) zurück zu führen.

In der zweiten Injektionsrunde (Insertionsort: 2R, 51D, Linie 24483, Gruppe von Dr. Henry Sun, Academia Sinica, Taipeh, Tab. 9) trat nur das wildtypische *ap*-Muster auf, nicht aber die Artefakt-Färbung. Daher wurde für die Injektion der nachfolgenden *ap*-Konstrukte auch diese Linie benutzt. Im *omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund zeigte sich ebenfalls die Expansion in das ventrale Kompartiment der Flügelimaginalscheibe (Abb. 25). Die Expression in den anderen Scheiben wurde durch den *omb*-Verlust nicht beeinflusst. Nachdem offensichtlich der Enhancer für das bekannte

ap-Muster identifiziert wurde, stellte sich die Frage, ob Omb die *ap*-Expression direkt über die hoch konservierte TBE innerhalb des ausgewählten Fragments reguliert. Mittels *site-directed mutagenesis* wurden gezielte Mutationen in die TBE eingebracht um so die mögliche Bindung von Omb zu verhindern. Sofern die TBE notwendig ist für die Regulation von *ap*, wäre ein ähnliches Expressionmuster wie im *omb*³¹⁹⁸-Hintergrund zu erwarten gewesen. Wie aber mittels X-Gal Färbung nachgewiesen wurde, hat dieser vermeintliche Funktionsverlust der TBE keinen Einfluss auf das Expressionmuster von *ap-lacZ* (Abb. 25H). *Ap*[3,2kb]TBEmut-*lacZ* verhielt sich wie das wildtypische Fragment.

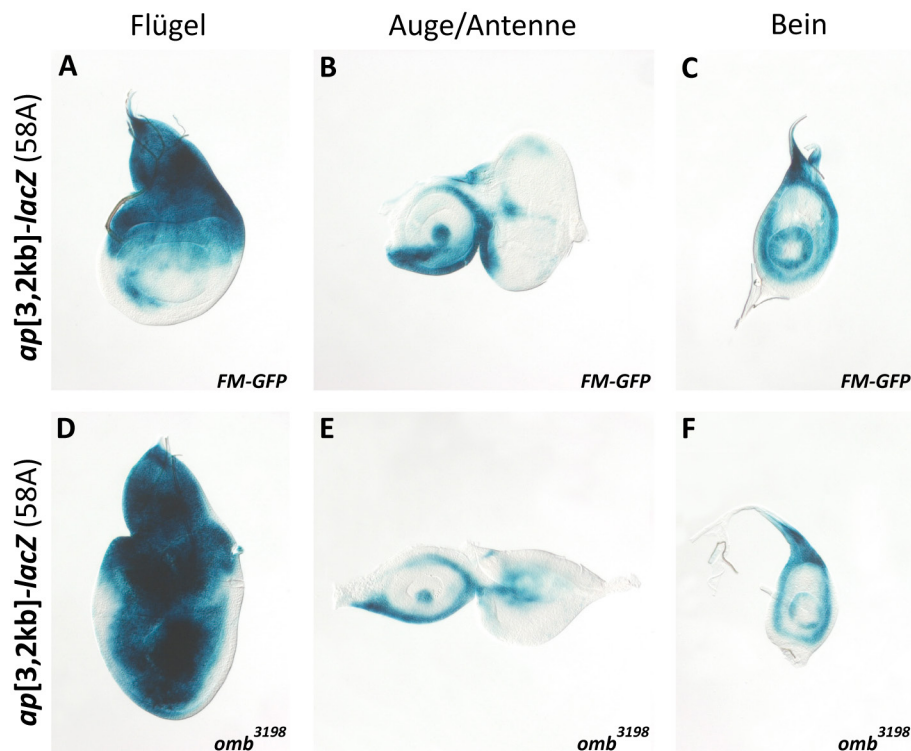


Abb. 24: *ap*[3,2kb]-*lacZ* (Insertionsort: 2R, 58A3) wird von Omb im ventralen Kompartiment reprimiert.

(A-C) X-Gal Färbung an *FM-GFP* (Wildtyp)-L3-Larven mit dem *ap*[3,2kb]-*lacZ* Fragment. (A) Die Flügelscheibe zeigt weitestgehend das typische *ap*-Expressionsmuster im dorsalen Kompartiment. (B) Die Augen-/Antennenscheibe weist eine konzentrische Färbung in der Antenne sowie Färbungen in der dorsalen und ventralen Peripherie und im medialen Bereich der Augenscheibe auf. (C) Die Beinscheibe zeigt eine konzentrische Färbung in der Mitte sowie eine Artefakt-Färbung am Rand der gesamten Scheibe.

(D-F) X-Gal Färbung an *l(1)omb*³¹⁹⁸-L3-Larven mit dem *ap*[3,2kb]-*lacZ* Fragment. (D) Die Flügelscheibe zeigt eine Expansion der Färbung in das komplette ventrale Kompartiment. (E+F) Die Augen-/Antennenscheibe sowie die Beinscheibe weisen keine Veränderung der Färbung im Vergleich zum Wildtyp auf.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

Um den Enhancer genauer einzugrenzen, wurde ein zweites Konstrukt hergestellt, das mit 1,2kb etwa ein Drittel des ursprünglichen Konstrukts enthielt (Abb. 25A). Allerdings zeigte die X-Gal Färbung in diesem Fall nicht das bekannte *ap*-Expressionsmuster (Abb. 25K-M). Das größere Konstrukt enthält somit Sequenzen, die für die vollständige Expression von *ap* notwendig sind. Bei

der Größenreduktion des *ap*[3.2kb]-Fragmentes zum *ap*[1.2kb]-Fragment wurden 5' und 3' je etwa 1000bp deletiert. In den deletierten Bereichen befinden sich potentielle Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Pointed, der als Mitglied der EGFR-Signalkaskade für die Induktion des *ap*-artigen Expressionsmusters von *ap*[3.2kb]-*lacZ* verantwortlich sein könnte (Wang *et al.*, 2000). Interessant wäre es, einzelne Pointed-Bindestellen im Ausgangskonstrukt zu mutieren. Im 5' deletierten Bereich befinden sich außerdem zwei potentielle TBEs, die aber nicht vollständig konserviert sind. Mit den gegenwärtigen Konstrukten lässt sich nicht sagen, ob die ektopische ventrale Expression von *ap*[3.2kb]-*lacZ* in *l(1)omb*³¹⁹⁸ eine direkte reprimierende Wirkung spiegelt, oder ob Omb indirekt wirkt. Eine indirekte Rolle könnte Omb in der Etablierung oder Fortschreibung eines epigenetisch reprimierten Zustandes spielen, wie es für Tbx2 beschrieben wurde (Vance *et al.*, 2005).

Um die vorherigen Beobachtungen weiter zu verifizieren sollte auch die endogene Expression von *ap* in Abhängigkeit von Omb analysiert werden. Dafür wurden zum einen *in situ*-Hybridisierungen gegen das *ap*-Transkript in verschiedenen genetischen Hintergründen durchgeführt, zum andern wurde die relative Expression von *ap* in *omb*³¹⁹⁸-Flügelscheiben im Vergleich zum Wildtyp mittels qPCR bestimmt (Abb. 26).

Die *in situ*-Hybridisierung im wildtypischen Hintergrund bestätigte das Expressionsmuster von *ap* im dorsalen Kompartiment (Abb. 26A). Interessanterweise zeigte sich bei Verwendung des Allels *l(1)omb*¹⁵ keine ventrale Expansion von *ap* (Abb. 26B), obwohl *l(1)omb*¹⁵ als Nullallel betrachtet wird (Sen *et al.*, 2010). Die Färbung spiegelt jedoch das wildtypische Muster wieder. Möglicherweise ist das *l(1)omb*¹⁵ noch funktionstüchtig, weil das Stop-Codon im Gegensatz zu *l(1)omb*³¹⁹⁸ erst nach der T-Box eingefügt ist (Tbox: AS 329 bis 516; Mutation bei 599). Im *l(1)omb*³¹⁹⁸-mutanten Hintergrund zeigte sich hingegen, wie auch im Falle von *ap*[3,2kb]-*lacZ* die Expansion des Färbemusters in das ventrale Kompartiment (Abb. 25, Abb. 26C). Auch das Ergebnis der qPCR bestätigt eine um das 1,8-fach erhöhte relative Expression von *ap* in *l(1)omb*³¹⁹⁸-Flügelscheiben im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle (Abb. 26F). Omb scheint also *ap* im ventralen Kompartiment zu reprimieren. Da die Flügel in pharat-adulten Tieren von *l(1)omb*³¹⁹⁸ nur rudimentär entwickelt sind, lässt sich anhand morphologischer Marker nicht überprüfen, ob tatsächlich eine dorsale Differenzierung stattfindet.

Im Falle einer Expression von *ombRNAi* (Tab. 29) im posterioren Kompartiment war wie unter Verwendung von *l(1)omb*¹⁵ kein Effekt auf das *ap*-Expressionsmuster zu erkennen (Abb. 26D). Im Gegensatz dazu reduzierte ektopisches Omb im Bereich des *dpp*-Expressionsdomäne anterior der A-/P-Grenze die *ap*-Expression (Abb. 26E, Pfeile). Dies bestätigt den reprimierenden Einfluss von *ap* auf die Expression von *ap*.

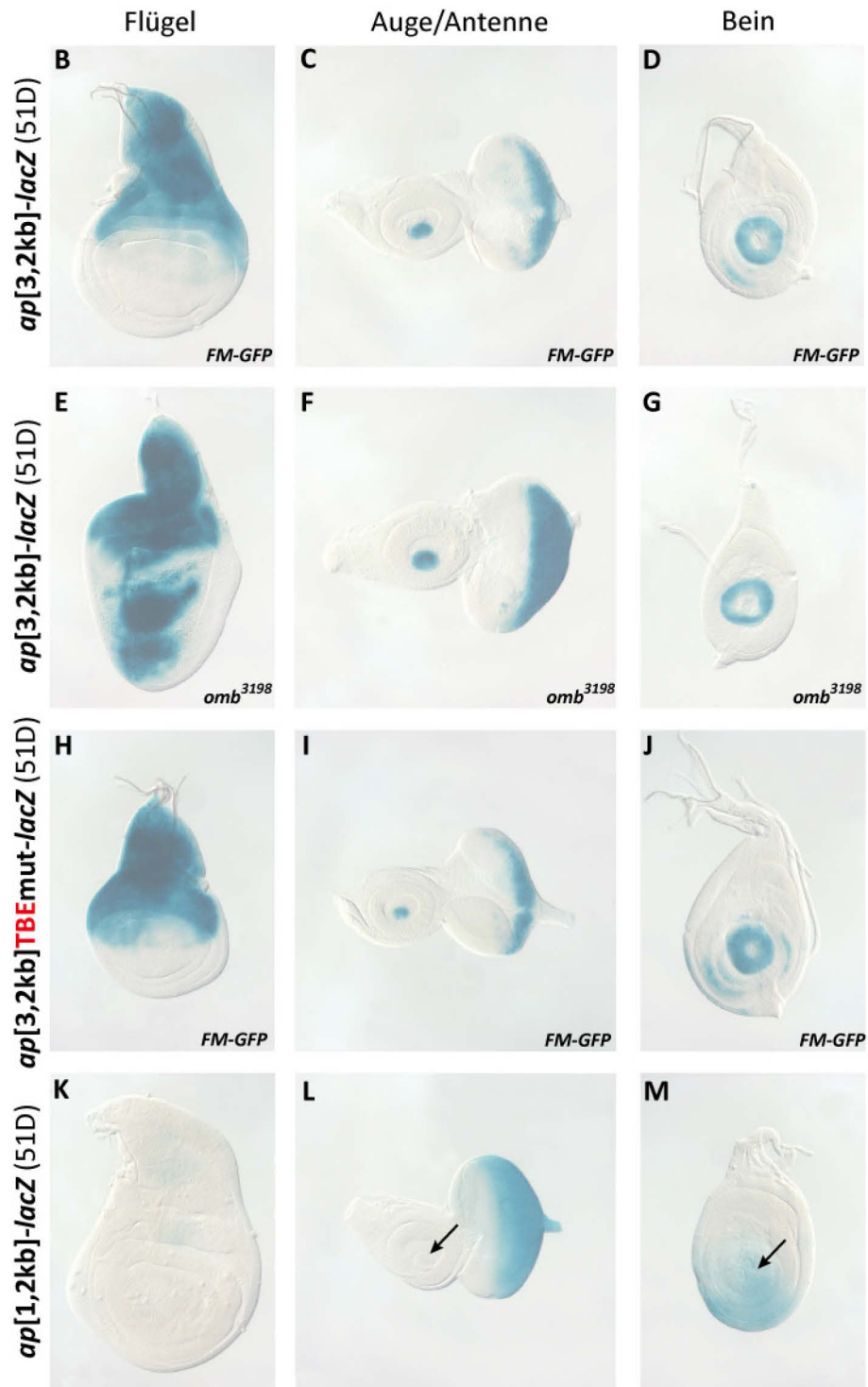
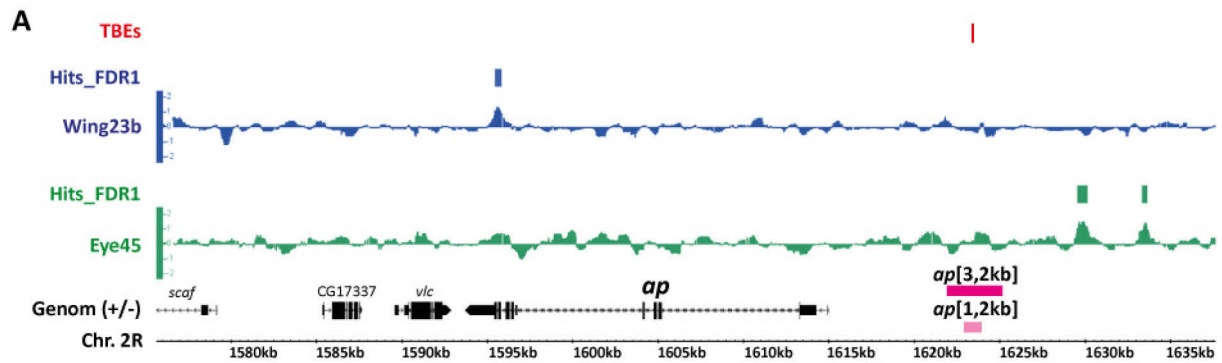


Abb. 25 (auf der vorherigen Seite): *ap[3,2kb]-lacZ* (Insertionsort: 2R, 51D) wird von Omb im ventralen Kompartiment reprimiert.

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung des Gens *apterous* (*ap*) befinden. Der *ap*-Locus befindet sich auf dem Chr. 2R: 1,593,707-1,615,030. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Zusätzlich ist eine bioinformatisch ermittelte TBE (Score: Dm 8,14; AvAll 8,14) bei 1,623,432 Basen (roter Balken) eingetragen. Diese überlappt nicht mit den ChIP-chip definierten Bindestellen. Da sie sich aber in einem hoch konservierten Bereich befindet, wurde ein 3,2kb-großes *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukt (pinker Balken, Primer: 1188/1189) hergestellt und injiziert. Zusätzlich wurde aus diesem Bereich ein kleineres Konstrukt (1,2kb, rosa Balken, Primer: 1412/1413) hergestellt, um den Enhancer weiter einzugrenzen. Die TBE ist in beiden Konstrukten enthalten. Die Imaginalscheiben der transgenen Larven wurden mittels X-Gal Färbungen analysiert. Zusätzlich wurde die TBE im *ap[3,2kb]-lacZ* Konstrukt mutiert und analysiert.

(B-D) X-Gal Färbung an *FM-GFP* (Wildtyp)-L3-Larven mit dem *ap[3,2kb]-lacZ* Fragment (Insertionsort: 2R, 51D) **(A)** Die Flügelscheibe zeigt weitestgehend das typische *ap*-Expressionsmuster im dorsalen Kompartiment. **(B)** Die Augen-/Antennenscheibe weist eine konzentrische Färbung in der Antenne sowie Färbungen in der dorsalen und ventralen Peripherie und im medialen Bereich der Augenscheibe auf. **(C)** Die Beinscheibe zeigt eine konzentrische Färbung in der Mitte sowie eine Artefakt-Färbung am Rand der gesamten Scheibe.

(E-G) X-Gal Färbung an *l(1)omb³¹⁹⁸*-L3-Larven mit dem *ap[3,2kb]-lacZ* Fragment (Insertionsort: 2R, 51D). **(E)** Die Flügelscheibe zeigt eine Expansion der Färbung in das ventrale Kompartiment. **(F+G)** Die Augen-/Antennenscheibe sowie die Beinscheibe weisen keine Veränderung der Färbung im Vergleich zum Wildtyp auf.

(H-J) X-Gal Färbung an *FM-GFP* (Wildtyp)-L3-Larven mit dem *ap[3,2kbTBEmut]-lacZ* Fragment (Insertionsort: 2R, 51D). Die Scheiben zeigen alle keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp **(B-D)**.

(K-M) X-Gal Färbung an *l(1)omb³¹⁹⁸*-L3-Larven mit dem *ap[1,2kbTBEmut]-lacZ* Fragment (Insertionsort: 2R, 51D). **(K)** Die Flügelscheibe weist bis auf leichte Färbungen in der dorsalen *hinge* und dem Notum kein typisches *ap*-Expressionsmuster auf. **(L)** In der Antennen- sowie der Beinscheibe **(M)** fehlt die typische konzentrische Färbung (Pfeil).

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

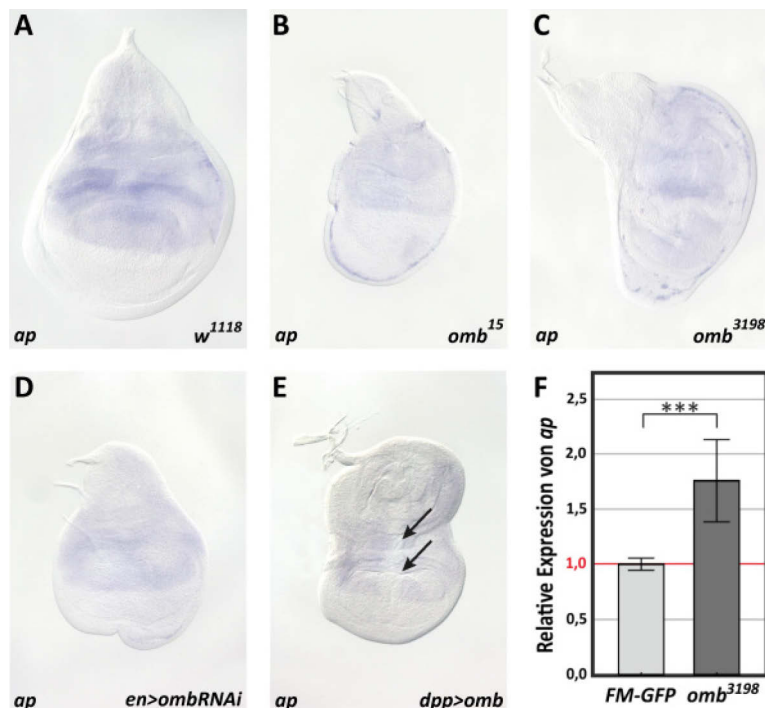


Abb. 26 (auf der vorherigen Seite): Omb reguliert auch die endogene *ap*-Expression in der Flügelscheibe.

(A-E) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *ap*-Sonde (Primer: 1819/1820) in L3-Flügelscheiben verschiedener Genotypen. (A) In wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) Flügelscheiben wird *ap* im dorsalen Kompartiment exprimiert. (B) In *l(1)omb¹⁵*-Flügelscheiben wird die *ap*-Expression durch den *omb*-Verlust nicht beeinflusst. (C) In der *l(1)omb³¹⁹⁸*-Flügelscheibe expandiert die *ap*-Expression hingegen deutlich in das ventrale Kompartiment. (D) Der partielle Verlust von *omb* durch *omb*RNAi (Tab. 29) im posterioren Kompartiment ist nicht ausreichend, um die Expression von *ap* zu beeinflussen. Das Expressionsmuster entspricht dem des Wildtyps. (E) Bei Überexpression von *omb* entlang der A-/P-Grenze (*dpp>omb*, Tab. 29) ist eine schwache Reduktion der *ap*-Expression (Pfeile) zu erkennen.

Die Scheiben (A-E) sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

(F) Das relative Expressionslevel von *ap* (Primer: 1463/1464) in *l(1)omb³¹⁹⁸*-Flügelimaginalscheibe wurde mittels qPCR im Vergleich zum Wildtyp (*FM-GFP*) untersucht. In der Mutante ist die Expression um das ca. 1,8-fache erhöht und bestätigt somit die Beobachtungen der ISH. Durchgeführt wurden $\Delta\Delta C_T$ -Experimente, wobei die Normalisierung mit dem Haushaltsgen *rp49* (Primer: 1449/1450) erfolgte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Experimenten mit je drei technischen Replikaten sowie die Standardabweichung. Die beiden unabhängigen Stichproben wurden mittels des zweiseitigen, studentischen t-Tests auf signifikante Unterschiede verglichen. *** höchst-signifikant: $p < 0,001$

5.4.2 *muscle-segment homeobox (msh)*

5.4.2.1 Hintergrund

Das Selektorgen *ap* verleiht Zellen der Flügelimaginalscheibe eine dorsale Identität durch die Regulation des Homeobox-Gens *muscle-segment homeobox (msh)* (FlyBase: *Drop, Dr*) (Milan *et al.*, 2001). *Msh* wird aber schon während der Embryonalentwicklung in verschiedenen Geweben exprimiert. Zusammen mit *ventral nervous system defective (vnd)* und *intermediate neuroblasts defective (ind)* spezifiziert *msh* das embryonale Neuroektoderm entlang der dorsoventralen Achse (Isshiki *et al.*, 1997; Skeath, 1999). Darüberhinaus wird *msh* in Herz- und Muskelvorläuferzellen exprimiert (Nose *et al.*, 1998).

In der Flügelentwicklung ist *msh* für die Ausprägung dorsaler Merkmale essentiell. Ein Verlust von *msh* im Flügelgewebe führt zur Entstehung symmetrischer Flügel mit ventralen Charakteristiken auf beiden Seiten (Milan *et al.*, 2001). *Ap* aktiviert die *msh*-Expression im dorsalen Kompartiment. In *ap*-mutanten Scheiben wird ein Verlust der *msh*-Expression in dorsalen Zellen beobachtet (Milan *et al.*, 2001).

Neben der Beteiligung in der dorsoventralen Musterbildung ist *msh* auch an der Entstehung einer weiteren Grenze in der Flügelscheibe beteiligt, jener welche das Notum (Körperwand) und die presumptive Gelenkregion, die *hinge* voneinander trennt. Im Gegensatz zur A-/P- und D-/V-Grenze können Zellen in diesen Territorien die Grenze überschreiten und ihr Schicksal wechseln (Diez del Corral *et al.*, 1999). *Msh* ist insbesondere für das Wachstum der *hinge* und die Differenzierung von *hinge*-Strukturen notwendig (Villa-Cuesta und Modolell, 2005). Dort wird *msh* auch am stärksten exprimiert (Abb. 27B). Das Notum wird hingegen durch die Aktivität der Homeobox-Gene *araucan*

(*ara*), *caupolican* (*caup*) und *mirror* (*mirr*) definiert. Diese Gene bilden zusammen den Iroquois Komplex (Iro-C). *Msh* wird im Notum nur geringfügig exprimiert.

In *loss*- und *gain-of-function* Analysen wurde bestätigt, dass zwischen *msh* und Iro-C eine gegenseitige Repression herrscht. Iro-C verhindert eine hohe Expression von *msh* im Notum, wohingegen Msh die Repression von Iro-C in der *hinge* erhält (Villa-Cuesta und Modolell, 2005).

Die ersten Beobachtungen zu einer Omb-Abhängigkeit konnte ich bereits in einem Praktikum in der AG Pflugfelder mittels *in situ*-Hybridisierungen an Flügelimaginalscheiben machen. Dabei zeigte sich ein kompletter *msh*-Verlust in *l(1)omb¹⁵*-Scheiben im Vergleich zum Wildtyp. Christian Gadomsky konstruierte daraufhin während seiner Doktorarbeit (Gadomsky, 2011) zwei *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukte, die beide eine gut konservierte TBE enthalten. Ein 4,8kb-großes Fragment wurde aus der nichtkodierenden Region 8,3kb *upstream* von *msh* ausgewählt, ein 1,6kb-großes Fragment aus der intronischen Sequenz von *msh*. In den Imaginalscheiben konnten beide Konstrukte das endogene Expressionsmuster von *msh* nicht reproduzieren (Gadomsky, 2011).

5.4.2.2 Ergebnisse & Diskussion

Ähnlich wie im Fall von *ap* konnten im ChIP-chip dem Gen *msh* zwar Omb-Bindestellen zugeordnet werden, diese überlappen aber nicht mit den bioinformatisch ermittelten TBEs (Abb. 28A).

Interessanterweise werden Omb und Msh in der Flügelscheibe mittels Antikörperfärbung in komplementären Mustern detektiert (Abb. 27). Nur in der Pleura scheint eine gewisse Überlappung statt zu finden. Der Nachweis des Msh-Proteins (Abb. 27B) entspricht dem per ISH ermittelten wildtypischen *msh*-Expressionsmusters in der Flügelscheibe (Abb. 28B).

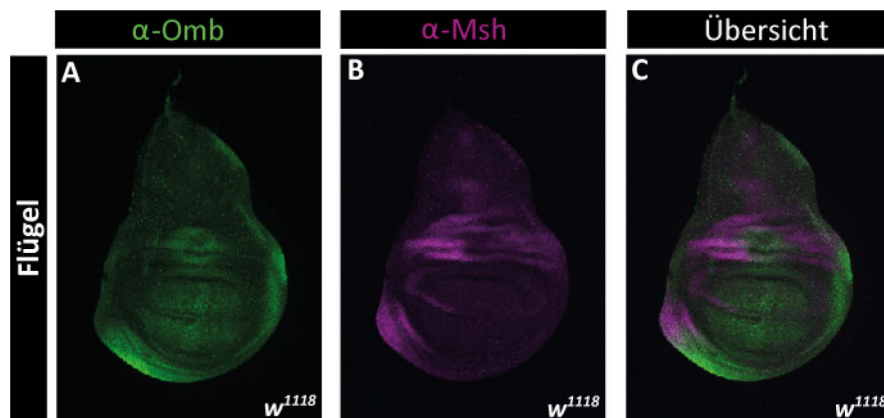


Abb. 27: Komplementäres Muster von Omb und Msh in der L3-Flügelscheibe.

(A-C) Fluoreszente Antikörperfärbung mit anti-Omb (7) und anti-Msh (Tab. 6, Tab. 7) in wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Flügelscheiben. (A) In der Flügelimaginalscheibe wird Omb im Bereich der *pouch*, in der *hinge* sowie der Pleura nachgewiesen. (B) Msh wird vor allem in der *hinge* detektiert, aber auch in der Pleura. (C) Die Übersicht beider Antikörper zeigt das weitestgehend komplementäre Färbemuster, insbesondere in der *hinge*. Nur im Bereich der Pleura scheint eine Überlappung statt zu finden (vgl. Abb. 2).

Da die ursprüngliche *in situ*-Hybridisierung mit einer *msh*-Sonde an *l(1)omb*¹⁵-Larven durchgeführt wurde, wiederholte ich das Experiment mit der Nullmutante *l(1)omb*³¹⁹⁸. Auch hier trat ein Verlust der Expression von *msh* auf (Abb. 28E-G). Ein möglicher Effekt des *omb*-Verlusts auf *msh* wurde auch mittels qPCR untersucht (Abb. 28H). Das Ergebnis ist allerdings nicht signifikant und somit nicht verwertbar. Hier müssten mehrere Wiederholungen durchgeführt werden.

Um einen möglichen Effekt von ektoischem Omb auf *msh* zu ermitteln, untersuchte ich Kreuzungen von *dpp-Gal4* mit *UAS-omb* (Tab. 29). Alle dargestellten Scheibentypen der Kontrolle *dpp-Gal4* zeigen das wildtypische *msh*-Muster (Abb. 28I-K). Die Flügelscheibe (I) zeigt Färbungen im Bereich der Pleura sowie der dorsalen *hinge*. Die Antenne (J) weist ein Muster im ventralen Randbereich auf. Die Beinscheibe zeigt zwei bogenförmige Expressionsdomänen (K). Die ektoische *omb*-Expression im Bereich der *dpp*-Domäne äußert sich phänotypisch bereits durch morphologische Veränderungen der Flügel- sowie der Augenscheibe (Abb. 28L+M). Es scheint eine leichte Reduktion der *msh*-Expression in der *dpp*-Domäne entlang der A-/P-Grenze aufzutreten (Abb. 28L). Dies würde aber den vorherigen Beobachtungen im *omb*³¹⁹⁸-Hintergrund widersprechen. Bei ektoischer *omb*-Expression wäre eine verstärkte *msh*-Expression in der Flügelscheibe zu erwarten. Wang *et al.* beobachteten mittels Antikörperfärbung ebenfalls eine leichte Msh-Reduktion im Bereich der *dpp*-Domäne bei dortiger ektoischer *omb*-Expression. Allerdings konnten sie in der *omb loss-of-function* Mutanten *l(1)omb*^{D4} keine Veränderung im Msh-Proteinlevel erkennen (Wang *et al.*, 2016).

In der Augen-/Antennenscheibe scheint die *omb*-Überexpression keinen Einfluss auf die *msh*-Expression zu nehmen (Abb. 28M), im Bein fehlt das typische Muster (Abb. 28N). Dieser Effekt ist jedoch nicht überzeugend, da die *msh*-Expression sowohl in der Augen- als auch in der Beinscheibe im Wildtyp nicht immer zuverlässig reproduzierbar war.

Insgesamt sind die Ergebnisse nicht eindeutig zu verstehen. Bei *omb*-Verlust scheint zumindest in der Flügelscheibe eine starke Reduktion der *msh*-Expression aufzutreten. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Wang, die allerdings ein anderes *omb*-Allel nutzten (Wang *et al.*, 2016). Eindeutige qPCR-Ergebnisse fehlen, könnten aber die ISH-Ergebnisse untermauern. Eine direkte Regulation über die TBE konnte Christian Gadomsky nicht nachweisen (Gadomsky, 2011). Ebenfalls war es ihm nicht möglich den Enhancer für die *msh*-Expression in der Flügelscheibe zu identifizieren.

Omb nimmt, wie oben beschrieben (Abb. 25, Abb. 26), in der ventralen Flügelscheibe einen repressiven Einfluss auf die Expression von *ap*, ob indirekt oder direkt ist unbekannt. *Ap* aktiviert dorsal *msh* (Milan *et al.*, 2001). Eine ventrale Aktivierung der *ap*-Expression bei *omb*-Verlust hat offenbar keinen Einfluss auf eine dortige *msh*-Expression. Ein indirekter Effekt über *ap* wäre auch keine Erklärung für den *msh*-Verlust im *omb*³¹⁹⁸-Hintergrund. Ob Omb indirekt auf die *msh*-

Expression Einfluss nimmt oder ob es sich hier generell um eine falsche Hypothese handelt, bleibt noch zu klären.

Abb. 28 (auf der nachfolgenden Seite): *muscle-segment homeobox (msh)* aka *Drop* wird nicht im *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund exprimiert.

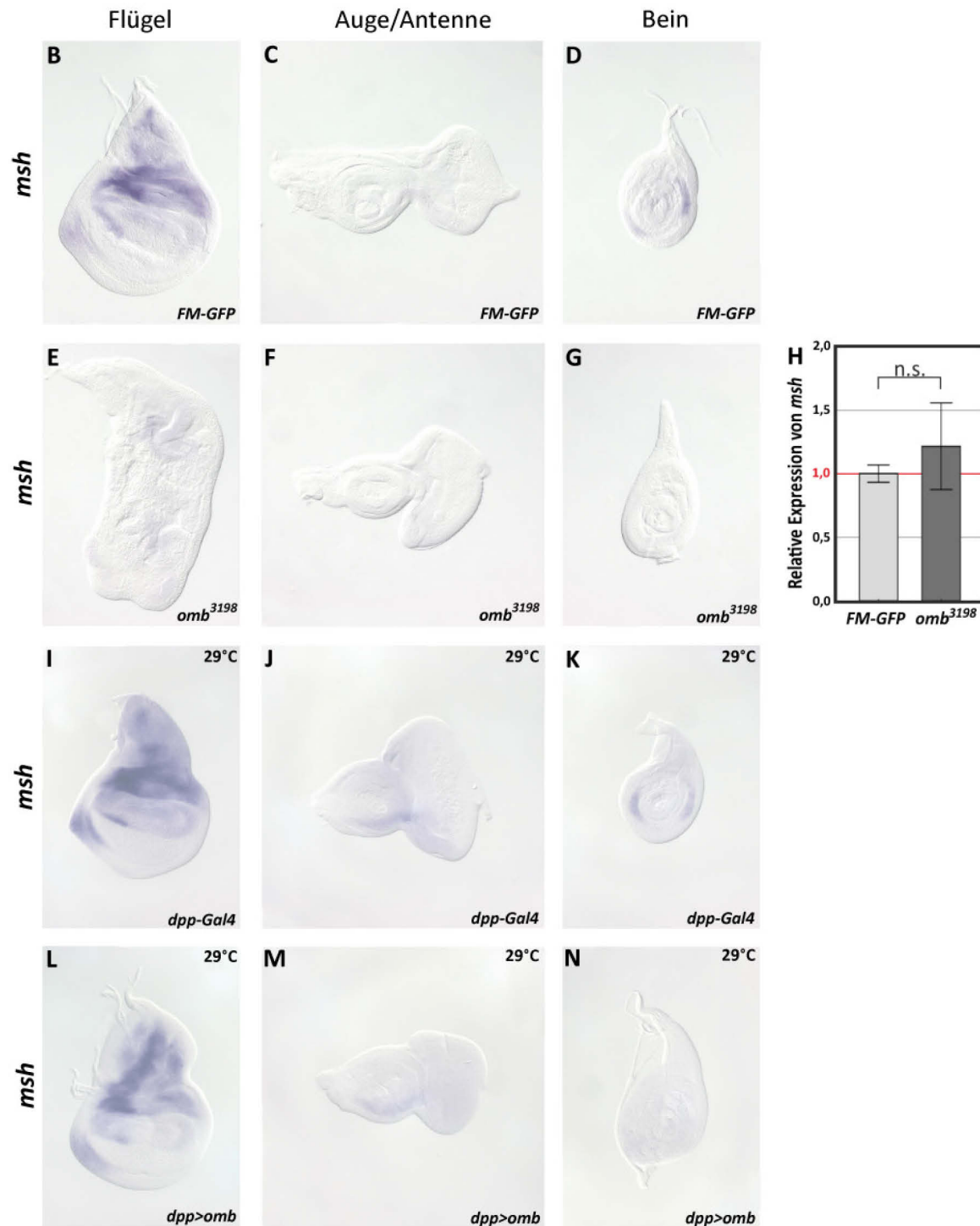
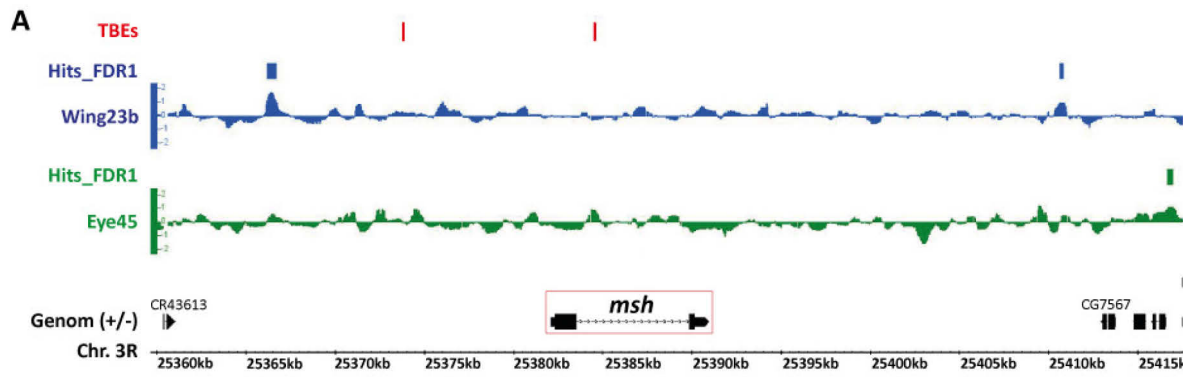
(A) ChIP-chip definierte Bindestellen (nachfolgende Seite) von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung des Gens *muscle-segment homeobox (msh)* befinden. Der *msh*-Locus befindet sich auf dem Chr. 3R: 25,382,109-25,391,007. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Zusätzlich sind zwei bioinformatisch ermittelte TBEs bei 25,373,794 (Score: Dm 8,23; AvAll 8,16) und bei 25,384,624 Basen (Score: Dm 8,38; AvAll 8,38) (rote Balken) eingetragen. Diese überlappt nicht mit den ChIP-chip definierten Bindestellen.

(B-M) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *msh*-Sonde in L3-Imaginalscheiben in Abhängigkeit von Omb. **(B-G)** In der *FM-GFP*-Kontrolle zeigt die Flügelscheibe (B) das wildtypische *msh*-Expressionsmuster mit Schwerpunkt in der dorsalen *hinge*. **(E-G)** In *l(1)omb³¹⁹⁸*-Imaginalscheiben ist bis auf minimale Färbungen in der Flügelscheibe (E) keine *msh*-Expression zu erkennen.

(H) Das relative Expressionslevel von *msh* (Primer: 1493/1494) in *l(1)omb³¹⁹⁸*-Flügelimaginalscheibe wurde mittels qPCR im Vergleich zum Wildtyp (*FM-GFP*) untersucht. Durchgeführt wurden $\Delta\Delta C_T$ -Experimente, wobei die Normalisierung mit dem Haushaltsgen *rp49* (Primer: 1449/1450) erfolgte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten mit je drei technischen Replikaten sowie die Standardabweichung. Die beiden unabhängigen Stichproben wurden mittels des zweiseitigen, studentischen t-Tests auf signifikante Unterschiede verglichen. Das Ergebnis ist nicht signifikant (n. s.).

(I-N) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *msh*-Sonde in L3-Imaginalscheiben in Abhängigkeit von Omb (Tab. 29). **(I-K)** Die Kontrollscheiben des Genotyps *dpp-Gal4* ((I) Flügel, (J) Auge, (K) Bein) zeigen alle das wildtypische *msh*-Expressionsmuster. **(L-N)** Die ektopische Expression von *omb* in der *dpp*-Expressionsdomäne (*dpp>omb*) der Flügelscheibe (L) führt zu einer leichten Reduktion der *msh*-Expression ((L) Flügel, (M) Auge, (N) Bein).

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.



5.4.3 *aristaless (al)*

5.4.3.1 Hintergrund

Wg und Dpp sind für die Musterbildung der Extremitäten essentiell. Eine direkte Interaktion von *wg*- und *dpp*-exprimierenden Zellen spezifiziert unter anderem die proximodistale Achse in der Bein- und Flügelimaginalscheibe. In der presumptiven distalen Region von Bein und Antenne wird das Homeobox-Gen *aristaless (al)* exprimiert.

Die Expressionsdomänen in der Bein-, der Flügel- und der Antennenscheibe ähneln sich im Bereich des Zentrums und in peripheren Regionen. In der Beinscheibe wird *al* punktförmig im Zentrum der Scheibe, also in letzten Segment des presumptiven Beins, dem Tarsus exprimiert (Campbell *et al.*, 1993). Zusätzlich zeigt sich eine Expression im dorsalen Bereich, der sich in der adulten Fliege zu einem Bereich der Körperwand entwickelt. In der Antenne zeigt sich ebenfalls eine punktförmige *al*- Expressionsdomäne. In der Flügelscheibe wird *al* im anterioren Bereich der *pouch* über- und unterhalb der D-/V-Grenze bzw. der *wg*-Expressionsdomäne exprimiert. Im proximalen, dorsalen Part der Flügelscheibe finden sich ebenfalls Zellen mit einem hohen *al*-Expressionslevel (Campbell *et al.*, 1993).

Die ektopische Expression von *wg* induziert in Regionen mit einem hohen *dpp*-Expressionslevel nicht nur eine ektopische Expression von *al*, sondern auch eine Duplikation der proximodistalen Achse (Campbell *et al.*, 1993). Ein Verlust von *al* im distalen Bereich des Beins verhindert zwar nicht die Ausbildung der proximodistalen Achse, führt aber zu einem Verlust der Klauen und zu einer Verkleinerung der beiden letzten tarsalen Segmente des Beins (Campbell und Tomlinson, 1998).

5.4.3.2 Ergebnisse & Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit stellte ich ein *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukt für *al* her (Injektionslinie: 24484, Insertionsort: 2R, 58A3). Dieses deckt einen 5,2kb-großen Bereich *upstream* des *al*-Locus ab und enthält eine gut konservierte TBE. Im ChIP-chip-Experiment wird diese aber nicht von Omb gebunden (Abb. 29A).

Die Analyse der transgenen Larven zeigt allerdings, dass dieser Bereich tatsächlich Enhancer-Aktivität aufweist. In der Flügelscheibe wird das endogene *al*-Expressionsmuster mit zwei Expressionsdomänen in der anterioren *pouch* unter- und überhalb der D-/V-Grenze sowie einer runden Expressionsdomäne im Notum zum Teil reproduziert (Abb. 29B-D). Ein wichtiger Unterschied findet sich in der Flügelimaginalscheibe, wo das Al-Protein in der ganzen anterioren *pouch* auftritt (Campbell *et al.*, 1993), während *al*[5.2]-*lacZ* auf der D-/V-Grenze unterdrückt wird. Zusätzlich tritt hier ebenfalls die bereits vorgestellte peripodiale Färbung auf, die sich bei anderen Konstrukten mit dem gleichen Insertionsort 58A als Artefakt heraus stellte (5.3.3).

In *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Scheiben (Abb. 29E-G) weisen die Augen-/Antennenscheibe sowie die Beinscheibe keine Veränderung der Färbung im Vergleich zum Wildtyp auf. In der sehr jungen Flügelscheibe fehlt in der *pouch* vermeintlich eine der beiden wildtypischen Expressionsdomänen. Allerdings könnte dies auch durch die morphologischen Veränderungen bedingt sein.

Obwohl eine Regulation des Reporter-Fragments nach den vorherigen Beobachtungen unwahrscheinlich erscheint, wurde die TBE einer Mutation unterzogen. Im Gegensatz zum ursprünglichen Konstrukt wurde dieses in Embryonen der Linie 25709 injiziert (Insertionsort: 2L, 25C6). Dadurch fehlt in den Scheiben die Artefakt-Färbung. Ansonsten weisen die Scheiben nach der Mutation jedoch keinerlei Veränderung in Bezug auf die Expression des Konstrukts auf (Abb. 29H-J). Somit repräsentiert der Enhancer zwar weitgehend das endogene *al*-Expressionsmuster, eine Regulation von *al* durch Omb über die TBE kann jedoch ausgeschlossen werden.

Der Einfluss von Omb auf *al* wurde auch auf der Ebene der endogenen Expression per qPCR untersucht (Abb. 29K). Beim Verlust von *omb* zeigte sich in *l(1)omb³¹⁹⁸*-Flügelimaginalscheiben im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion des *al*-Expressionslevels um mehr als die Hälfte.

Die von A. Klebes an dem *omb*-Hypomorph *omb^{bi}* durchgeführte Transkriptom-Analyse (Klebes *et al.*, 2005) zeigte, dass Omb im Wesentlichen ein transkriptioneller Repressor ist. Im Fall von *al* wirkt Omb aber formal als transkriptioneller Aktivator. Es ist daher wahrscheinlich, dass Omb die Regulation von *al* indirekt kontrolliert.



Abb. 29 (auf der vorherigen Seite): Omb reguliert das Gen *al*, nicht jedoch *al*[5,2kb]-*lacZ*.

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung des Gens *aristaless (al)* befinden. Der *al*-Locus befindet sich auf dem Chr. 2L: 378,112-387,439. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Zusätzlich ist eine bioinformatisch ermittelte TBE (Score: Dm 9,06; AvAll 9,06) bei 371,202 Basen (roter Balken) eingetragen. Diese überlappt nicht mit den ChIP-chip definierten Bindestellen. Da sie sich aber in einem hoch konservierten Bereich befindet, wurde ein 5,2kb-großes *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukt (pinker Balken, Primer: 1186/1187) hergestellt und injiziert. Die Imaginalscheiben der transgenen Larven wurden mittels X-Gal Färbungen analysiert. Zusätzlich wurde die TBE im *al*[5,2kb]-*lacZ* Konstrukt mutiert und analysiert.

(B-D) X-Gal Färbung an *FM-GFP* (Wildtyp)-L3-Larven mit dem *al*[5,2kb]-*lacZ* Fragment (Insertionsort: 2R, 58A3). **(B)** Die Flügelscheibe zeigt das typische *al*-Expressionsmuster mit zwei Expressionsdomänen in der *pouch* unter- und oberhalb der D-/V-Grenze im anterioren Kompartiment sowie eine runde Expressionsdomäne im Notum. **(C)** Die Augen-/Antennenscheibe zeigt eine konzentrische Färbung in der Antenne sowie Färbungen in der dorsalen und ventralen Peripherie und im ventralen Bereich der Augenscheibe. **(D)** Die Beinscheibe zeigt punktförmige Färbungen in der Mitte sowie eine Artefakt-Färbung am Rand der gesamten Scheibe.

(E-G) X-Gal Färbung an *l(1)omb³¹⁹⁸*-L3-Larven mit dem *al*[5,2kb]-*lacZ* Fragment (Insertionsort: 2R, 58A3). **(E)** Die junge Flügelscheibe zeigt eine Expression ähnlich dem Wildtyp. In der *pouch* ist nur eine der beiden wildtypischen Expressionsdomänen zu erkennen. **(F+G)** Die Augen-/Antennenscheibe sowie die Beinscheibe weisen keine Veränderung der Färbung im Vergleich zum Wildtyp auf.

(H-J) X-Gal Färbung an L3-Larven (Wildtyp) mit dem *al*[5,2kbTBE_{mut}]-*lacZ* Fragment (Insertionsort: 2L, 252C6). Die Scheiben zeigen alle das wildtypische *al*-Expressionsmuster ohne die vorher beobachteten Artefakt-Färbungen. Die Pfeile in **(H)** weisen auf zwei Färbungen im posterioren Notum.

(K) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *al*-Sonde (Primer: 1821/1822) in Flügelscheiben von *w¹¹¹⁸*-L3-Larven. Der Pfeil zeigt auf die Färbung im posterioren Notum, die Pfeilköpfe weisen auf die Färbungen in der anterioren *pouch* ober- und unterhalb der D-/V-Grenze.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

(L) Die Analyse des relativen Expressionslevels von *al* (Primer: 1459/1460) in *l(1)omb³¹⁹⁸*-Flügelimaginalscheibe im Vergleich zum Wildtyp (*FM-GFP*) erfolgte mittels qPCR. In der Mutante ist die Expression um ca. **0,47**-fach niedriger und bestätigt somit die Beobachtungen der ISH. Durchgeführt wurden $\Delta\Delta C_T$ -Experimente, wobei die Normalisierung mit dem Haushaltsgen *rp49* (Primer: 1449/1450) erfolgte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Experimenten mit je drei technischen Replikaten sowie die Standardabweichung. Die beiden unabhängigen Stichproben wurden mittels des zweiseitigen, studentischen t-Tests auf signifikante Unterschiede verglichen. *** höchst-signifikant: $p < 0,001$

5.4.4 *frizzled 3 (fz3)*

5.4.4.1 Hintergrund

Wg spielt in der Musterbildung des Flügels eine bedeutende Rolle (2.2.2.1). Der kanonische Wg-Signalweg wird durch die Bindung von Wg an den Transmembranrezeptor Frizzled 2 (Fz2) und dessen Co-Rezeptor Arrow (Arr) initiiert. Durch diese Bindung wird das extrazelluläre Signal in ein intrazelluläres übersetzt. Dies hat letztlich eine Aktivierung der Transkription verschiedener Zielgene wie *Distal-less (Dll)*, *vestigial (vg)* und *senseless (sens)* zur Folge (Zecca *et al.*, 1996).

Die Expression von *frizzled-3 (fz3)*, einem weiteren Mitglied der Fz-Rezeptor-Familie, wird in der *pouch* direkt durch Wg aktiviert. Fz3 reduziert die Aktivierung von Arr und Fz2 in Bereichen, in denen Fz3 Wg binden kann und vermittelt dadurch eine breite Verteilung des Wg-Proteins. Fz3 agiert somit als negativer Regulator des Wg-Signalwegs (Schilling *et al.*, 2014).

5.4.4.2 Ergebnisse & Diskussion

Um eine mögliche Abhängigkeit des *fz3* von Omb zu untersuchen wurde ein *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukt hergestellt (Abb. 30A). Dieses ca. 2,5kb-große Fragment entstammt aus der intronischen Sequenz von *fz3* und enthält ebenfalls eine gut konservierte TBE. Wie auch in den anderen Fällen gab es keine Übereinstimmung zwischen dieser TBE und den im ChIP-chip identifizierten Omb-Bindestellen. Für die Flügelscheibe wurde eine Bindestelle im *upstream*-Bereich von *fz3* identifiziert, für die Augenscheibe drei *up*- und eine *downstream* des *fz3*-Locus (Abb. 30A).

Das Konstrukt zeigt in den transgenen Larven im wildtypischen Hintergrund eine ausgeprägte Enhancer-Aktivität (Abb. 30B-D). In der Flügelscheibe ist es vor allem in einem breiten Ring um die *pouch* aktiv, mit schwächerer Expression in der *pouch*. Die Antennen- und die Beinscheibe zeigen eine fast ubiquitäre Expression des Reportergens. Die beobachtete Expression stimmt teilweise mit der bekannten endogenen *fz3*-Expression überein. In der Literatur findet sich der Nachweis einer starken Expression auf der D-/V-Grenze der *pouch* (Sivasankaran *et al.*, 2000). Dem *fz3*[2.5]-*lacZ* Konstrukt fehlt eine beschriebene Expression im Notum der Flügelscheibe und eine Expression im dorsalen und ventralen Bereich der Augenscheibe, ebenfalls alle überlappend zu *wg*-Expressionsdomänen (Sivasankaran *et al.*, 2000).

Nichtsdestotrotz zeigt das Fragment im *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund in der Flügelscheibe eine starke Ausbreitung der Expressionsdomäne, die allerdings auch mit der morphologischen Ausdehnung der Scheibe einhergeht (Abb. 30E). In der Augen-/Antennen- und der Beinscheibe ist keine Veränderung zu erkennen (Abb. 30F-G).

Dieser beobachtete Effekt lies sich auch, bezogen auf die endogene Expression von *fz3*, mittels qPCR bestätigen. Das relative Expressionslevel in *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Flügelscheiben im Vergleich zum Wildtyp war um das 2-fache erhöht (Abb. 30H).

Um den Effekt im Zusammenhang beurteilen zu können wurden auch die relative Expression einiger weiterer Komponenten des Wg-Signalwegs im *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund per qPCR analysiert (Abb. 30H). Neben *wg* selbst wurden auch die Wg-abhängigen Gene *Distal-less* (*Dll*) und *senseless* (*sens*) in die Untersuchung der relativen Expression einbezogen. Die Expression von *wg* im *omb*-mutanten Hintergrund zeigt zwar eine leichte Reduktion, das Ergebnis an sich ist aber nicht signifikant (Abb. 30H). Die Wg-Zielgene *Dll* und *sens* weisen jeweils eine Reduktion um ca. die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle auf (Abb. 30H). *Dll* und *sens* sind Zielgene von Wg (Jafar-Nejad *et al.*, 2006; Zecca *et al.*, 1996). Der relative Expressionsverlust im *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund wäre durch die Reduktion der *wg*-Expression zu erklären, sofern diese denn aussagekräftig wäre. Da eine stärkere Expression von *fz3* in *l(1)omb³¹⁹⁸*- Flügelscheiben zu einem höheren Anteil des

Antagonisten führt wird somit auch mehr *Wg* gebunden. Dadurch wäre die Aktivierung von Zielgenen wie *Dll* und *sens* reduziert.

Die Frage, ob der Effekt der Expansion von *fz3* in *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Flügelscheiben tatsächlich auf einer Regulation durch Omb und somit auf dem Wegfall einer Repression durch Omb beruht oder ob hier ein sekundärer Effekt aufgrund der in *l(1)omb³¹⁹⁸* auftretenden zellphysiologischen und morphologischen Veränderungen vorliegt, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Darüberhinaus kann hier natürlich auch eine indirekte Regulation über einen Omb-Einfluss auf einen anderen Kandidaten des *Wg*-Signalwegs stattfinden.

Abb. 30 (auf der nachfolgenden Seite): Die *fz3*-Expression steigt in *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Flügelscheiben.

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung des Gens *frizzled 3* (*fz3*) befinden. Der *fz3*-Locus befindet sich auf dem Chr. X: 664,061-677,344. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Zusätzlich ist eine bioinformatisch ermittelte TBE (Score: Dm 8,04; AvAll 7,94) bei 672,885 Basen (roter Balken) eingetragen. Diese überlappt nicht mit den ChIP-chip definierten Bindestellen. Da sie sich aber in einem hoch konservierten Bereich befindet, wurde ein 2,5kb-großes *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukt (pinker Balken) hergestellt und injiziert. Die Imaginalscheiben der transgenen Larven wurden mittels X-Gal Färbungen analysiert.

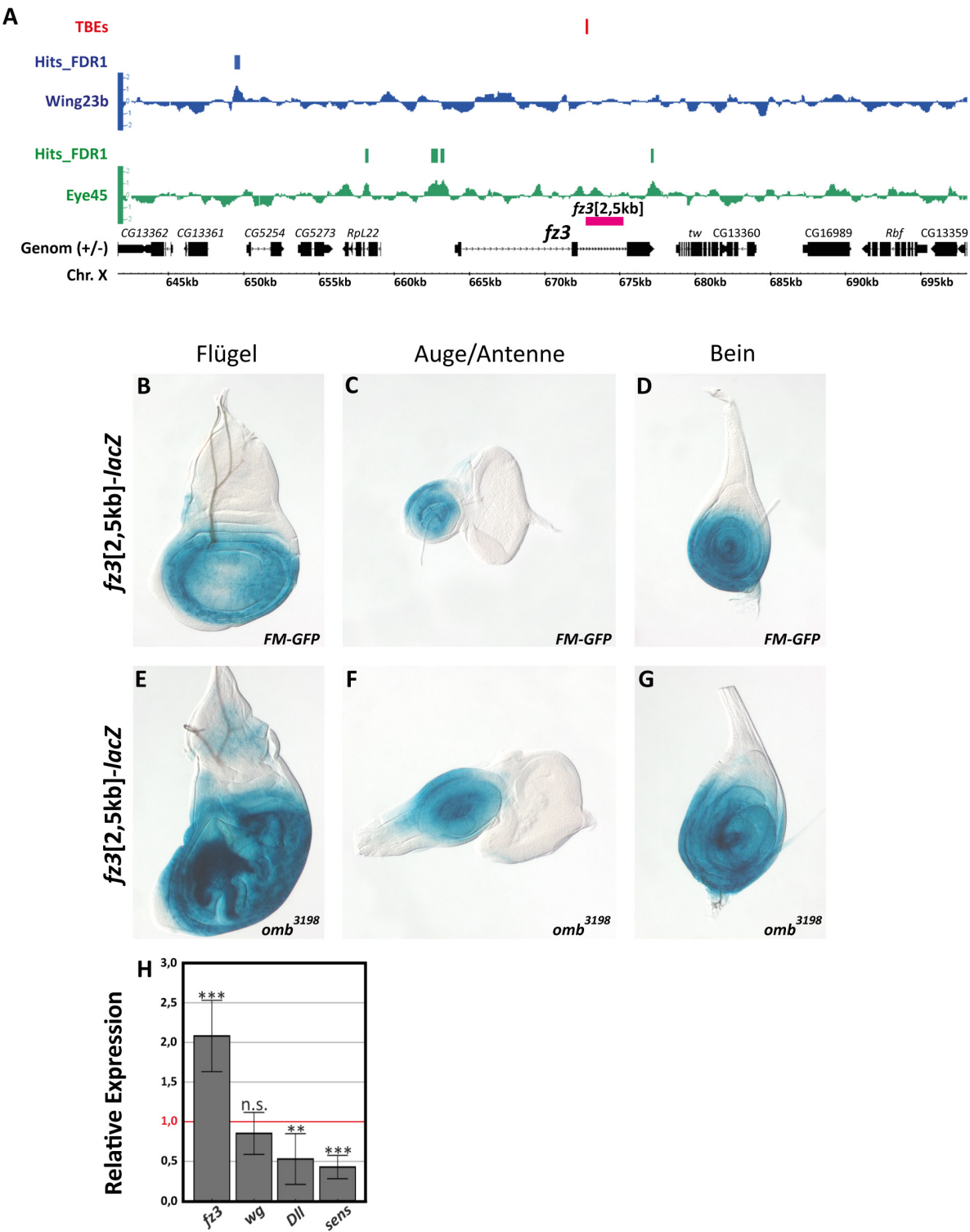
(B-D) X-Gal Färbung an *FM-GFP* (Wildtyp)-L3-Larven mit dem *fz3*[2,5kb]-*lacZ* Fragment (Insertionsort: 2L, 25C6). **(A)** Die Flügelscheibe zeigt das typische *fz3*-Expressionsmuster innerhalb der *pouch*. **(B)** Die Augen-/Antennenscheibe zeigt eine konzentrische Färbung in der Antenne, die Beinscheibe **(C)** weist eine konzentrische Färbung in der Mitte der Scheibe auf.

(E-G) X-Gal Färbung an *l(1)omb³¹⁹⁸*-L3-Larven mit dem *fz3*[2,5kb]-*lacZ* Fragment (Insertionsort: 2L, 25C6). **(E)** Die Flügelscheibe zeigt eine Expansion der Färbung in das komplette ventrale Kompartiment. **(F+G)** Die Augen-/Antennenscheibe sowie die Beinscheibe weisen keine Veränderung der Färbung im Vergleich zum Wildtyp auf.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

(H) Das relative Expressionslevel von *fz3* (Primer: 1481/1482) in *l(1)omb³¹⁹⁸*-Flügelimaginalscheibe ist in der qPCR im Vergleich zum Wildtyp (*FM-GFP*) auf das 2-fache erhöht und bestätigt somit die Beobachtungen der Enhancer-Reporter Analyse. Zusätzlich wurden andere Komponenten der *Wg*-Signalkaskade per qPCR untersucht: *wg* (Primer: 1455/1456) selbst und die *Wg*-Zielgene *Dll* (Primer: 1443/1444) und *sens* (Primer: 1507/1508). Die relative Expression der Gene ist im *omb*-mutanten Hintergrund jeweils niedriger. *Wg*: **0,86**; *Dll*: **0,53**; *sens*: **0,43**.

Durchgeführt wurden $\Delta\Delta C_T$ -Experimente, wobei die Normalisierung mit dem Haushaltsgen *rp49* (Primer: 1449/1450) erfolgte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei (*fz3*) bzw. zwei (*wg*, *Dll*, *sens*) Experimenten mit je drei technischen Replikaten sowie die Standardabweichung. Die beiden unabhängigen Stichproben wurden mittels des zweiseitigen, studentischen t-Tests auf signifikante Unterschiede verglichen. *** höchstsignifikant: $p < 0,001$, **hoch-signifikant: $p < 0,01$, n.s.: nicht signifikant



5.4.5 CR42862

5.4.5.1 Hintergrund

CR42862 ist ein nicht-Protein-kodierendes Gen, dessen Funktion laut Flybase weitestgehend unbekannt ist. Bislang konnte noch kein Phänotyp im Zusammenhang mit CR42862 beschrieben werden. Allerdings trat CR42862 erstmals im Rahmen der Microarray-Analyse von Ansgar Klebes (2.4.2) in Bezug auf *Omb* in den Fokus. Dabei wurde nach Genen gesucht, die in *bifid*-Flügelscheiben im Vergleich zum Wildtyp reguliert werden. CR42862 wies bei Verlust von *Omb* eine 2,5-fache Aktivierung auf (Daten nicht veröffentlicht). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher weiter auf dieses Gen eingegangen werden.

5.4.5.2 Ergebnisse & Diskussion

Im Rahmen des ChIP-chip Experiments konnten vor allem im Chromatin der Flügelscheiben Bindestellen von *Omb* im Locus von CR42862 identifiziert werden (Abb. 31). Diese sind allerdings *downstream* der bioinformatisch identifizierten TBEs lokalisiert. Ein *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukt, welches die beiden TBEs beinhaltet, wurde zwar hergestellt, konnte aber nicht injiziert werden (Tab. 28).

Mittels *in situ*-Hybridisierung sollte das endogene Expressionsmuster in den Imaginalscheiben bestimmt werden (Abb. 31B-D). Sofern die Sonde zuverlässig funktioniert, erscheint die Expression als komplexes Muster. Bei ektopischer Expression von *omb* in der *dpp*-Domäne (Tab. 29) tritt kein Effekt auf das Expressionsmuster von CR42862 auf (Abb. 31E-J).

Prinzipiell kann in Bezug auf CR42862 nur das Resultat der qPCR betrachtet werden. Dies bestätigt das Ergebnis aus dem vorangegangenen Microarray von Ansgar Klebes. CR42862 wird im *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund um das 2,3-fache verstärkt exprimiert (Abb. 31K) und demzufolge im Wildtyp durch *Omb*, direkt oder indirekt, reprimiert.

CR42862 wird in Glia und Neuronen des larvalen und imaginalen ZNS exprimiert (DeSalvo *et al.*, 2014). Für die CR42862-Expression im Neuroektoderm der Anlage der optischen Loben wurde gezeigt, dass sie durch den JAK/STAT-Signalweg reguliert wird (Wang *et al.*, 2013). Im ventralen Bereich der Augenimaginalscheibe hemmt *Omb* die Proliferation durch Schwächung der JAK/STAT-Signalaktivität (Tsai *et al.*, 2015). Verringerte *omb*-Expression in der Flügelimaginalscheibe führt wie im ventralen Augen zur Überproliferation. Falls auch hier der JAK/STAT-Signalweg beteiligt ist, könnte dieser die Induktion von CR42862 vermitteln. Interessant wäre es daher, das vorliegende Konstrukt zu injizieren und diese auf eine Abhängigkeit von *Omb* zu untersuchen. Zwar wurden zwei TBEs bioinformatisch identifiziert, allerdings zeigte das ChIP-chip Experiment zwei andere potentielle Bindestellen im CR42862-Lokus. Diese befinden sich außerhalb des hergestellten Konstrukts, könnten aber für ein weiteres Konstrukt von Interesse sein.

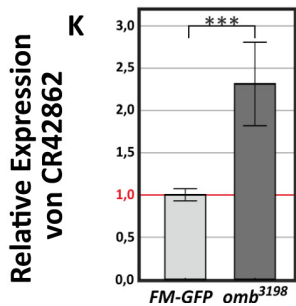
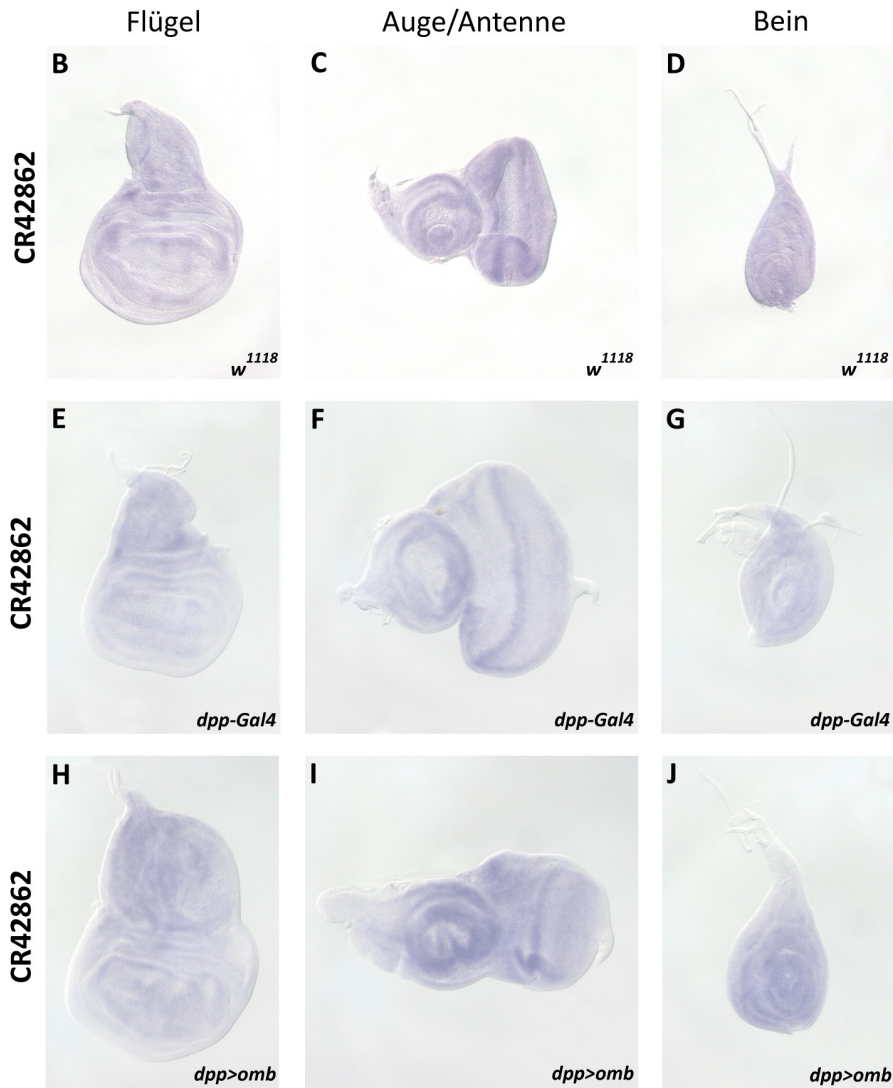
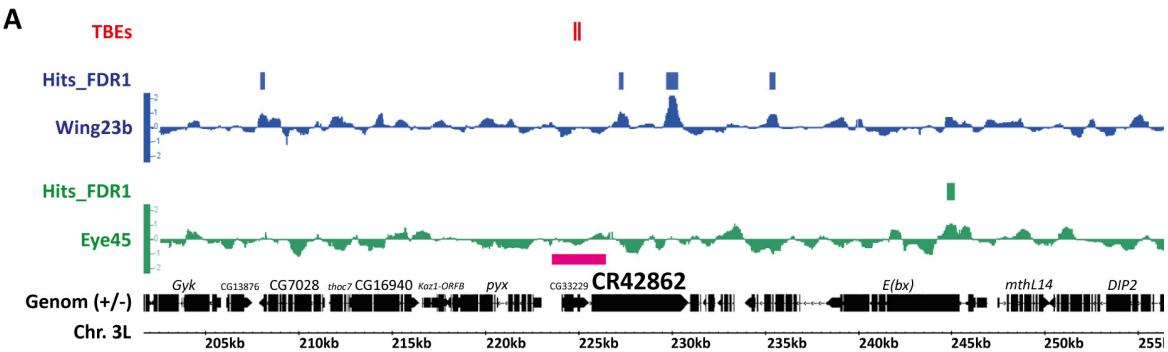


Abb. 31 (auf der vorherigen Seite): Das Gen CR42862 wird von Omb in wildtypischen Flügelscheiben reprimiert.

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung des Gens CR42862 befinden. Der CR42862-Locus befindet sich auf dem Chr. 3L: 224,106-230,964. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Zusätzlich sind zwei bioinformatisch ermittelte TBEs bei 225,020 (Score: Dm 8,13) und 225,028 Basen (Score: Dm 8,54) (rote Balken) eingetragen. Diese überlappen nicht mit den ChIP-chip definierten Bindestellen. Da sie sich aber in einem hoch konservierten Bereich befinden, wurde ein 3kb-großes *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukt (pinker Balken) hergestellt. Leider wurde es aus zeitlichen Gründen nicht mehr injiziert, weshalb über dessen Aktivität keine Aussage möglich ist.

(B-D) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer CR42862-Sonde (Primer: 1591/1592) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Die Färbung erscheint sowohl in der Flügelscheibe **(B)**, als auch in der Augen-/Antennen- **(C)** und der Beinscheibe **(D)** fast ubiquitär. Nur wenige Stellen sind heller, wie etwa in der Augenscheibe im Bereich der Morphogenetischen Furche. In Bereichen mit Gewebefalten ist eine dunklere Färbung zu erkennen.

(E-J) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer CR42862-Sonde an L3-Imaginalscheiben einer Kreuzung von *dpp-Gal4* mit *UAS-omb* (Tab. 29). **(E-G)** Kontrolle (*dpp-Gal4*). **(H-J)** *dpp-Gal4>UAS-omb*. Die Färbungen in den Kontrollscheiben entsprechen den Beobachtungen im Wildtyp **(B-D)**. Bei ektopischer Expression von *omb* **(H-J)** in der *dpp*-Expressionsdomäne ist keine Veränderung gegenüber der Kontrolle zu beobachten.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

(K) Das relative Expressionslevel von CR42862 (Primer: 1475/1476) in *l(1)omb³¹⁹⁸*-Flügelimaginalscheibe ist in der qPCR im Vergleich zum Wildtyp (*FM-GFP*) um das **2,3**-fache erhöht und bestätigt somit die Beobachtungen aus der Microarray-Analyse. Durchgeführt wurden $\Delta\Delta C_T$ -Experimente, wobei die Normalisierung mit dem Haushaltsgen *rp49* (Primer: 1449/1450) erfolgte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Experimenten mit je drei technischen Replikaten sowie die Standardabweichung. Die beiden unabhängigen Stichproben wurden mittels des zweiseitigen, studentischen t-Tests auf signifikante Unterschiede verglichen. *** höchst-signifikant: $p < 0,001$

5.4.6 *midline* & *H15* (*midH15*)

5.4.6.1 Hintergründe

Das Tbx-Gen *midline* (*mid*) und sein Paralog *H15* zählen zu der Familie der Tbx20-Proteine und wirken in einer Vielzahl von Prozessen, wie der Neurogenese oder der Herzentwicklung redundant (Buescher *et al.*, 2006; Miskolci-McCallum *et al.*, 2005).

In der Embryonalentwicklung spielen beide Gene eine Rolle in der Entwicklung des Neuroektoderms. Die Segmentpolaritätsgene werden jeweils im anteriorsten und posteriorsten Bereich eines jeden Segments exprimiert. In einigen Neuroblasten wirken Mid und H15 redundant bei der Regulation der Expression von Markergenen wie z. B. der von *eagle* (*eg*) (Buescher *et al.*, 2006).

In der Flügelscheibe von L3-Larven wird *mid* ubiquitär in der Peripodialmembran sowie dem Hauptepithel exprimiert. Tatsächlich scheint Mid die Flügelentwicklung durch die Repression von *wg* und *hh* zu beeinflussen (Fu *et al.*, 2016). *Hh* wird allerdings über einen indirekten Mechanismus attenuiert. Die Regulation von *wg* ist noch nicht geklärt (Fu *et al.*, 2016). Auch über die Expression

von *H15* in der Flügelscheibe, eine mögliche Rolle in der Flügelentwicklung oder eine Redundanz in Bezug auf *mid* ist bislang nichts bekannt.

Mid und H15 spielen beide eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Beins bzw. in der Spezifizierung des ventralen Schicksals (Svendsen *et al.*, 2009). Beide Gene werden ventral von Wg aktiviert. Ihre Expression erstreckt sich etwas über die Domäne von Wg hinaus. Dorsal beschränkt Dpp die Expansion von *mid* und *H15*. Zwar sind weder *mid* noch *H15* für die Beinentwicklung essentiell, allerdings führt der Verlust beider Gene in Klonen zu einer ventral-zu-dorsal Transformation (Svendsen *et al.*, 2009). 2013 wurde darüberhinaus gezeigt, dass Mid in L3-Augenimaginalscheiben die Expression des proneuralen Gens *atonal* (*ato*) reguliert und somit zur Selektion von *sensory organ precursor* (SOP)-Zellen beiträgt (Das *et al.*, 2013). In den nachfolgenden pupalen Stadien spezifiziert Mid als Mitglied des Notch-Delta Signalwegs das Schicksal der SOP-Zellen und ist für die Unterdrückung apoptotischer Signalwege essentiell.

5.4.6.2 Ergebnisse & Diskussion

Im Rahmen der ChIP-chip Experimente konnten in Bezug auf die Flügelscheibe keine Bindestellen für Omb identifiziert werden, die sich innerhalb der beiden Transkriptionseinheiten befinden. Jedoch wurden Bindestellen im genomischen Bereich zwischen den beiden Genen festgestellt. Im Chromatin der Augen-/Antennenscheibe wurde dagegen eine Bindestelle im *H15*-Lokus identifiziert und zwei im *downstream*-Bereich von *mid* (Abb. 32A).

Aufgrund der bioinformatischen Vorhersage der TBEs wurde ein gut konservierter 4,1kb-großer genomischer Bereich downstream von *mid* bestimmt, der zur Herstellung eines *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukts dienen sollte (Tab. 14).

Zunächst wurde das Konstrukt auf seine Aktivität in den Imaginalscheiben der transgenen L3-Larven hin untersucht (Abb. 32B-D). In der Flügelscheibe zeigt sich ein Expressionsmuster im notalen Bereich der Flügelscheibe, ähnlich der bekannten *wg*-Expressionsdomäne. Eine Übereinstimmung mit dem von Fu *et al.* präsentierten, endogenen Expressionsmuster von *mid* ist allerdings nicht zu erkennen (Fu *et al.*, 2016). Im *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund werden drei zusätzliche Muster detektiert, die der Notum-Färbung in ihrer Größe und Form ähneln (Abb. 32E). Die Muster sind entlang der A-/P-Grenze im posterioren Kompartiment der Scheibe lokalisiert.

In der wildtypischen Augen-/Antennenscheibe sind einige punktförmige Muster vor allem in der Antenne zu erkennen. Diese sind allerdings sehr schwach gefärbt und lassen im *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund keine Veränderung erkennen (Abb. 32, C und F). Die Beobachtungen im Wildtyp entsprechen nicht den Erwartungen basierend auf der Publikation von Das und Kollegen (Das *et al.*, 2013). Dort wird eine posteriore Co-Expression von *mid* und *H15* überlappend mit Elav in Photorezeptor-Neuronen gezeigt.

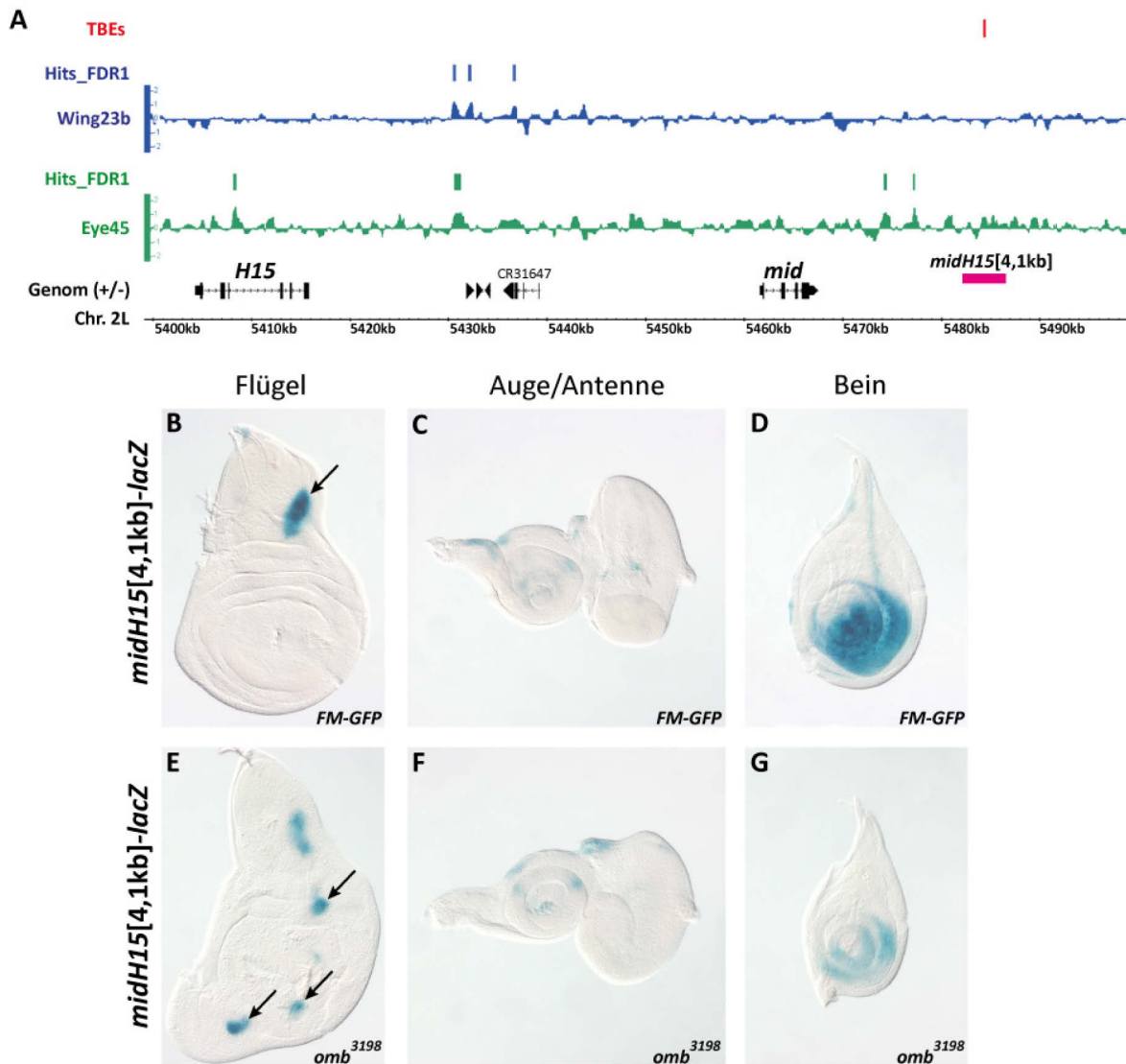


Abb. 32: *midH15-lacZ* reproduziert das endogene *mid*-Expressionsmuster in der Beinscheibe.

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung der Gene *midline* (*mid*) und *H15* befinden. Die Loci beider Gene befinden sich in unmittelbarer Nähe auf dem Chr. 2L. *H15*: 5,404,342-5,415,928; *mid*: 5,461,641-5,467,610. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Zusätzlich ist eine bioinformatisch ermittelte TBE (Score: Dm 10,34) bei 5.484.423 Basen (roter Balken) eingetragen. Diese überlappt nicht mit den ChIP-chip definierten Bindestellen. Da sie sich aber in einem hoch konservierten Bereich befindet, wurde ein 4,1kb-großes *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukt (pinker Balken) hergestellt und injiziert. Die Imaginalscheiben der transgenen Larven wurden mittels X-Gal Färbungen analysiert.

(B-D) X-Gal Färbung an *FM-GFP* (Wildtyp)-L3-Larven mit dem *midH15*[4,1kb]-*lacZ* Fragment (Insertionsort: 2L, 25C6). (B) Die Flügelscheibe zeigt ein Expressionsmuster im Bereich des posterioren Notums (Pfeil). (C) Die Augen-/ Antennenscheibe zeigt einige punktförmige, schwache Färbungen in der Antenne sowie wenige in der Augenscheibe. (D) Die Beinscheibe weist die bekannte *midH15*-Expression im ventralen Bereich auf.

(E-G) X-Gal Färbung an *I(1)omb*³¹⁹⁸-L3-Larven mit dem *midH15*[4,1kb]-*lacZ* Fragment (Insertionsort: 2L, 25C6). (E) Die Flügelscheibe zeigt drei zusätzliche Expressionsmuster im posterioren Kompartiment entlang der A-/P-Achse (Pfeile). (F+G) Die Augen-/Antennenscheibe sowie die Beinscheibe weisen keine Veränderung der Färbung im Vergleich zum Wildtyp auf.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

Bezogen auf die Beinscheibe stellt der Enhancer tatsächlich das aus der Literatur bekannte ventrale Expressionsmuster von *midH15* dar (Svendsen *et al.*, 2009). Die etwas schwächere Expression bei *omb*-Verlust ist irrelevant, da auch einige Scheiben eine ähnlich starke Expression vergleichbar zum Wildtyp aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Da die Rolle von *mid* und *H15* in der Embryonalentwicklung weitaus besser untersucht wurde als in der Entwicklung der Larve, sollte auch das Expressionsmuster des *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukts in späten embryonalen Stadien ermittelt werden. Dafür wurden sogenannte Filetpräparate hergestellt, die eine direkte Sicht auf das Zentrale und das Periphere Nervensystem ermöglichen. Eine Dreifachfärbung gegen β -Gal, Omb und das axonale Adhäsionsprotein Fasciclin 2 (Fas2) zeigt in den Stadien 12 und 14 eine deutliche Expression von *midH15-lacZ* im embryonalen Nervensystem (Abb. 33). Auch im späten Stadium 16 konnte β -Gal noch schwach detektiert werden. Die Färbung gegen β -Gal und Omb zeigte in allen analysierten Stadien jedoch keine augenfällige Überlappung.

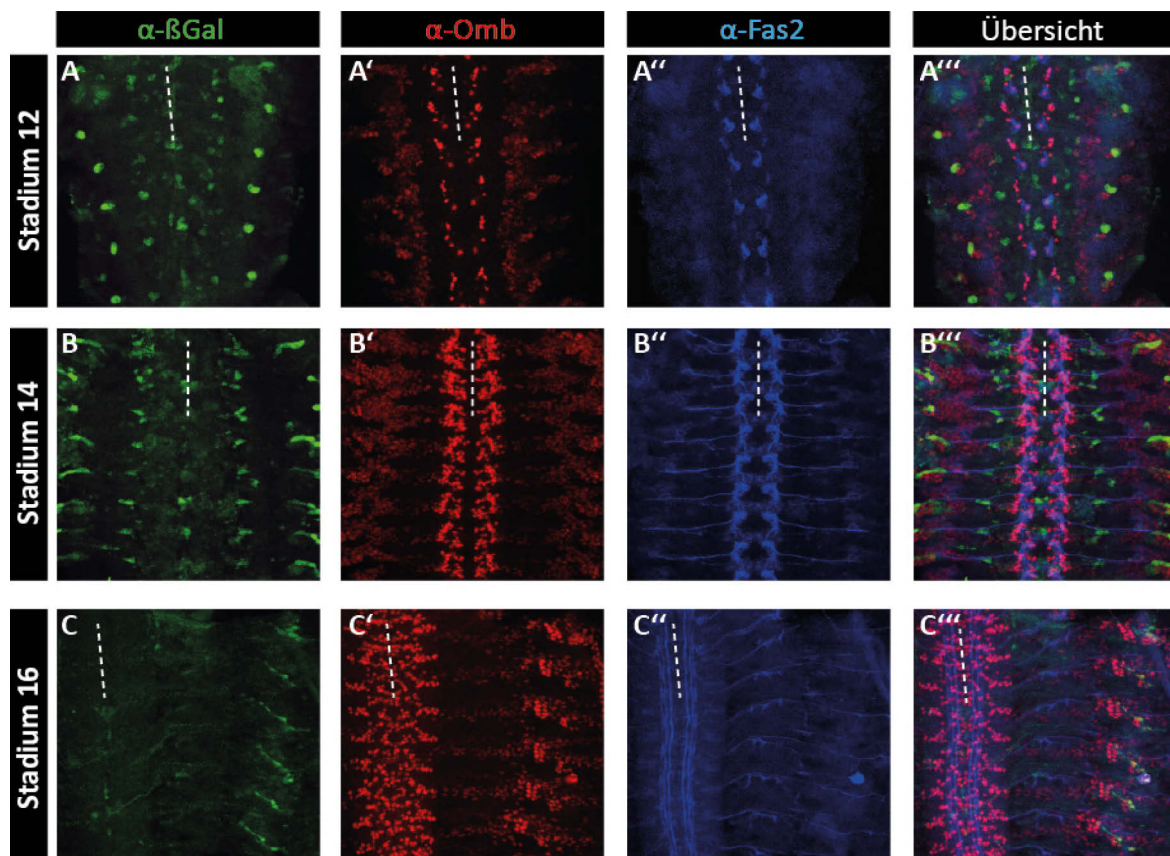


Abb. 33: *midH15-lacZ* wird in späten embryonalen Stadien im Bereich des ZNS exprimiert.

(A-C) Konfokale Aufnahme (Maximumprojektion) der Antikörperfärbungen mit α - β -Gal (grün), α -Omb (rot) und α -Fas2 (blau) an späten Embryonen des Stamms *midH15*[4,1kb]-*lacZ* (Insertionsort: 2L, 25C6). α -Fas2 (A'', B'', C'') markiert alle Motoraxone. (A-A''') Stadium 12. (B-B''') Stadium 14. (C-C''') Stadium 16 (spät). In den Filetpräparaten ist die ventrale Mittellinie durch eine gestrichelte weiße Linie markiert. Die Färbungen sind jeweils einzeln und in einer Übersicht aller Antikörper dargestellt.

Um zu bestimmen, inwiefern die *midH15-lacZ*-Färbung mit dem endogenen Expressionsmuster von *midH15* im Embryo übereinstimmt, wurden Färbungen mit verschiedenen MidH15-Antikörpern durchgeführt (hier nicht gezeigt). Leider konnte mit keinem der Antikörper eine verwertbare Färbung erzielt werden. Somit bleibt die Co-Expression von *midH15-lacZ* mit der endogenen Expression unklar.

Ob *midH15* von Omb reguliert wird, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Das 4,1kb-großes *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukt reproduziert allerdings deutlich das bekannte endogene Expressionsmuster von *midH15* in der Beinimaginalscheibe. Hier konnte also der entsprechende Enhancer im *downstream*-Bereich von *mid* identifiziert werden. Die Expression scheint aber, trotz vorliegender TBE, keine Abhängigkeit von Omb aufzuweisen (Abb. 32D und G). Es ist nicht bekannt, ob die endogene *mid/H15*-Expression in *l(1)omb* dorsal expandiert. Der schwache Beinphänotyp von *l(1)omb* pharat adulten Tieren macht dies unwahrscheinlich, da die ektopische dorsale Expression von *mid/H15* zu einer ventralen Transformation führt (Pflugfelder *et al.*, 2017).

Wie *midH15-lacZ* im Notumbereich der Flügelscheibe exprimiert werden, ist in der Literatur nicht dokumentiert. Die drei zusätzlichen Expressionsmuster im posterioren Kompartiment entlang der A-/P-Achse im *l(1)omb*³¹⁹⁸ –Hintergrund könnten einen sekundären Effekt durch die Veränderung des Zellschicksals in der Scheibe darstellen (Abb. 32G). Wie schon in Bezug auf die Effekte beim dorsalen Selektorgen *apterous* (*ap*) vermutet wurde (5.4.1), kann durch den Verlust von *omb* eine Dorsalisierung der Scheibe stattfinden. Somit würde sich das dorsale *midH15-lacZ* Expressionsmuster in der vermeintlich ventralen Region der Scheibe widerspiegeln.

5.4.7 Matrix-Metalloproteinasen (MMP1 und MMP2)

5.4.7.1 Hintergrund

Die Matrix-Metalloproteinasen MMP1 und MMP2 sind die einzigen bekannten *Drosophila*-Vertreter einer großen Familie Zn-haltiger Endopeptidasen (Guha *et al.*, 2009). Die Enzyme sind in der Lage Proteine der extrazellulären Matrix zu spalten. Aufgrund dessen sind Mitglieder dieser Familie an vielen entwicklungsbiologischen Prozessen wie Metamorphose oder Zellmigration beteiligt, werden aber auch mit Tumorwachstum und Metastasenbildung assoziiert (Beaucher *et al.*, 2007).

In der Fruchtfliege wird MMP1 unter anderem für das larvale Tracheenwachstum benötigt und MMP2 für die Histolyse larvalen Gewebes während der Metamorphose (Page-McCaw *et al.*, 2003). *MMP2*-Transkripte konnten mittels *in situ*-Hybridisierung bereits in L3-Imaginalscheiben und im Bereich der Optischen Loben des Gehirns detektiert werden. In der Augenscheibe wurde eine

besonders starke Expression entlang der morphogenetischen Furche sowie in der Lamina beobachtet (Llano *et al.*, 2002).

Da Omb viele Entwicklungsprozesse wie die korrekte Zell-Morphogenese kontrolliert (Shen *et al.*, 2010), sollte ein Zusammenhang mit den beiden Vertretern der MMP-Familie in L3-Imaginalscheiben untersucht werden.

5.4.7.2 Ergebnisse & Diskussion

Sowohl für *MMP1* als auch für *MMP2* konnten in der bioinformatischen Suche keine TBEs zugeordnet werden. Im CHIP-chip wurden für beide Gene hingegen Bindestellen identifiziert (Abb. 34A, Abb. 35A).

Um die Abhängigkeit der beiden *MMPs* von Omb zu untersuchen wurden *in situ*-Hybridisierungen an L3-Larven durchgeführt (Abb. 34, Abb. 35). Nach der Bestimmung des wildtypischen Expressionsmusters, wurden im Anschluss mögliche Effekte durch *omb*-LOF (*en>omb-RNAi*) oder *omb*-GOF (*dpp>omb*) analysiert (Tab. 29).

Im Falle von *MMP1* konnte im Wildtyp kein spezifisches Muster in der Imaginalscheibe selbst detektiert werden, nur in der Trachee (Pfeil), welche distal an der Flügelscheibe angelagert ist (Abb. 34B-D). Diese lies sich in allen Flügelscheiben, egal welchen Genotyps reproduzieren. Omb wird ebenfalls in Zellen dieser Trachee exprimiert (Pflugfelder *et al.*, 2017). Allerdings ist die Rolle von Omb in der Entwicklung dieser Trachee noch unbekannt. Sowohl bei Verlust der *omb*-Expression im posterioren Kompartiment (Abb. 34E-G) als auch bei ektopischer *omb*-Expression in der *dpp*-Domäne (Abb. 34H-J) konnte jedoch keine Veränderung detektiert werden. In beiden Fällen zeigen die Flügelscheiben morphologische Effekte, die den Erfolg der Kreuzung bestätigen, also die ektopische Falte in der *pouch* bei posterioren *omb*-Verlust bzw. die notale Deformation bei ektopischer *omb*-Expression entlang der *dpp*-Domäne (Pfeilköpfe). Liu und Kollegen beschreiben in *en>ombRNAi*-Scheiben allerdings eine Akkumulation von *MMP1*-Protein in einem dünnen Streifen auf beiden Seiten der ektopischen Falte (Liu *et al.*, 2016).

Im Gegensatz zu *MMP1* konnte für *MMP2* in allen untersuchten Scheibentypen ein Expressionsmuster ermittelt werden. Im Wildtyp zeigt die Flügelscheibe zwei symmetrische Färbungen in der anterioren und posterioren dorsalen *hinge* (Abb. 35B, Pfeile). In der Augenscheibe konnte die bereits beschriebene intensive Färbung entlang der morphogenetischen Furche sowie der Lamina reproduziert werden. Zusätzlich wiesen alle Scheiben eine Färbung der presumptiven Ocellen auf (Abb. 35C, Pfeile). Pro Augenscheibe existieren eineinhalb Ocellen am dorsalen Augenrand, die in der adulten Fliege zusammen drei Ocellen bilden. Die Ocellen bzw. Punktaugen dienen der Hell-Dunkel-Wahrnehmung in Insekten. Das *MMP2*-Expressionsmuster in den Beinscheiben erscheint diffus, mit Schwerpunkt in der dorsalen Scheibe (Abb. 35D). Der

Verlust von *omb* durch Verwendung eines *en*-Treibers hat in allen Scheibentypen keinen Einfluss auf die *MMP2*-Expression (Abb. 35E-G).

Die *omb*-GOF Experimente wurden unter zwei Bedingungen durchgeführt. Entweder wurden die Kreuzungen bei 18°C (Abb. 35H-J) bis zur Eiablage gehalten oder bei 25°C (Abb. 35K-M), um sie dann beide auf 29°C zu transferieren. Der morphologische Effekt in der Flügel- und in der Augenscheibe ist im 25°C-Ansatz (Abb. 35K+L), jeweils deutlich ausgeprägter. Interessanterweise ist auch in diesen Flügelscheiben eine ektopische Falte im Bereich der *pouch* (Pfeilkopf) zu erkennen, ähnlich wie bei posteriorem Verlust der *omb*-Expression. In der Flügelscheibe ist jedoch in beiden Fällen kein Effekt auf die *MMP2*-Expression zu beobachten (Abb. 35H+K).

Das Expressionsmuster in der Augenscheibe (Abb. 35I+L) unterscheidet sich zwischen den beiden Ansätzen allerdings deutlich. Der 18°C-Ansatz zeigt das wildtypische Muster, wohingegen der 25°C-Ansatz eine Eliminierung der *MMP2*-Expression am dorsalen Augenrand (Pfeil) aufweist. Die Augenscheibe ist aber auch kaum ausgebildet (Abb. 35L), da *omb* ein Antagonist der Augenentwicklung ist (Tsai *et al.*, 2015).

Die Expression von *MMP1* wird in den gezeigten Imaginalscheiben definitiv nicht von *Omb* beeinflusst. Weder *omb*-LOF noch *omb*-GOF induziert einen Effekt. Ähnliches gilt für *MMP2*. Nur in der Augenimaginalscheibe scheint bei ektopischer *omb*-Expression (*dpp>omb*) eine Reduktion der Expression im dorsalen Augenrand aufzutreten. Da die ektopische *omb*-Expression in den Augenrändern aber generell die retinale Entwicklung blockiert (Tsai *et al.*, 2015), kann die *MMP2*-Reduktion auch einen indirekten Effekt durch die morphologische Veränderung darstellen. Um diese Frage abschließend zu klären, müssten mindestens Doppelfärbungen gegen *MMP2* und *omb* durchgeführt werden, oder sogar Dreifachfärbungen mit einem dorsalen Selektorgen wie *Iro-C* (Singh *et al.*, 2011).

Zusätzlich wäre es natürlich interessant den Effekt von *l(1)omb³¹⁹⁸* auf die *MMP2*-Expression im Auge zu untersuchen, da hypomorphe *omb*-Allele und *omb knock-down* zu einer vergrößerten Augenscheibe führen (Tsai *et al.*, 2015).

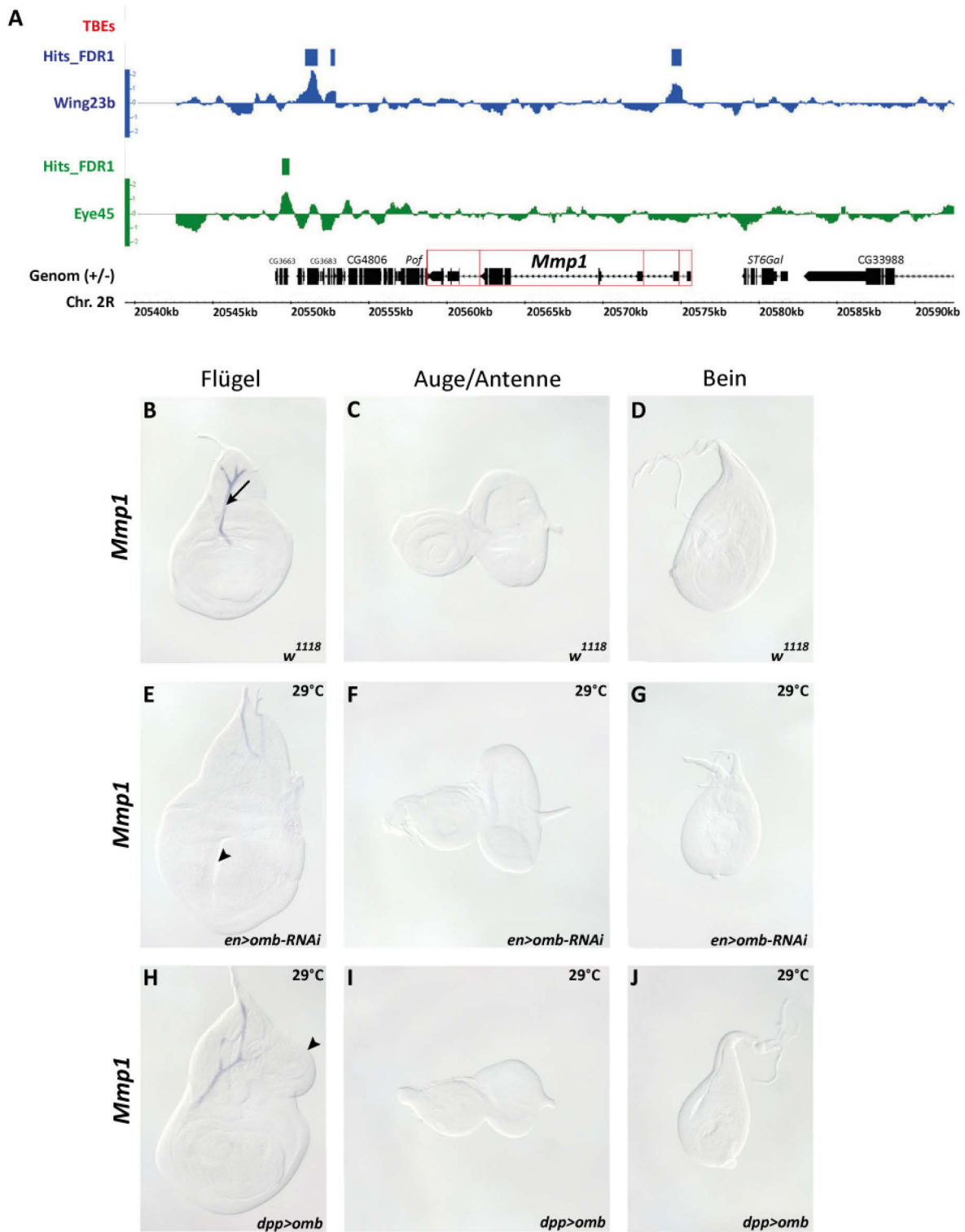


Abb. 34: Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) wird nicht von Omb beeinflusst.

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw.-Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung des Gens *Matrix metalloproteinase 1* (*MMP1*) befinden. Der *MMP1*-Locus befindet sich auf dem Chr. 2R: 20,558,817-20,575,704. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Dem Gen *MMP1* konnte keine bioinformatisch ermittelte TBE zugeordnet werden.

(B-D) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *MMP1*-Sonde (Primer: 1896/1897) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Bis auf eine violette Färbung in der Trachea (Pfeil) der Flügelscheibe **(B)** zeigen die Scheiben keine Färbung.

(E-G) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *MMP1*-Sonde an L3-Imaginalscheiben einer Kreuzung von *en-Gal4* mit *UAS-ombRNAi* (Tab. 29). Die Kreuzung wurde bei 29°C gehalten. Durch den posterioren *omb*-Verlust ist in der Flügelscheibe **(E)** deutlich die ektopische Falte in der *pouch* (Pfeilkopf) zu erkennen. In Bezug auf die *MMP1*-Expression ist kein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen.

(H-J) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *MMP1*-Sonde an L3-Imaginalscheiben einer Kreuzung von *dpp-Gal4* mit *UAS-omb* (Tab. 29). Die Kreuzung wurde bei 29°C gehalten. Auch in diesem Fall unterscheidet sich die *MMP1*-Expression nicht vom Wildtyp. Die Scheiben weisen keine Färbung auf.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

Abb. 35 (auf der nachfolgenden Seite): Omb ist ein Antagonist der Augenentwicklung und der *MMP2*-Expression im Auge.

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung des Gens *Matrix metalloproteinase 2* (*MMP2*) befinden. Der *MMP2*-Locus befindet sich auf dem Chr. 2R: 5,498,644-5,571,363. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Dem Gen *MMP2* konnte keine bioinformatisch ermittelte TBE zugeordnet werden.

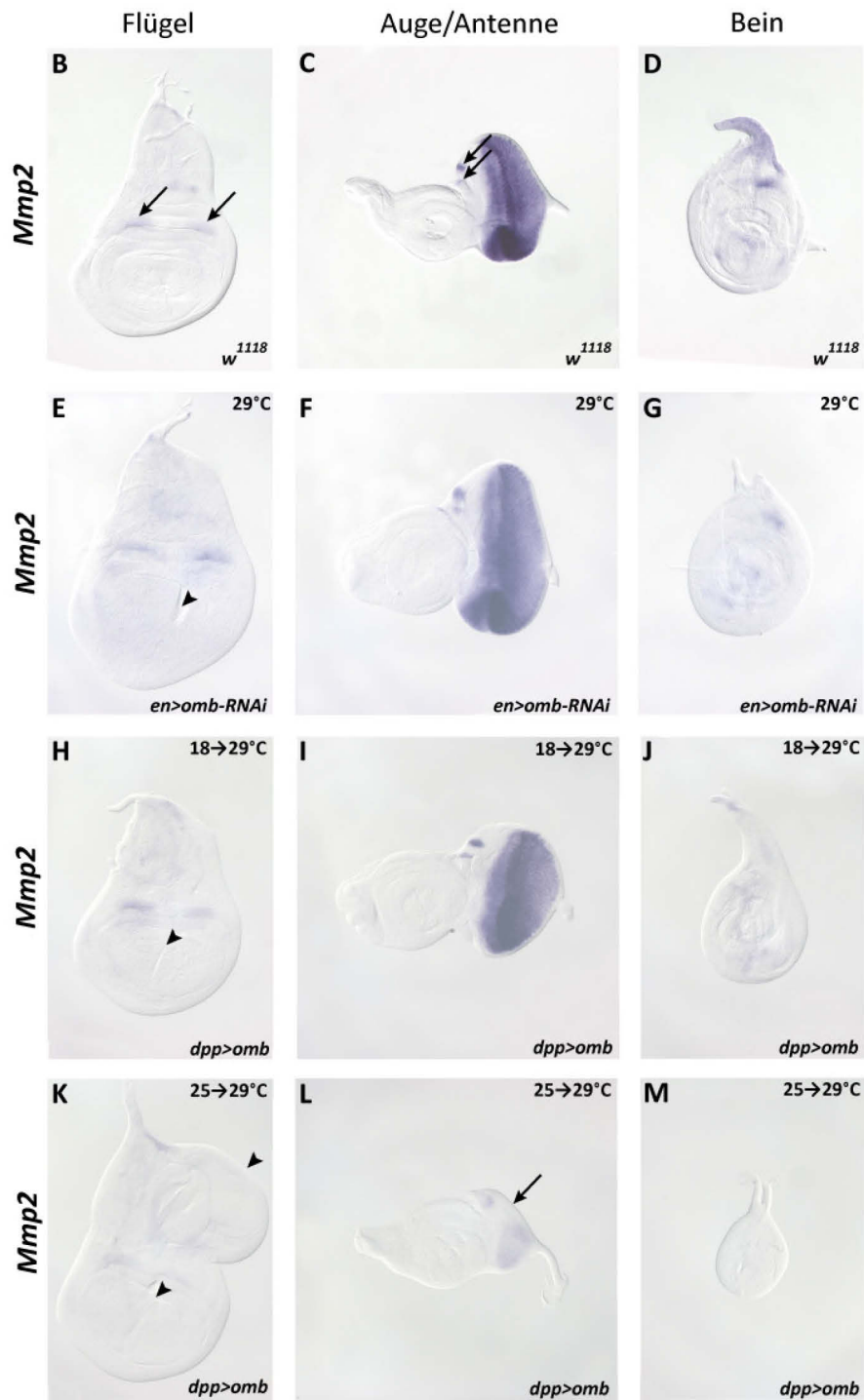
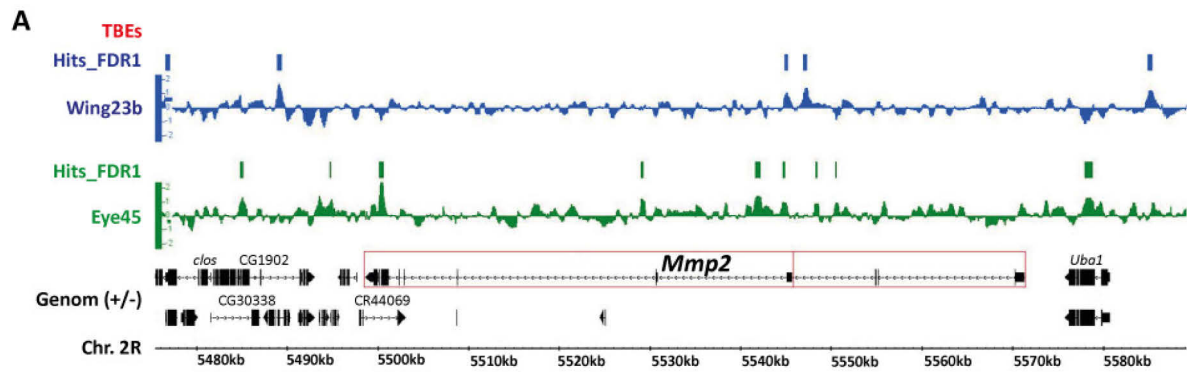
(B-D) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *MMP2*-Sonde (Primer: 1424/1425) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Die Färbungen in der Flügelscheibe **(B)** und die Ocellen in der Augenscheibe **(C)** sind jeweils mit Pfeilen markiert.

(E-G) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *MMP2*-Sonde an L3-Imaginalscheiben einer Kreuzung von *en-Gal4* mit *UAS-ombRNAi* (Tab. 29). Die Kreuzung wurde bei 29°C gehalten. Durch den posterioren *omb*-Verlust ist in der Flügelscheibe **(E)** deutlich die ektopische Falte in der *pouch* (Pfeilkopf) zu erkennen. Das wildtypische *MMP2*-Expressionsmuster wird durch den posterioren *omb*-Verlust nicht beeinflusst.

(H-M) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *MMP2*-Sonde an L3-Imaginalscheiben einer Kreuzung von *dpp-Gal4* mit *UAS-omb* (Tab. 29). Die erste Kreuzung **(H-J)** wurde bei 18°C angesetzt und nach der Eiablage nach 29°C transferriert. Die Flügelscheibe weist ebenfalls eine ektopische Falte im Bereich der *pouch* (Pfeilkopf) auf. Die *MMP2*-Expression in den Scheiben entspricht dem wildtypischen Muster.

Die zweite Kreuzung **(K-M)** wurde bei 25°C angesetzt und nach der Eiablage ebenfalls nach 29°C transferriert. Die morphologischen Veränderungen sind deutlich stärker ausgeprägt (Pfeilköpfe). In der Augenscheibe scheint eine deutliche Reduktion der *MMP2*-Expression aufzutreten (Pfeil).

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.



5.4.8 *yellow (y)* und *ebony (e)* - Omb und die abdominale Pigmentierung

5.4.8.1 Hintergrund

Omb spielt nicht nur eine Rolle in der Musterbildung von Flügel und Auge, sondern auch in der Pigmentierung des adulten Abdomens. Zumindest führen die *omb gain-of-function* Allele der *Quadroon (Qd)*-Klasse zu einer verstärkten Pigmentierung im anterioren Bereich der abdominalen Tergiten (Pflugfelder, 2009).

Insekten steuern ihre Pigmentierung maßgeblich über die Produktion von braunem und schwarzem Melanin. Die Regulation und Funktion der Gene *ebony (e)* und *yellow (y)* ist essentiell für die Entstehung der Pigmentmuster in *Drosophila* (Wittkopp *et al.*, 2002). Besonders gut lässt sich der Einfluss der beiden Gene bei der Pigmentierung im posterioren Bereich der abdominalen Segmente A2-A6 nachvollziehen. *y*-Mutanten weisen einen braunen Pigmentstreifen auf, da das schwarze Melanin in diesem Bereich verloren geht. In *e*-Mutanten verändert sich der Streifen nicht, allerdings erscheint die anteriore Kutikel dunkler als im Wildtyp (Wittkopp *et al.*, 2002).

E und *y* sind auch für die Pigmentierung anderer Strukturen, wie des Thorax oder der Flügel notwendig. Wildtypische Fliegen weisen eine uniforme Färbung beider Strukturen auf. In *y*-Mutanten färben sich Thorax und Flügel bräunlich, in *e*-Mutanten dunkler. Die Flügel der *e*-Mutanten sind zusätzlich rund um die Venen nochmals dunkler gefärbt (Wittkopp *et al.*, 2002).

Das Muster und die Intensität der *e*- und *y*-Expression scheint also den Grad der Melanisierung und somit der Pigmentierung zu bestimmen. Ein Zusammenhang mit *Omb* sollte daher untersucht werden.

5.4.8.2 Ergebnisse & Diskussion

In den ChIP-chip Experimenten wurde für *y* keine *Omb*-Bindestelle identifiziert. Die nahe gelegene Bindestelle im Flügel-Chromatin wurde gemäß des verwendeten Algorithmus dem Gen *yar* zugeordnet (Abb. 36A). *E* konnte im Chromatin der Flügelscheiben hingegen eine Bindestelle zugeordnet werden (Abb. 36N).

Um die Enhancer-Aktivität von sechs *y*- und drei *e*-Reporter-Linien (Tab. 9, Tab. 16) zu testen wurden Kreuzungen der Linien mit UAS-*lacZ* mittels X-Gal Färbungen an Flügelimaginalscheiben von L3-Larven überprüft. Weder in Bezug auf die *y*-Linien noch auf die *e*-Linien konnte eine reproduzierbare Färbung identifiziert werden (Abb. 36B-G und O-Q).

Färbungen im *omb*-mutanten Hintergrund wären natürlich von besonderem Interesse, allerdings konnten aufgrund der geringen Überlebensrate der Linien keine Kreuzungen mit *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Fliegen angesetzt werden.

Mittels *in situ*-Hybridisierung mit einer *e*-Sonde konnte in wildtypischen Imaginalscheiben ebenfalls keine Färbung detektiert werden (Anhang, Abb. 50D-F).

Tab. 16: *yellow* (y)- und *ebony* (e)-Enhancer-Reporter-Linien

Linie	Stock Nummer*	Chromosomale Lokalisation
y-Gal4 Linie 1 (y-1)	213804 (VDRC)	X:244,094-246,285
y-Gal4 Linie 2 (y-2)	200409 (VDRC)	X:247,175-249,275
y-Gal4 Linie 3 (y-3)	200410 (VDRC)	X:248,586-250,743
y-Gal4 Linie 4 (y-4)	200411 (VDRC)	X:250,097-252,196
y-Gal4 Linie 5 (y-5)	213805 (VDRC)	X:251,577-253,760
y-Gal4 Linie 6 (y-6)	201784 (VDRC)	X:255,238-257,329
e-Gal4 Linie 1 (e-1)	39447 (Janelia)	3R:17,058,720-17,062,708
e-Gal4 Linie 2 (e-2)	41298 (Janelia)	3R:17,063,249-17,066,781
e-Gal4 Linie 3 (e-3)	46444 (Janelia)	3R:17,065,457-17,067,305

*VDRC: Vienna Drosophila Resource Center, Wien, Österreich

*Janelia: Janelia Farm Research Campus, Ashburn, USA

Nichtsdestotrotz ergab die Analyse der endogenen Expression von *y* und *e* mittels qPCR interessante Ergebnisse bezüglich der relativen Expression in *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Flügelscheiben (Abb. 36R). *E* zeigt eine sehr starke Derepression, also eine verstärkte Expression im *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund. Die Expression von *y* zeigt den gegenteiligen Effekt. Bei Verlust von *Omb* wird *y* sehr stark reprimiert (Abb. 36R).

Die Ergebnisse der qPCR sind ein erster Hinweis auf einen möglichen Einfluss von *Omb* auf die beiden Pigmentierungsgene *e* und *y*, müssten aber vermehrt reproduziert werden um die Aussagekraft zu erhöhen.

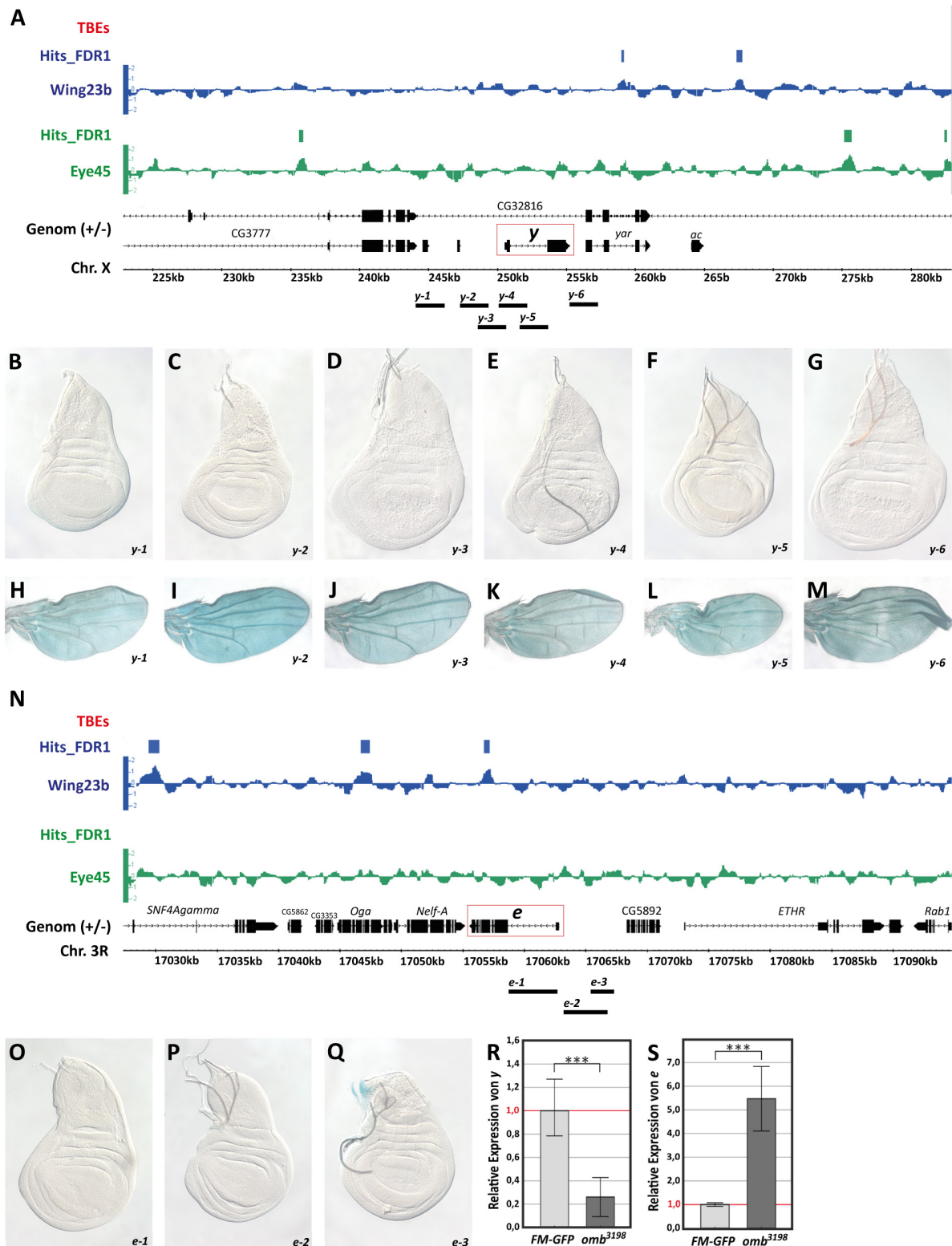


Abb. 36: yellow (y) und ebony (e) werden von Omb in der Flügelscheibe beeinflusst

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung des Gens *yellow* (*y*) befinden. Der Locus befindet sich auf dem Chr. X: 250,542-255,278. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Dem Gen *y* konnte keine bioinformatisch ermittelte TBE zugeordnet werden. Mit horizontalen schwarzen Balken sind die sechs verwendeten Reporter-Linien (*y*-1 bis *y*-6) eingezeichnet (Tab. 16).

(B-G) X-Gal Färbung an Flügelimaginalscheiben wildtypischer L3-Larven der verschiedenen *y*-Reporterlinien (*y*-1 bis *y*-6) (Tab. 16). Die Scheiben weisen allesamt keine spezifische Färbung auf.

(H-M) X-Gal-Färbung an Flügeln pharat adulter Tiere der verwendeten γ -Reporterlinien (γ -1 bis γ -6). Die Flügel weisen alle eine ubiquitäre Blau-Färbung auf. Anterior ist oben, posterior unten (vgl. Abb. 2). Die Flügel wurden mit einer 2,5-fachen Vergrößerung am Lichtmikroskop dokumentiert.

(N) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung des Gens *ebony* (*e*) befinden. Der Locus befindet sich auf dem Chr. 3R: 17,055,561-17,062,900. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Dem Gen *e* konnte keine bioinformatisch ermittelte TBE zugeordnet werden. Mit horizontalen schwarzen Balken sind die drei verwendeten Reporter-Linien (*e*-1 bis *e*-3) eingezeichnet (Tab. 16).

(O-Q) X-Gal Färbung an Flügelimaginalscheiben wildtypischer L3-Larven der verschiedenen *e*-Reporterlinien (*e*-1 bis *e*-3) (Tab. 16). Die Scheiben weisen allesamt keine spezifische Färbung auf.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

(R-S) Das relative Expressionslevel von γ (Primer: 1659/1660) und *e* (Primer: 1552/1553) in *l(1)omb³¹⁹⁸*-Flügelimaginalscheibe wurde mittels qPCR im Vergleich zum Wildtyp (*FM-GFP*) untersucht. **(R)** Die γ -Expression ist in *l(1)omb³¹⁹⁸*-Mutanten auf das **0,26**-fache reduziert, **(S)** die *e*-Expression weist hingegen eine Steigerung der um das **5,5**-fache auf. Durchgeführt wurden $\Delta\Delta C_T$ -Experimente, wobei die Normalisierung mit dem Haushaltsgen *rp49* (Primer 1449/1450) erfolgte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je zwei Experimenten mit je drei technischen Replikaten sowie die Standardabweichung. Die beiden unabhängigen Stichproben wurden mittels des zweiseitigen, studentischen t-Tests auf signifikante Unterschiede verglichen.

*** höchst-signifikant: $p < 0,001$

5.4.9 Omb beeinflusst die Hh-Signalkaskade

Der Transkriptionsfaktor Omb reguliert Musterbildungsprozesse in der Flügelscheibe nicht nur in Bezug auf die D-/V-Grenze sondern auch auf die A-/P-Grenze. Die Reduktion von *omb* im posterioren Kompartiment führt mit der ektopischen Faltenbildung zu einer morphologischen Veränderung. Zudem wird, laut Liu *et al.* (in Vorbereitung), aber auch die Expression des Hh-Rezeptors Ptc reduziert und somit auch die Hh-Signalaktivität. Diese Annahme bildete die Grundlage für unsere Versuche.

Um zu ermitteln, wo genau Omb in die Hh-Signalkaskade eingreift sollten verschiedene Effektorlinien mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht werden um anschließend einen möglichen Einfluss einer *omb*-LOF-Linie auf diese Effektoren zu bestimmen.

Die Funktionalität der Hh-Effektorlinien sollte zunächst durch eine Kreuzung mit einer *en>stinger-GFP* Treiberlinie bestätigt werden. Nachfolgend sind die Effektorlinien tabellarisch dargestellt (Tab. 17). Weitere Informationen zu den Effektor- und den Treiberlinien finden sich auch in Tab. 9.

Tab. 17: Kreuzungen der Hh-Effektorlinien mit der Treiberlinie *en-Gal4*

Linie	Quelle [Nr.]*	Treiber*	Quelle [Nr.]*
<i>boi-RNAi</i>	VDRC 3060	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1017
<i>boi-RNAi</i>	VDRC 29593	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1016
<i>dally-RNAi</i>	BDSC 28747	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1016
<i>dlp-RNAi</i>	BDSC 34089	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1016
<i>dlp-RNAi</i>	BDSC 34091	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1016
<i>hh-RNAi</i>	GOP 957	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1017
<i>shf-RNAi</i>	VDRC 105890	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1017
<i>boi-EP</i>	BDSC 17003	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1016
<i>boi-EP</i>	BDSC 19963	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1016
<i>boi-EP</i>	BDSC 32582	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1016
<i>disp-EP</i>	BDSC 30154	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1016
<i>Flo-2-EP</i>	BDSC 33541	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1016
<i>shf-EP</i>	BDSC 15899	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1017
<i>UAS-dally</i>	BDSC 5397	<i>en>stinger-GFP</i>	Vef 1016

* siehe auch Tab. 9 Fliegenstämme

In den nächsten Abschnitten sind für die einzelnen Komponenten der Hh-Signalkaskade die CHIP-chip-Daten sowie die *in situ*-Hybridisierungen dargestellt. Die qPCR-Analyse der Expression dieser Gene findet sich in Abschnitt 5.4.9.8.

5.4.9.1 *hedgehog (Hh)*

Obwohl mit der bioinformatischen Suche zwei hoch-konservierte TBEs innerhalb der *hh*-Transkriptionseinheit identifiziert werden konnten, wurden im CHIP-chip weder in den Flügel-noch in den Augendaten bei einem FDR von 1% Bindestellen für Omb identifiziert (Abb. 37A).

Das wildtypische Expressionsmuster von *hh* ist in Imaginalscheiben bekannt und mehrfach beschrieben (Basler und Struhl, 1994; Capdevila und Guerrero, 1994; Tabata und Kornberg, 1994). Dieses Muster konnte mit einer spezifischen *hh*-Sonde im eigenen Versuch an wildtypischen L3-Larven reproduziert werden (Abb. 37B-D). Die Flügelscheibe zeigt die sehr spezifische Färbung im posterioren Kompartiment. Im Bereich der presumptiven Antenne findet sich ebenfalls eine deutlich abgegrenzte Färbung, ebenso wie entlang der morphogenetischen Furche des Augenbereichs. Die Beinscheibe ist im anterioren Bereich gefärbt.

Die Funktionalität der *hh*-RNAi-Linie konnte nachfolgend nicht bestätigt werden, da die Scheiben der Kreuzung mit der *en*-Treiberlinie ebenfalls das wildtypische Muster aufweisen (Abb. 37E-G). Erwartungsgemäß hätte eine Reduktion der *hh*-Expression in allen Scheiben auftreten müssen, da *en* und *hh* in den gleichen Bereichen exprimiert werden.

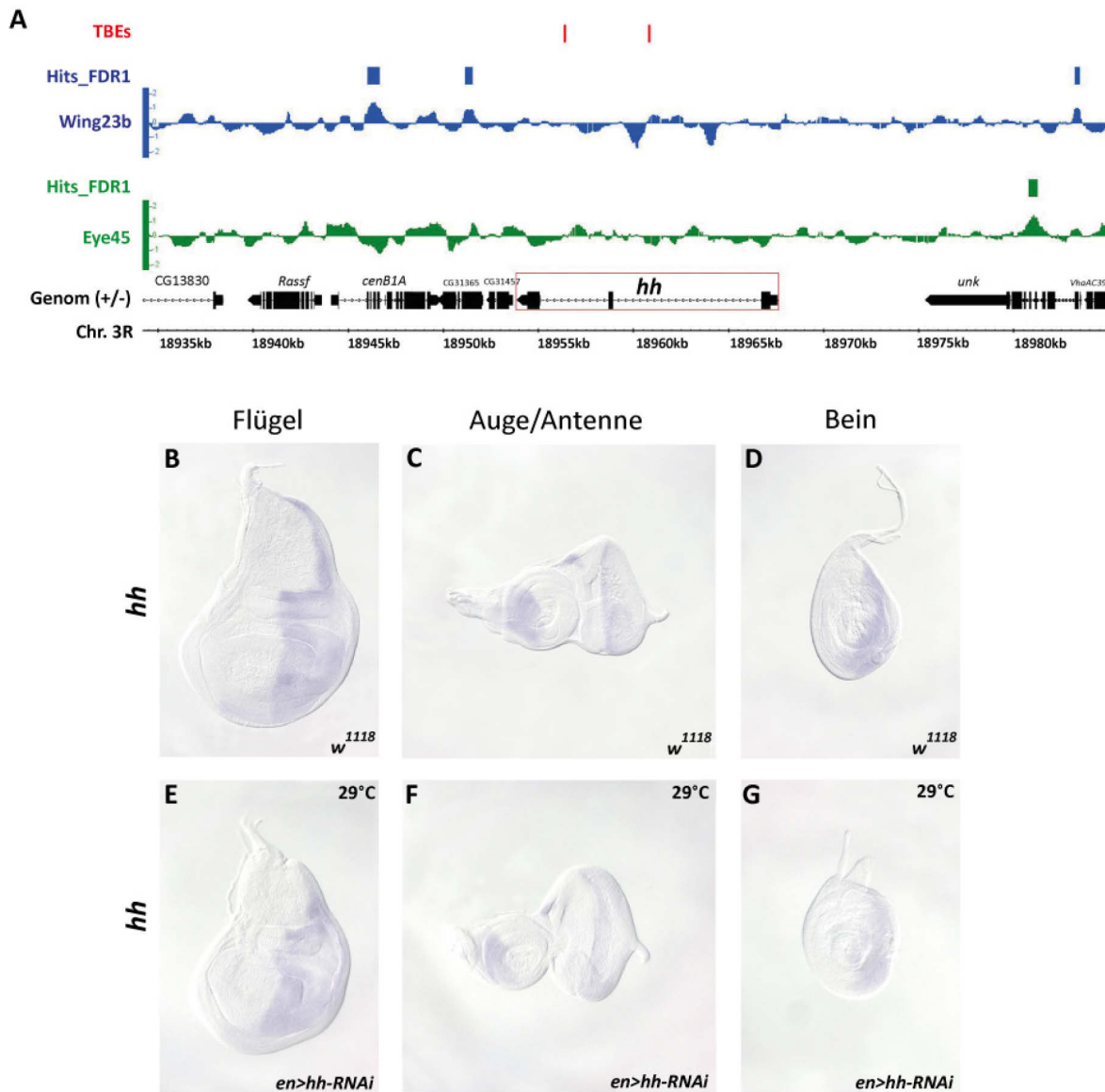


Abb. 37: hedgehog (*hh*)

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung der Gens *hedgehog* (*hh*) (roter Kasten) befinden. Die Lokus des Gens befindet sich auf dem Chr. 3R.: 18,953,891-18,967,628. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. *Hh* wurde weder in den Flügel- noch in den Augendaten bei einem FDR von 1 eine Bindestelle zugeordnet. Allerdings existieren zwei bioinformatisch ermittelte TBEs bei 18,956,417 (Score: Dm 8,46; AvAll 8,46) und 18,960,798 (Score: Dm 9,66; AvAll 9,64) Basen (roter Balken).

(B-D) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *hh*-Sonde (Primer: 1733/1734) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Die Scheiben zeigen das typische *hh*-Expressionsmuster. (E-G) Sichtbare *hh*-ISH an Scheiben der Kreuzung *en>stg-GFP* (Vef 1017)>*hh-RNAi* (GOP 957). Die Kreuzung wurde bis zur Präparation bei 29°C gehalten. Die Scheiben zeigen ebenfalls das wildtypische Muster. (B+E) Flügelscheibe, (C+F) Augen-/Antennenscheibe, (D+G) Beinscheibe.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

5.4.9.2 *interference hedgehog (ihog)* & *brother of ihog (boi)*

Von den beiden Co-Rezeptoren Ihog und Boi war von Anfang an *boi* der interessante Kandidat als potentielles Zielgen von Omb. Im Gegensatz zu *ihog* konnte für *boi* im bioinformatischen Screen eine hoch konservierte TBE im 5'-Bereich der Transkriptionseinheit identifiziert werden (Abb. 39A+B). Die Konservierung der TBE liegt innerhalb von *D. melanogaster* bei 10,1, innerhalb aller *Drosophila*-Spezies bei 7,46.

Im ChIP-chip konnte *boi* allerdings keine Bindestelle in den Flügel-Daten zugeordnet werden, in den Augendaten jedoch drei (Abb. 39A). Für *ihog* konnte nur in den Flügel-Daten eine Bindestelle identifiziert werden (Abb. 38A).

Da für *ihog* keine Effektorlinien zur Verfügung standen wurde nur das wiltypische Muster mittels *in situ*-Hybridisierung bestimmt. Alle Scheibentypen zeigten eine weitestgehend ubiquitäre Färbung (Abb. 38B-D).

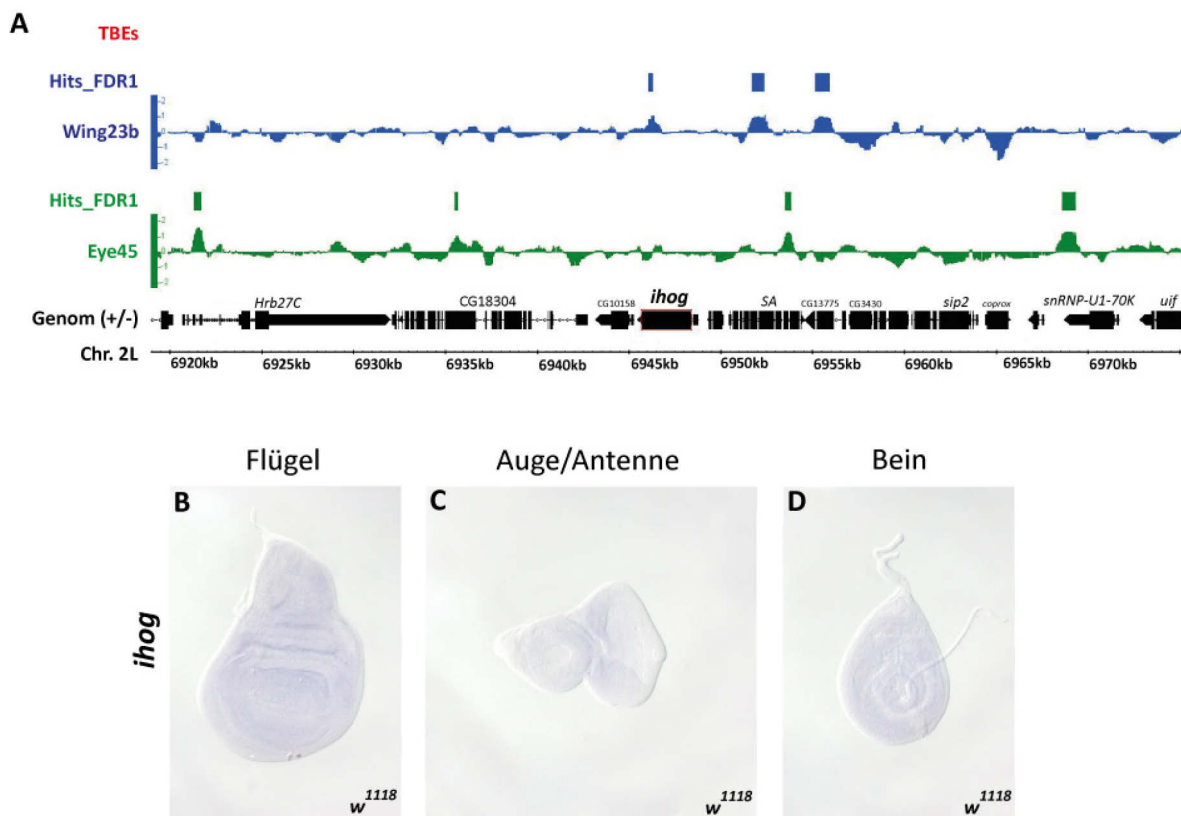


Abb. 38: *Interference hedgehog (ihog)*

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung der Gens *interference hedgehog (ihog)* (roter Kasten) befinden. Der Lokus des Gens befindet sich auf dem Chr. 2L: 6,945,464-6,948,808. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Im Wing23b-Ansatz konnte *ihog* eine Bindestelle zugeordnet werden.

(B-D) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *ihog*-Sonde (Primer: 1735/1736) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Die Scheiben zeigen eine weitestgehend ubiquitäre Färbung. **(B)** Flügelscheibe, **(C)** Augen-/Antennenscheibe, **(D)** Beinscheibe.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

Im Gegensatz zu *ihog*, wurden in Bezug auf *boi* zwei RNAi-Linien sowie drei EP-Linien untersucht (Tab. 17). Doch zunächst wurde das wildtypische Expressionsmuster bestimmt (Abb. 39C-E). Die Flügelscheibe weist insbesondere entlang der Falten der dorsalen *hinge* sowie am posterioren Rand des Notums Färbungen auf. In der *pouch* ist zudem eine Färbung in der sogenannten *zone of non-proliferating cells* (ZNC) zu erkennen. Die Augenscheibe ist anterior der morphogenetischen Furche gefärbt, die Antenne zirkulär im Bereich des ersten antennalen Segments. Die Beinscheibe weist ebenfalls ringförmige Färbungen auf, wahrscheinlich entlang der einzelnen Beinsegmentvorläufer.

Die *en*-getriebenen RNAi-Linien zeigen insgesamt eine dem Wildtyp ähnliche Färbung (Abb. 39F-K). Nur die Flügelscheibe der *en>boi-RNAi*-Kreuzung mit der VDRC 3060 Linie lässt eine Reduktion der *boi*-Expression in der posterioren *pouch* erahnen (Abb. 39F).

Für die EP-Linien konnte zumindest in Bezug auf einzelne Scheibentypen jeweils die Funktionalität nachgewiesen werden (Abb. 40). Die erste untersuchte Linie (B17003) zeigt bei Verwendung des *en*-Treibers in der Flügelscheibe keine Veränderung im posterioren Kompartiment, allerdings ist diese in der Beinscheibe durch eine ektopische *boi*-Expression zu beobachten (Abb. 40A-C).

Die beiden anderen EP-Linien (B19963 und B35582) weisen eine verstärkte *boi*-Expression in der posterioren Flügelscheibe auf. Dies bestätigt nicht nur die Funktionalität der Linie bzw. der Kreuzung sondern auch die der Sonde. In beiden Fällen zeigen die Beinscheiben ebenfalls eine ektopische Expression in der *en*-Domäne (Abb. 40D-I).

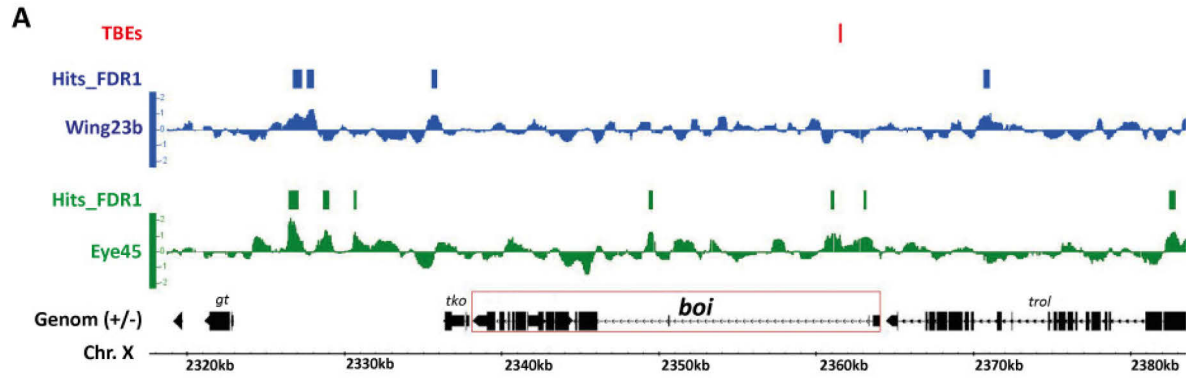
Abb. 39 (auf der nachfolgenden Seite): brother of ihog (*boi*) (Wildtyp und RNAi-Linien)

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung der Gens *brother of ihog* (*boi*) (roter Kasten) befinden. Der Locus des Gens befindet sich auf dem Chr. X: 2,338,200-2,364,076. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Im Eye45-Ansatz konnten *boi* 3 Bindestellen zugeordnet werden. Zusätzlich ist eine bioinformatisch ermittelte, hoch konservierte TBE (Score: Dm 10,1; AvAll 7,46) bei 2,361,554 Basen (roter Balken) eingetragen

(B) Konservierung der bioinformatisch ermittelten TBE (Chr. X: 2,361,554 Basen) innerhalb der 12 *Drosophila*-Spezies. Dargestellt ist das Alignment aus dem Bereich zwischen 2,467,488 und 2,467,547 Basen. Der Score der TBE in *D. melanogaster* beträgt 10,1, innerhalb aller Spezies liegt er bei 7,46. Die TBE ist in rot hervorgehoben.

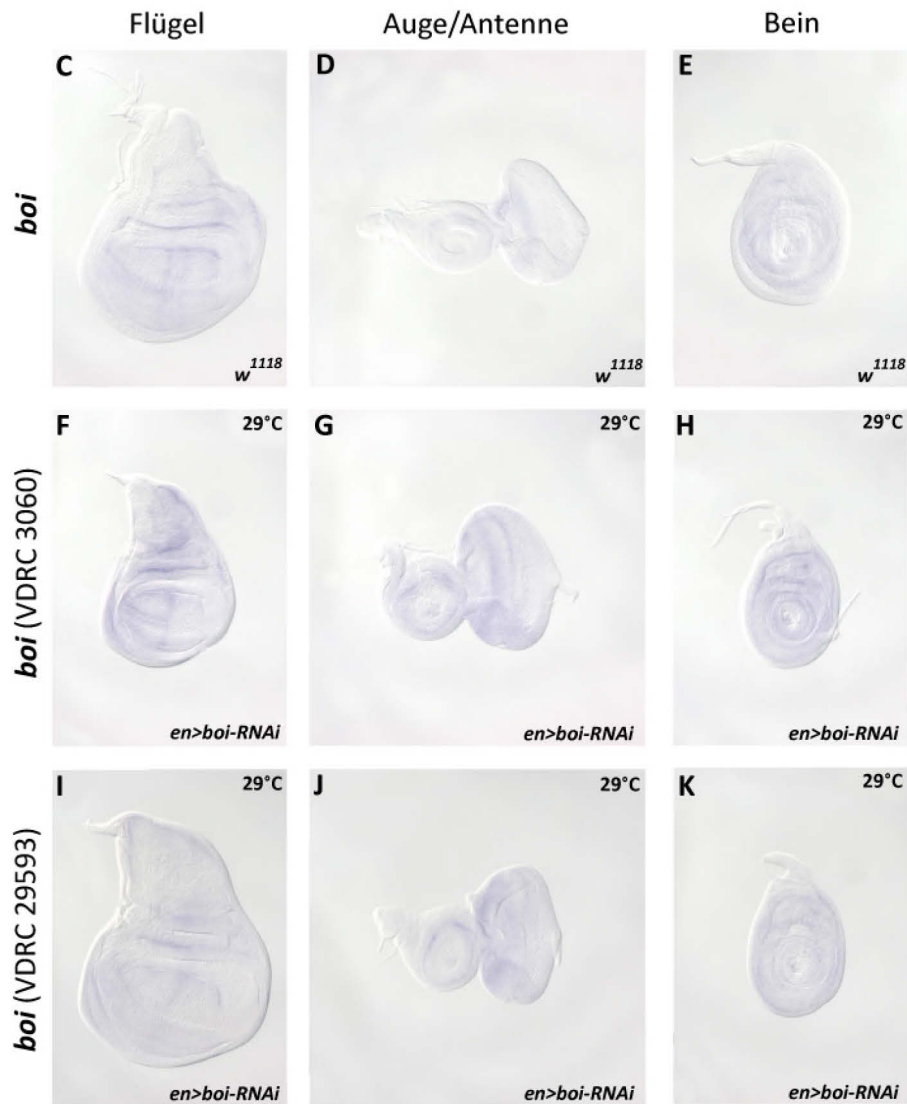
(C-E) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *boi*-Sonde (Primer: 1737/1738) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Die Scheiben zeigen in Faltenbereichen eine dunklere Färbung. **(F-K)** Sichtbare *boi*-ISH an Scheiben von Kreuzungen mit zwei verschiedenen *boi*-RNAi-Linien. **(F-H)** *en>stg-GFP* (Vef 1017)>*boi-RNAi* (VDRC 3060). **(I-K)** *en>stg-GFP* (Vef 1016)>*boi-RNAi* (VDRC 29593). Die Kreuzungen wurden bis zur Präparation bei 29°C gehalten. Die Scheiben zeigen ebenfalls das wildtypische Muster. Nur in einer der Flügelscheiben **(F)** ist eine leichte Reduktion im posterioren Kompartiment zu erkennen. **(C+F+I)** Flügelscheibe, **(D+G+J)** Augen/An-tennenscheibe, **(E+H+K)** Beinscheibe.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.



B

<i>D. melanogaster</i>	tggatcagtgctaattg gggtgt --gagaatcgatcgcgacg
<i>D. simulans</i>	tggatcagtgctaattg gggtgt --gagaatcgatcgcgacg
<i>D. sechellia</i>	tggatcagtgctaattg gggtgt --gagaatcgatcgcgacg
<i>D. yakuba</i>	tggatcagcactaatg gggtgt --gagaatcgatcgcgacg
<i>D. erecta</i>	tggatcagtactaatg gggtgt --gagaaccgatcgcgacg
<i>D. ananassae</i>	tagatcgggtttaattg gagtgc --gagaatcgatttggaacg
<i>D. pseudoobscura</i>	tggatcattattaattggt gtgcga gagaatcgat-acgattg
<i>D. persimilis</i>	tggatcattattaattggt gtgcga gagaatcgat-acgattg
<i>D. willistoni</i>	=====
<i>D. virilis</i>	=====
<i>D. mojavensis</i>	=====
<i>D. grimshawi</i>	tggattgagaatgcaaaa gtga --gagagaagaggagatg



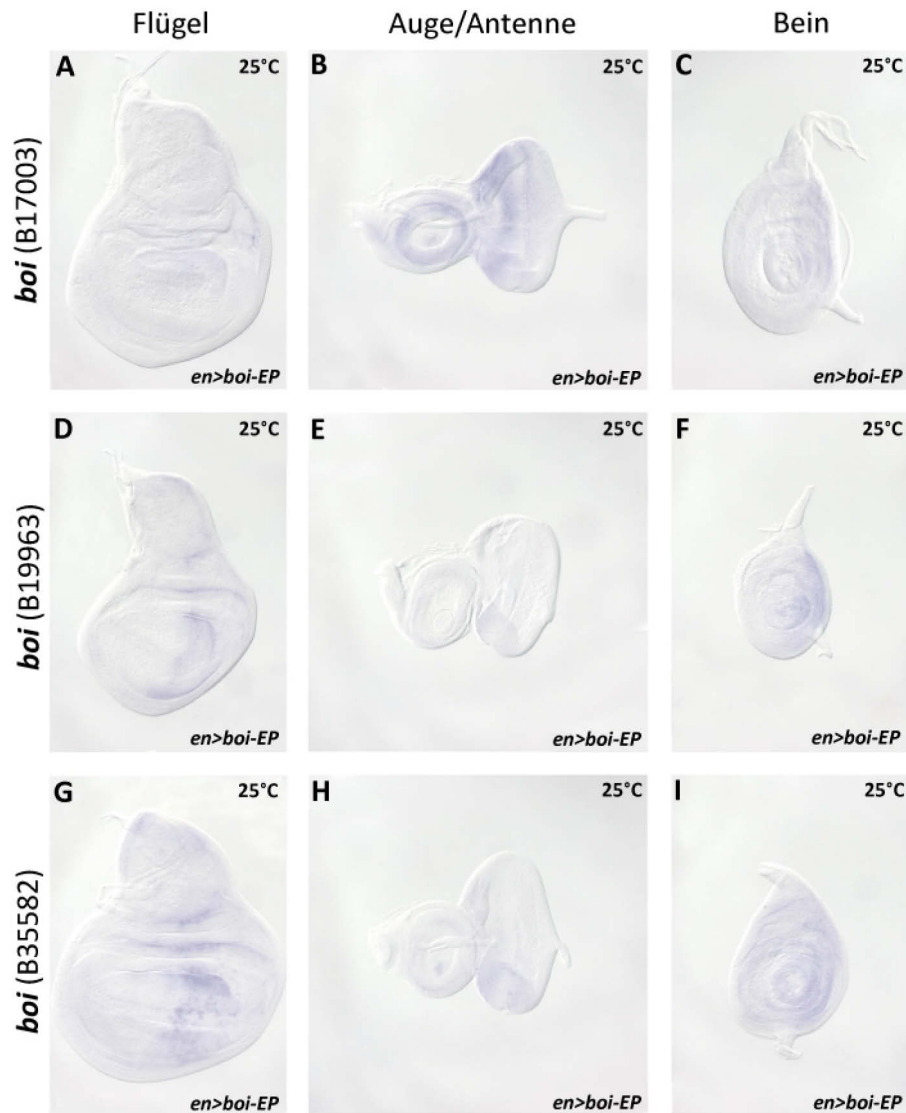


Abb. 40: brother of ihog (*boi*) (EP-Linien)

(A-I) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *boi*-Sonde (Primer: 1737/1738) an L3-Imaginalscheiben von Kreuzungen der Treiberlinie *en-Gal4* (Vef 1016) mit drei verschiedenen *boi*-EP-Linien: (A-C) *boi*-EP (BDSC 17003), (D-F) *boi*-EP (BDSC 19963), (G-I) *boi*-EP (BDSC 35582). Die Kreuzungen wurden bis zur Präparation bei 25°C gehalten. Kreuzungen, die bei 29°C gehalten wurden, überlebten nicht. Die Flügelscheiben (D+G) und auch die Beinscheiben (F+I) der beiden letzteren EP-Linien zeigen eine deutlich verstärkte Expression im posterioren Kompartiment. Dies bestätigt die Funktionstüchtigkeit der *boi*-Sonde. (A+D+G) Flügelscheibe, (B+E+H) Augen-/ Antennenscheibe, (C+F+I) Beinscheibe. Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

5.4.9.3 *tout-velu* (*ttv*) & *brother of tout-velu* (*botv*)

Ttv und *botv* kodieren für Glycosyl-Transferasen, die bei der Biosynthese der Heparansulfat-Proteoglykane Dally und Dally-like (Dlp) mitwirken. Letztere sind für die Hh-Diffusion essentiell (Izumikawa *et al.*, 2006). Dementsprechend sind auch *ttv* und *botv* potentielle Zielgene für Omb. Beiden Genen konnten im Vorhinein jedoch keine bioinformatisch ermittelten hoch konservierten TBEs zugeordnet werden. Im CHIP-chip wurden für *ttv* in beiden Datensätzen (Flügel und Auge) Bindestellen identifiziert, für *botv* nur in Flügelansatz (Abb. 41A und Abb. 42A).

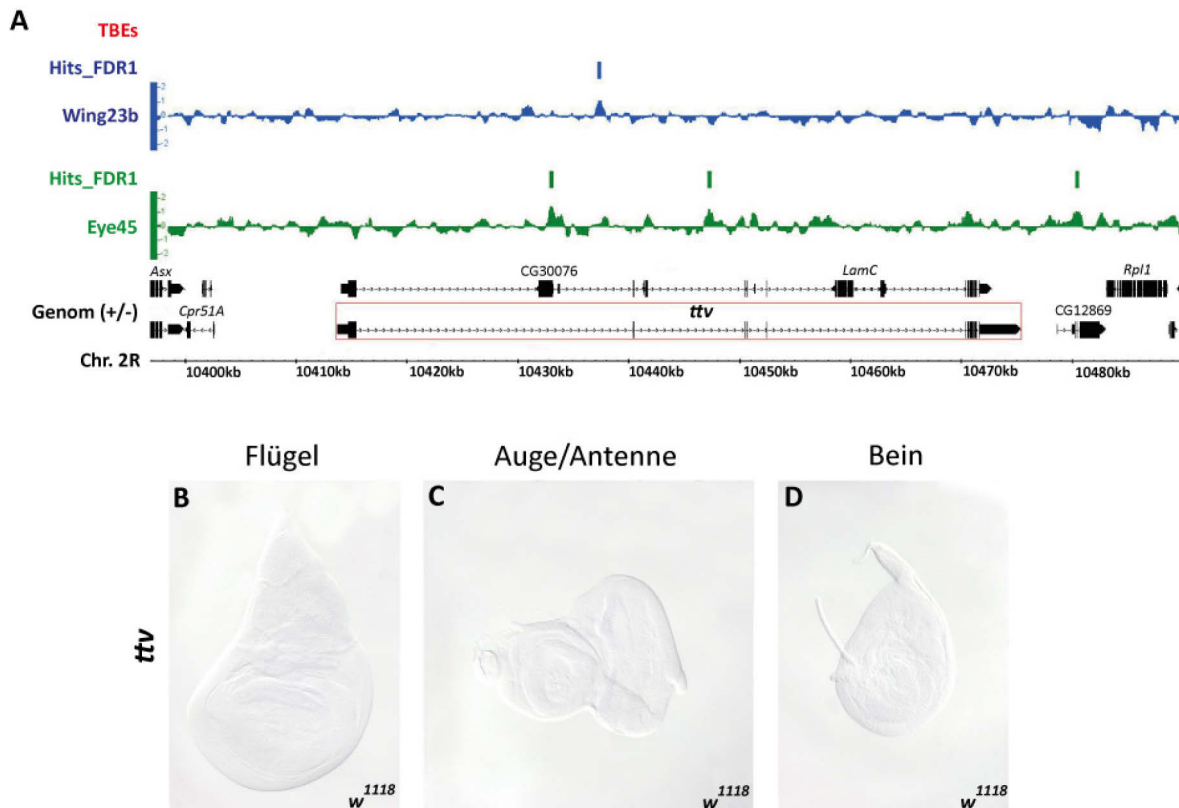


Abb. 41: *tout-velu* (*ttv*)

A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung der Gens *tout-velu* (*ttv*) (roter Kasten) befinden. Der Locus des Gens befindet sich auf dem Chr. 2R: 10,413,772-10,475,422. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Im Wing23b-Ansatz konnte *ttv* eine Bindestelle zugeordnet werden, im Eye45-Ansatz zwei.

(B-D) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *ttv*-Sonde (Primer: 1725/1726) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Die Scheiben weisen keine Färbung auf. **(B)** Flügelscheibe, **(C)** Augen-/Antennenscheibe, **(D)** Beinscheibe.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

Da auch für diese beiden Kandidaten keine Effektorlinien zur Verfügung standen, sollte jeweils nur das wildtypische Expressionsmuster per *in situ*-Hybridisierung bestimmt werden. Eine Beschreibung der Expressionsmuster ist auch aus der Literatur bislang nicht bekannt. In beiden Fällen konnte jedoch auch keine Färbung in den verschiedenen Scheibentypen detektiert werden (Abb. 41B-D und Abb. 42B-D). Ob dies an der Expression oder der Spezifität der Sonden lag ist unklar.

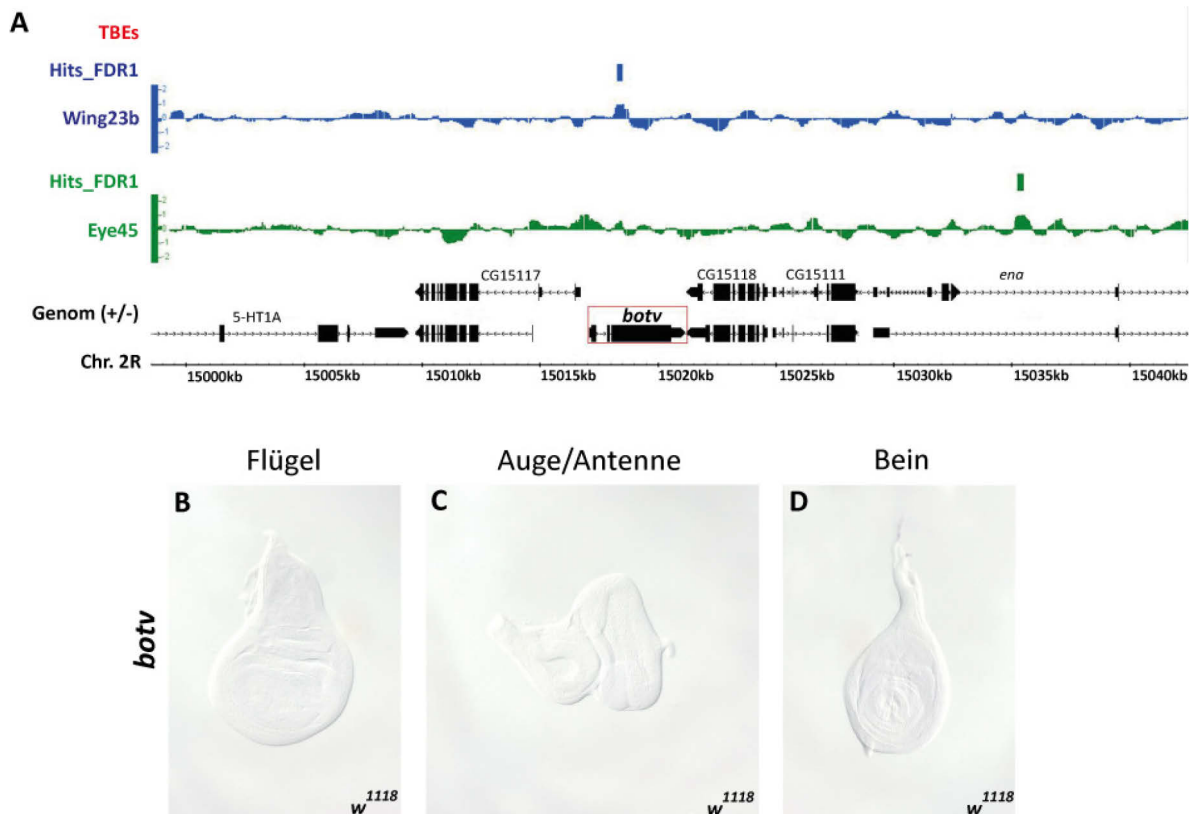


Abb. 42: brother of tout-velu (*botv*)

A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung der Gens *brother of tout-velu* (*botv*) (roter Kasten) befinden. Der Lokus des Gens befindet sich auf dem Chr. 2R: 15,017,099-15,021,223. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Im Wing23b-Ansatz konnte *botv* eine Bindestelle zugeordnet werden.

(B-D) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *botv*-Sonde (Primer: 1727/1728) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Die Scheiben weisen keine Färbung auf. **(B)** Flügelscheibe, **(C)** Augen-/Antennenscheibe, **(D)** Beinscheibe.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

5.4.9.4 *shifted* (*shf*)

Das Protein Shf stabilisiert Hh in der Extrazellulären Matrix zwischen der posterioren und der anterioren Zelle und ist somit auch ein mögliches Omb-Zielgen in der Hh-Kaskade. In *shf*-mutanten Flügelscheiben kann Hh nicht von posterior nach anterior diffundieren (Gorfinkiel *et al.*, 2005)).

Zwar konnte für *shf* eine hoch konservierte TBE bioinformatisch ermittelt werden, im ChIP-chip gab es jedoch kein Ergebnis mit der Einschränkung auf FDR1 (Abb. 43A). Erst ab einer FDR von 5 konnten in beiden Ansätzen Bindestellen identifiziert werden (Daten hier nicht dargestellt).

Die Bestimmung des wildtypischen Expressionsmusters ergab eine intensive ubiquitäre Färbung in allen Scheibentypen. Die *en*-getriebene *shf*-RNAi-Expression induzierte zwar eine insgesamt schwächere Färbung, aber nicht spezifisch in der *en*-Domäne. Die Verwendung der *shf*-EP Linie führte ebenfalls nicht zu einer spezifischen Veränderung im Expressionsmuster.

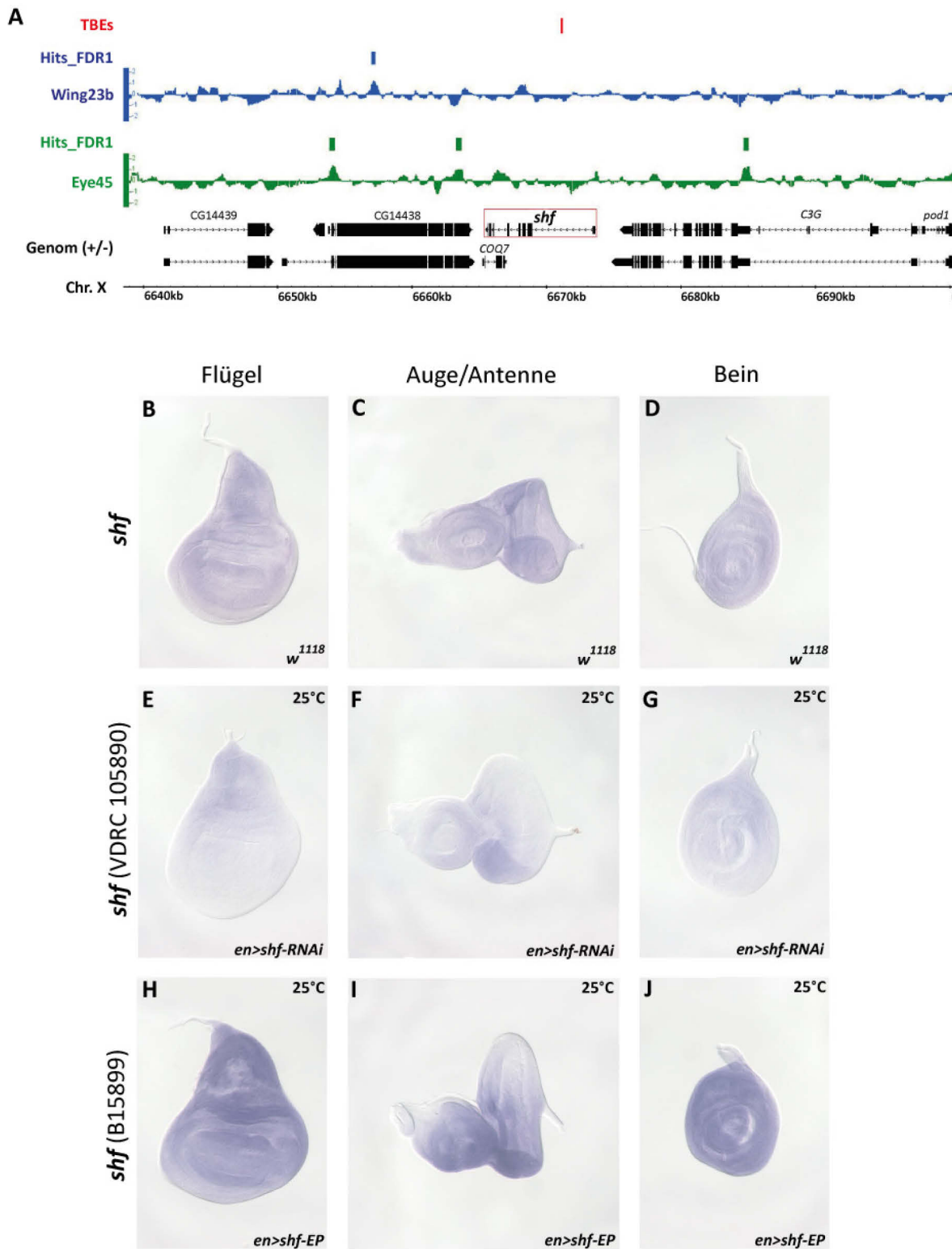


Abb. 43: shifted (*shf*)

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung der Gens *shifted* (*shf*) (roter Kasten) befinden. Der Locus des Gens befindet sich auf dem Chr. X: 6,665,477-6,673,692. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Mit dieser Einschränkung konnten *shf* keine Bindestellen zugeordnet werden. Erst ab einer FDR von 5 konnten in beiden Ansätzen Bindestellen identifiziert werden. Zusätzlich ist eine bioinformatisch ermittelte, hoch konservierte TBE bei 6,671,164 Basen (Score: Dm 10,93; all 10,51) (roter Balken) eingetragen.

(B-D) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *shf*-Sonde (Primer: 1729/1730) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Die Scheiben sind weitestgehend ubiquitär gefärbt. **(E-J)** Sichtbare *shf*-ISH an Scheiben von Kreuzungen der Treiberlinie *en-Gal4* (Vef 1017) mit einer *shf-RNAi*- und einer *shf-EP*-Linie. **(E-G)** *en>stg-GFP* (Vef 1017)>*shf-RNAi* (VDRC 105890). Die Färbungen sind insgesamt etwas heller als die des Wildtyps. **(H-J)** *en>stg-GFP* (Vef 1017)>*shf-EP* (BDSC 15899). Die Färbungen unterscheiden sich nicht zum Wildtyp. Beide Kreuzungen wurden bis zur Präparation bei 25°C gehalten. **(B+E+H)** Flügelscheibe, **(C+F+I)** Augen-/Antennenscheibe, **(D+G+J)** Beinscheibe.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

5.4.9.5 *dally* & *dally-like* (*dlp*)

Die beiden membrangebundenen Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) Dally und Dally-like (Dlp) sind für die Diffusion des Morphogens Hh notwendig (Han *et al.*, 2004) und somit auch als potentielle Omb-Zielgene interessant.

Für beiden Gene konnte im bioinformatischen Screen keine konservierte TBE ermittelt werden. In den Flügel-Daten der ChIP-chips wurden *dally* jedoch zwei Bindestellen zugeordnet und *dlp* eine (Abb. 44A, Abb. 45A).

Die Bestimmung des wildtypischen Expressionsmusters von *dally* ergab eine weitestgehend ubiquitäre Färbung in der Flügel- sowie der Beinscheibe (Abb. 44B+D). Die Augenscheibe weist hingegen vor allem Färbungen im Bereich der Antenne und des ventralen Augenrands auf (Abb. 44C).

Die Kreuzung des *en*-Treibers mit *UAS-dally* führt zu einer deutlich verstärkten Expression im posterioren Kompartiment der Flügel- und der Beinscheibe (Abb. 44E+G). Dies bestätigt nicht nur die Funktionalität der Linie sondern auch die der *dally*-Sonde. Die Expression von *dally* in der Augen-/Antennenscheibe bleibt makroskopisch betrachtet unbeeinflusst (Abb. 44F).

Einen erwarteten gegenteiligen Effekt bei Verwendung von *dally-RNAi* kann man nur begrenzt beobachten. Die Färbung der Scheiben wirkt insgesamt schwächer, eine spezifische Reduktion im posterioren Kompartiment ist jedoch nur schwer zu erkennen (Abb. 44H-J).

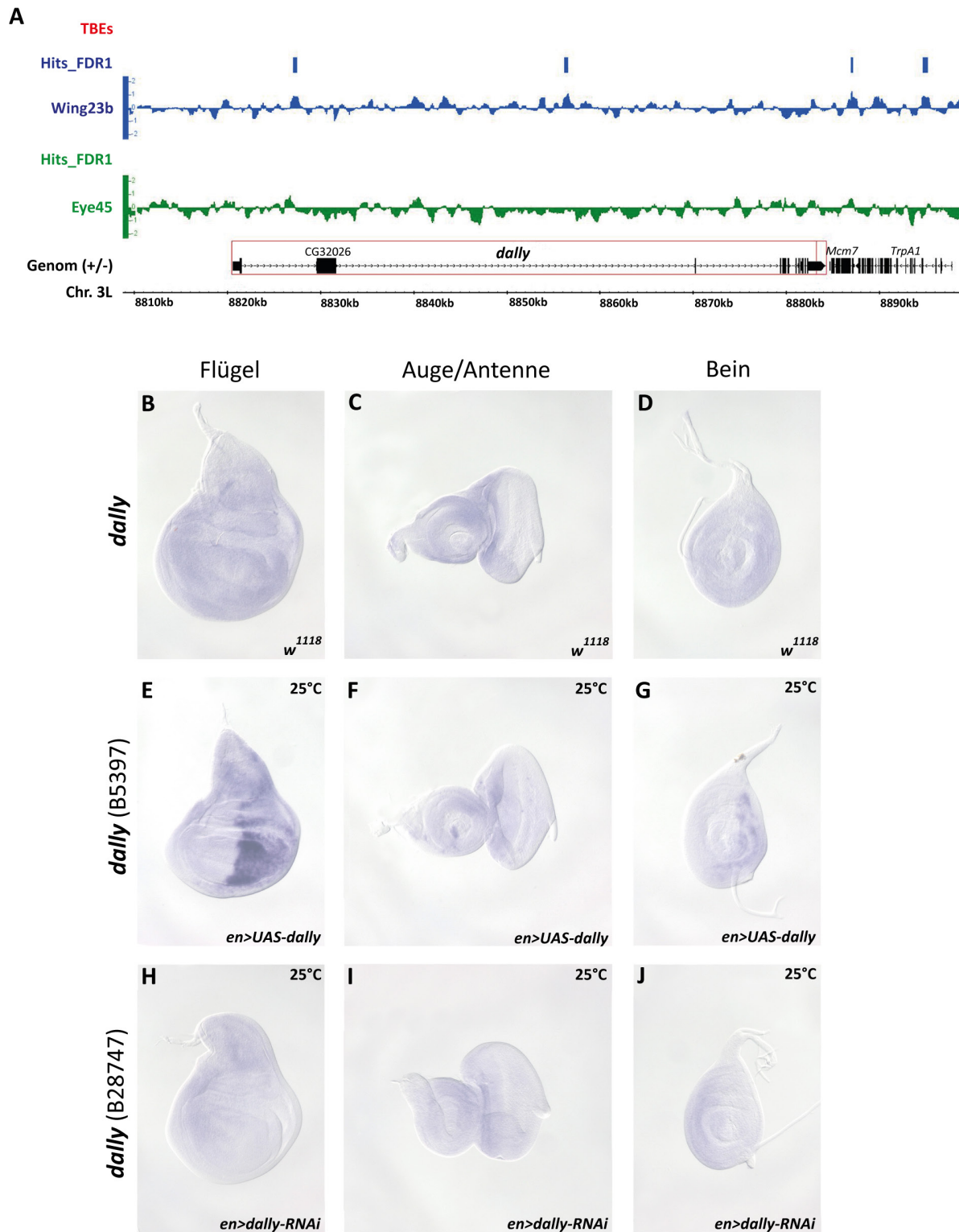


Abb. 44: division abnormally delayed (*dally*)

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung der Gens *division abnormally delayed* (*dally*) (roter Kasten) befinden. Der Locus des Gens befindet sich auf dem Chr. 3L: 8,820,605-8,884,292. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Im Wing23b-Ansatz konnten zwei Bindestellen für *dally* identifiziert werden.

(B-C) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *dally*-Sonde (Primer: 1731/1732) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Die Scheiben sind weitestgehend ubiquitär gefärbt. (F-K) Sichtbare *dally*-ISH an Scheiben von Kreuzungen der Treiberlinie *en-Gal4* (Vef 1016) mit *UAS-dally* und mit einer *dally-RNAi*-Linie. (E-G) *en>stg-GFP* (Vef 1016)> *UAS-dally* (BDSC 5397). Insbesondere die Flügel- (E) als auch die Beinscheibe

(G) zeigen eine verstärkte Färbung im posterioren Bereich. **(H-J)** *en>stg-GFP* (Vef 1016)>*dally-RNAi* (BDSC 28747). Die Färbungen sind insgesamt heller, besonders im posterioren Kompartiment der Scheiben. Beide Kreuzungen wurden bis zur Präparation bei 25°C gehalten. **(B+E+H)** Flügelscheibe, **(C+F+I)** Augen-/Antennenscheibe, **(D+G+J)** Beinscheibe.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

Dlp betreffend, konnte in der Flügelscheibe das aus der Literatur bekannte Expressionsmuster mittels *in situ*-Hybridisierung bestätigt werden. *Dlp* wird im anterioren Kompartiment vermehrt exprimiert und entlang der D-/V-Achse reprimiert (Gallet *et al.*, 2008). Zumindest letzteres ist eindeutig in den eigenen Färbungen zu erkennen (Abb. 45B). Die Scheibe ist ansonsten weitestgehend ubiquitär gefärbt. Gleiches gilt für die Beinscheibe (Abb. 45D). In der Antennen-/Augenscheibe ist die Färbung hauptsächlich im dorsalen Bereich der Antenne sowie im Übergang zum Augenbereich lokalisiert (Abb. 45C).

Zusätzlich zum Wildtyp wurden zwei *dlp-RNAi*-Linien untersucht: B34089 und B34091. Nur in der Flügelscheibe der ersten Linie ist eine leichte Reduktion der posterioren Expression zu erkennen (Abb. 45E), die anderen Scheiben zeigen keinen Effekt (Abb. 45F-J).

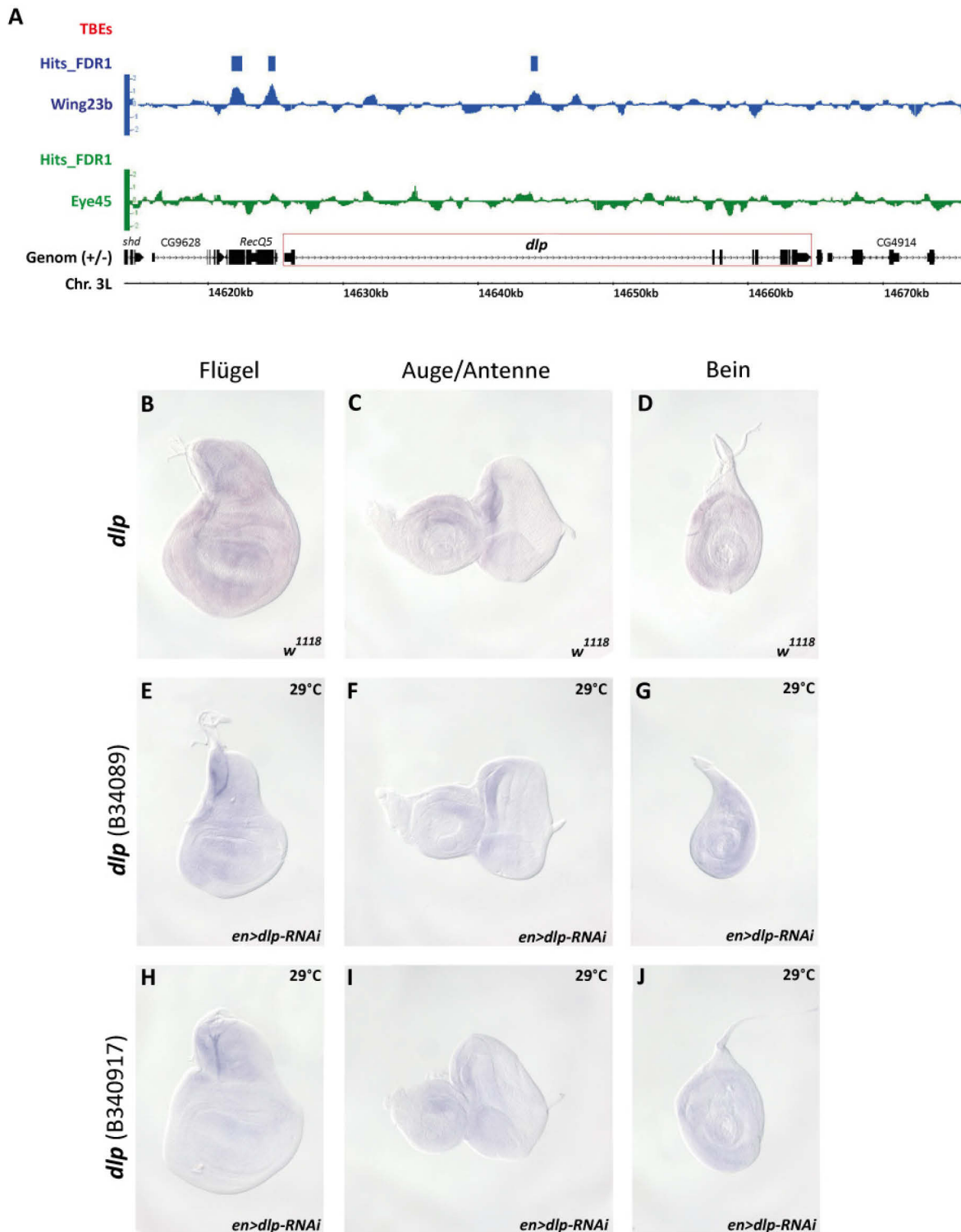


Abb. 45: dally-like (*dlp*)

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung der Gens *dally-like* (*dlp*) (roter Kasten) befinden. Der Locus des Gens befindet sich auf dem Chr. 3L: 14,625,701-14,664,709. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Im Wing23b-Ansatz konnte eine Bindestelle für *dlp* identifiziert werden.

(B-C) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *dlp*-Sonde (Primer: 1587/1588) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Die Scheiben sind weitestgehend ubiquitär gefärbt. Nur im Bereich der *pouch* (B) ist in der Region der D-/V-Grenze ein hellerer Bereich zu erkennen. Auch die Augenscheibe (C) ist posterior zur Morphogentischen Furche heller. (E-J) Sichtbare *dlp*-ISH an Scheiben von Kreuzungen der Treiberlinie *en-Gal4* (Vef 1016) mit zwei *dlp-RNAi*-Linien. (E-G) *en>stg-GFP* (Vef 1016)>*dlp-RNAi* (BDS

34089). Die Flügelscheibe (E) scheint im posterioren Bereich weniger gefärbt. **(H-J)** *en>stg-GFP* (Vef 1016)>*dlp-RNAi* (BDSC 34091). Die Färbungen sind insgesamt heller. Beide Kreuzungen wurden bis zur Präparation bei 29°C gehalten. **(B+E+H)** Flügelscheibe, **(C+F+I)** Augen-/Antennenscheibe, **(D+G+J)** Beinscheibe.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

5.4.9.6 *dispatched* (*disp*)

Das *dispatched*-Gen kodiert für ein Transmembran-Protein, welches an der Freisetzung von Hh aus den posterioren Zellen beteiligt ist (D'Angelo *et al.*, 2015). *Disp* stellt somit auch ein potentes Zielgen dar. Jedoch konnte weder die bioinformatische Recherche noch die ChIP-chips *disp* Bindestellen zuordnen (Abb. 46A).

Mittels *in situ*-Hybridisierung sollte trotzdem zunächst das Expressionsmuster im Wildtyp bestimmt werden. Dabei zeigt sich in allen Scheiben keine Färbung (Abb. 46B-D). Dies kann allerdings nicht an der Sonde liegen, wie sich bei der Färbung der *en>disp-EP*-Kreuzung zeigt. In diesem Fall weisen die Flügel- und die Beinscheibe eine spezifische, punktförmige Färbung im posterioren Kompartiment auf (Abb. 46E+G). In der Augen-/Antennenscheibe ist nur eine einzelne Färbung am ventralen Rand des Arista-Vorläufers zu erkennen (Abb. 46F).

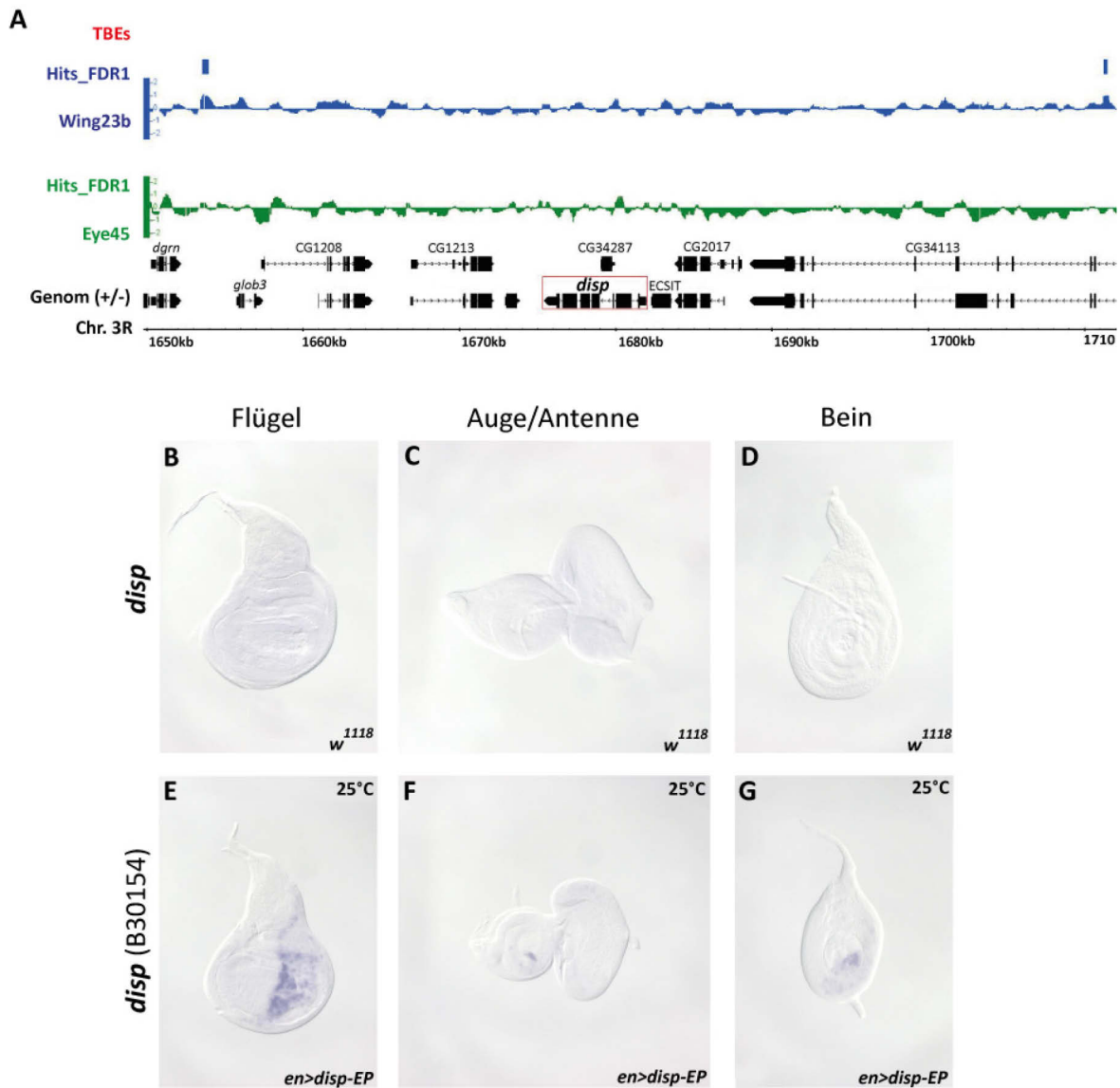


Abb. 46: *dispatched* (*disp*)

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung der Gens *dispatched* (*disp*) (roter Kasten) befinden. Der Locus des Gens befindet sich auf dem Chr. 3R: 1,675,416-1,682,033. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Mit dieser Einschränkung konnte für *disp* keine Bindestelle in den beiden Ansätzen identifiziert werden.

(B-C) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *disp*-Sonde (Primer: 1723/1724) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben. Die Flügelscheibe (B) scheint ganz leicht gefärbt, die anderen Scheiben zeigen keine Färbung. (E-G) Sichtbare *disp*-ISH an Scheiben der Kreuzung *en>stg-GFP* (Vef 1016)>*disp-EP* (BDSC 30154). Deutlich ist in der Flügelscheibe (E) sowie in der Beinscheibe (G) eine verstärkte Färbung im posterioren Kompartiment zu erkennen. In der Antennen (F) tritt eine konzentrische Färbung auf. Die Kreuzung wurde bis zur Präparation bei 25°C gehalten. Die Kreuzungen, die bei 29°C gehalten wurden, zeigten leider keine Färbung. (B+E) Flügelscheibe, (C+F) Augen-/Antennenscheibe, (D+G) Beinscheibe.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

5.4.9.7 *Flotillin-2 (Flo-2)*

Das lipid-modifizierte, sezernierte Protein Hh kann im extrazellulären Raum nicht frei diffundieren. Flotillin-2 (Flo-2), ein Bestandteil der Membran-Microdomänen, ist an der Sezernierung sowie der Verteilung von Hh über lange Distanzen beteiligt (Katanaev *et al.*, 2008). *Loss-of-function* von *Flo-2* führen zu einer Reduktion des Morphogen-Gradienten, wohingegen eine *Flo-2* Überexpression das Gegenteil bewirkt (Katanaev *et al.*, 2008).

Durch die rein bioinformatische Suche konnten keine TBEs identifiziert werden, die Flo-2 zugeordnet werden konnten. Allerdings fanden sich in den Daten der Flügel-ChIP-chips zwei potentielle Omb-Bindestellen, in den Augen-Daten sogar sechs (Abb. 47A).

Die Analyse des wildtypischen Expressionsmusters von *Flo-2* per *in situ*-Hybridisierung identifizierte keine spezifische Färbung. Die Scheiben blieben allesamt ungefärbt (Abb. 47B-D). Auch die posteriore Expression der *Flo-2-EP*-Linie ergab keine Färbung in den drei gezeigten Scheibentypen (Abb. 47E-G).

Dies kann natürlich zum einen bedeuten, dass die Sonde und/oder die EP-Linie funktionslos sind, zum anderen aber auch, dass *Flo-2* in den Scheiben in keinem detektierbaren Maß exprimiert wird. Obwohl wir wissen, dass *Flo-2* zumindest in der Flügelscheibe eine Rolle in Hh-Signalweg spielt, gibt es bislang keine Expressionsdaten für dieses Gewebe in der Literatur.

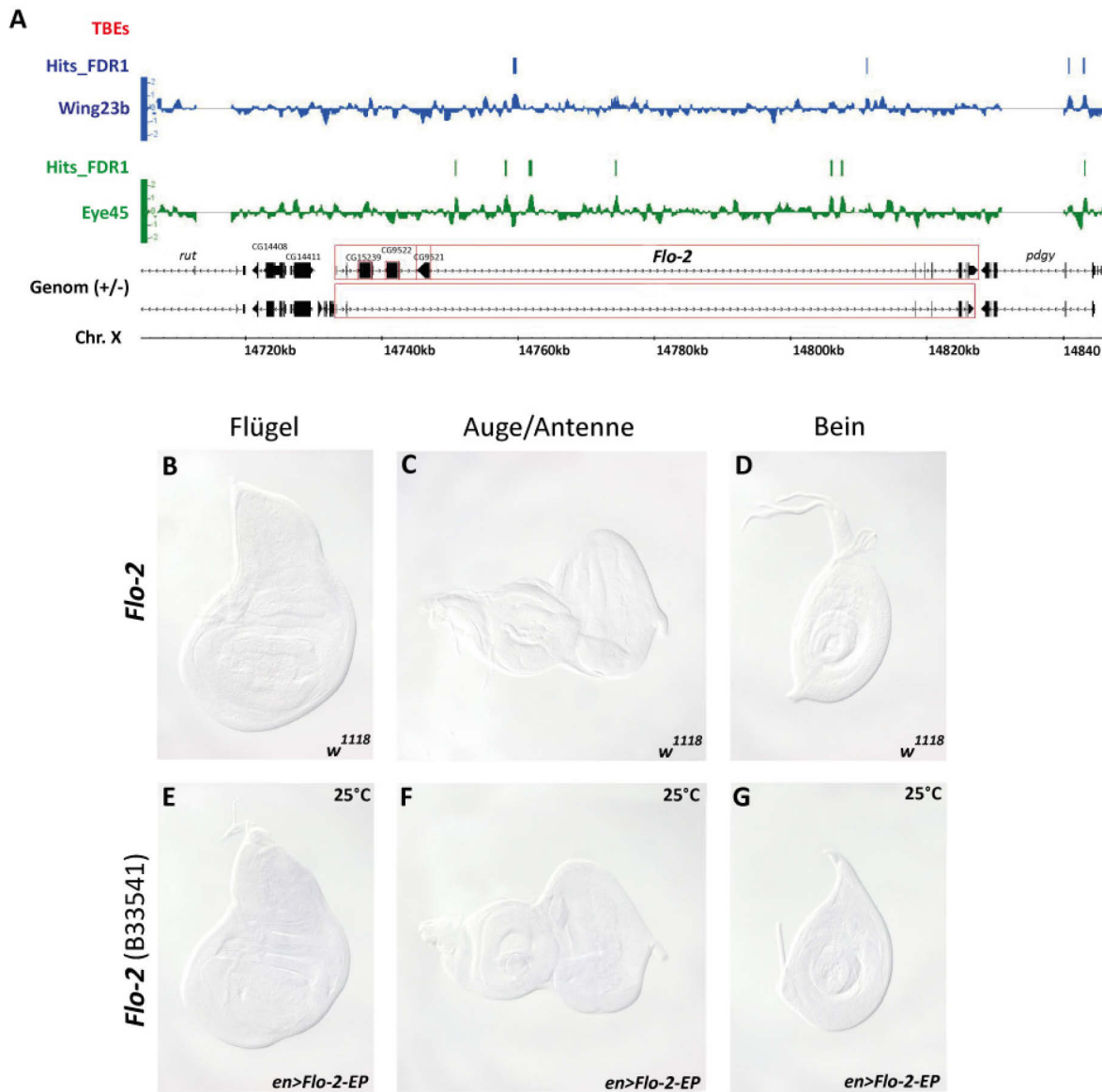


Abb. 47: Flotillin-2 (*Flo-2*)

(A) ChIP-chip definierte Bindestellen von Omb im Chromatin von Flügel- (blau) bzw. Augenimaginalscheiben (grün), welche sich in der Umgebung der Gens *Flotillin-2* (*Flo-2*) (roter Kasten) befinden. Der Locus des Gens befindet sich auf dem Chr. X: 14,733,407-14,827,616. Die Bindestellen werden jeweils durch blaue oder grüne Balken angezeigt. Dargestellt sind nur die Ergebnisse mit einer FDR von 1. Im Wing23b-Ansatz konnten zwei Bindestellen identifiziert werden, im Eye45-Ansatz sechs.

(B-C) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit einer *Flo-2*-Sonde (Primer: 1739/1740) an wildtypischen (*w*¹¹¹⁸) L3-Imaginalscheiben. Die Scheiben weisen keine Färbung auf. (E-G) Sichtbare *Flo-2*-ISH an Scheiben der Kreuzung *en>stg-GFP* (Vef 1016)>*Flo-2-EP* (BDSC 33541). Diese Scheiben weisen ebenfalls keine Färbung auf. Die Kreuzung wurde bis zur Präparation bei 25°C gehalten. Kreuzungen, die bei 29°C gehalten wurden, sind nicht angegangen. (B+E) Flügelscheibe, (C+F) Augen-/Antennenscheibe, (D+G) Beinscheibe.

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

5.4.9.8 Effekte von *omb*-GOF oder -LOF auf die Expression von Komponenten des Hh-Signalwegs in der Flügelscheibe

Nachdem einzelne Sonden im Wildtyp und in Effektorlinien getestet wurden, sollte mit ihnen auch der Effekt von *omb*-LOF oder *omb*-GOF auf die Expression von Komponenten des Hh-Signalwegs untersucht werden. Dafür wurde entweder *dpp*- oder *en-Gal4* mit *UAS-omb* oder *UAS-ombRNAi* gekreuzt (Tab. 29). Die Kreuzungen wurden bis zur Präparation der Larven bei 25°C gehalten.

Dpp-Gal4 bzw. *en-Gal* wurden in allen Fällen als Kontrolle gefärbt (Abb. 48). Da die Beschreibung der wildtypischen Expressionsmuster schon in den Abschnitten zuvor erfolgte, wird hier darauf verzichtet. Die Muster entsprachen den zuvor beobachteten.

Als potentiell Omb-Zielgen in der Hh-Kaskade kommt insbesondere der mutmaßliche Co-Rezeptor *Boi* in Frage. Daher wurde die *boi*-Expression sowohl in Abhängigkeit von *omb*-Überexpression als auch von *omb*-Verlust in der Flügelscheibe analysiert (Abb. 48A-D). Bei den verwendeten Kreuzungen *dpp-Gal4xUAS-omb* sowie *en-Gal4xUAS-ombRNAi* (Tab. 29) konnten deutlich die morphologischen Effekte der *omb*-Überexpression bzw. des *omb*-Verlusts beobachtet werden. Die *dpp*-getriebene ektopische Expression von *omb* induziert die Bildung eines zweiten Flügels im notalen Bereich der Scheibe (Abb. 48B), wie schon 1996 von Grimm und Pflugfelder (Grimm und Pflugfelder, 1996) gezeigt wurde. Der posteriore *omb*-Verlust durch *en>ombRNAi* führt zur Faltenbildung in der *pouch* (Abb. 48D). In Bezug auf das Expressionsmuster von *boi* im Vergleich zum Wildtyp konnte jedoch keine Veränderung beobachtet werden.

Gleiches gilt für die Kandidaten *dally*, *dlp*, *disp*, *shf* und *hh* (Abb. 48E-N), für die alle nur der Effekt bei posteriorem *omb*-Verlust untersucht wurde. Die Scheiben wiesen keine veränderte Expression verglichen mit dem Wildtyp auf.

Nachdem die histologischen Untersuchungen mittels *in situ*-Hybridisierung keinen genaueren Aufschluss über eine potentielle Regulation durch Omb geben konnten, wurden qPCR-Analysen mit den entsprechenden Kandidaten-Genen durchgeführt. Dabei wurde die Expression der Gene in Flügelimaginalscheiben von *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Larven im Vergleich zu *FM-GFP*-Kontrolltieren ermittelt (Abb. 48, O). Durchgeführt wurden $\Delta\Delta C_T$ -Experimente, wobei die Normalisierung mit dem Haushaltsgen *rp49* erfolgte. In der Abbildung sind die Mittelwerte aus drei (*dlp*), zwei (*hh*, *ihog*, *boi*, *botv*, *shf*, *dally*, *Flo-2*) oder einem (*ttv*, *disp*) Experiment(en) mit je drei technischen Replikaten sowie die Standardabweichung dargestellt. Die beiden unabhängigen Stichproben wurden mittels des zweiseitigen, studentischen t-Tests auf signifikante Unterschiede verglichen. Die Rohdaten dieser Auswertung sind Tab. 26 zu entnehmen.

Insgesamt fallen nur die Ergebnisse der Gene *shf*, *dally* und *dlp* höchst-signifikant aus. Hier ist jeweils eine leichte Erhöhung der Expression im *omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund zu registrieren. Die *dlp*-Expression steigt um das 1,5-fache.

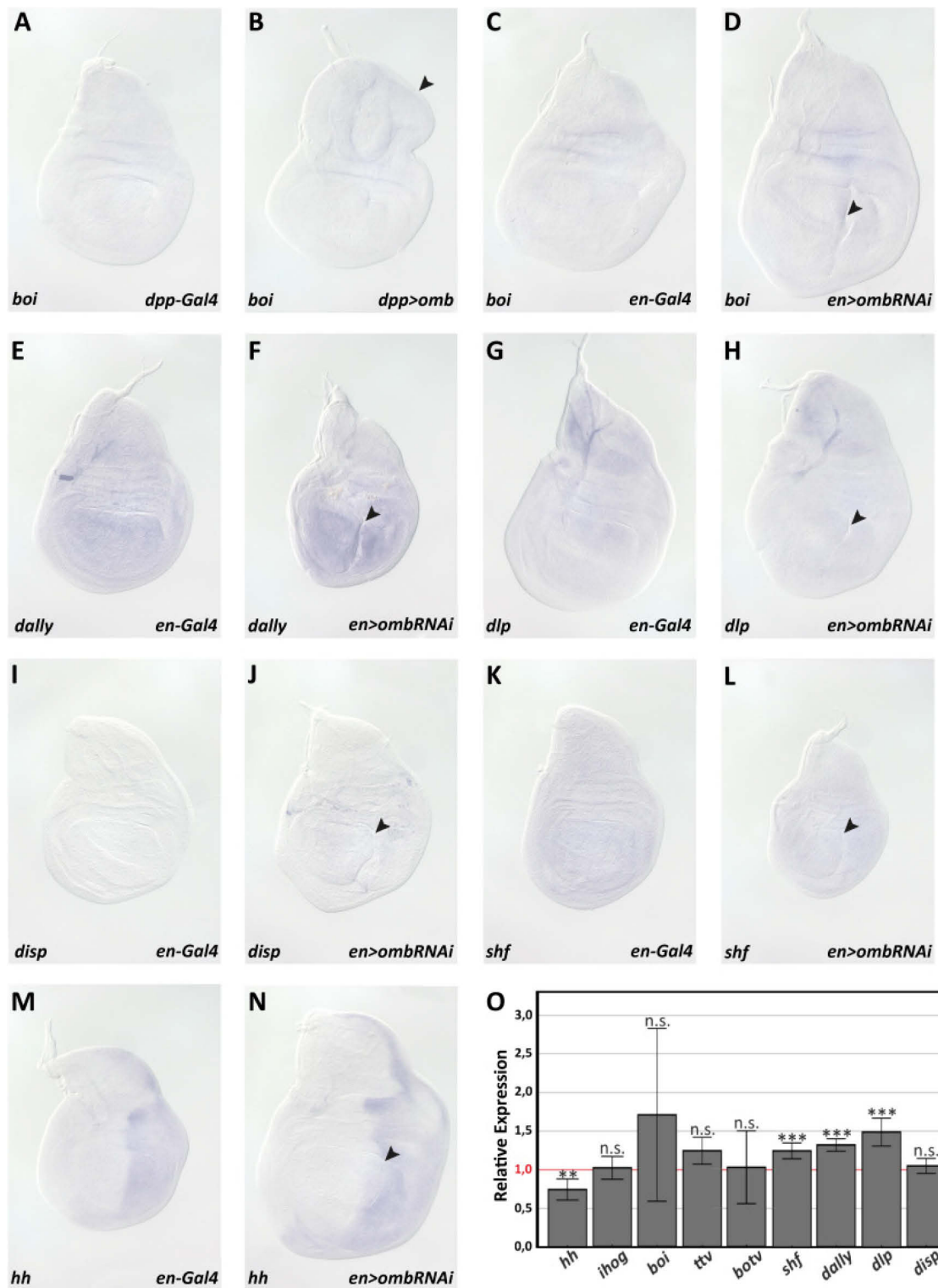
Hh selbst ist das einzige Gen, welches im Rahmen dieser Untersuchung in der *omb*-Mutante mit einem RQ von ca. 0,75 geringer exprimiert wird als in der Kontrolle (Abb. 48O). Dieser Ergebnis ist ebenso wie der *Flo-2* Wert (RQ= 1,6) noch hoch-signifikant. Alle anderen Werte werden als nicht signifikant eingestuft. Dies liegt entweder an der Nähe zum Wert 1 bzw. im Falle von *boi* oder *botv* an der zu starken Streuung der einzelnen Messwerte. So lies sich in zwei biologischen Replikaten von *boi* einmal ein RQ-Wert von 2,7 ermitteln und einmal ein Wert von 0,7. Wodurch diese Schwankungen begründet sind ist uns nicht bekannt. Im Vergleich dazu lieferten z.B. die Experimente mit *dally* zweimal nahezu das gleiche Ergebnis (RQ=1,309 und RQ=1,326). Sowohl für *boi* als auch für *dally* wurde für die biologischen Replikate jeweils die gleiche cDNA auf den gleichen Arrays verwendet. Natürlich wären weitere Experimente für eine genauere Eingrenzung der RQ-Werte sinnvoll. Das Ergebnis von *boi* kann hier leider nicht abschließend bewertet werden.

Um die Ergebnisse der histologischen und molekulargenetischen Untersuchungen miteinander vergleichen zu können müsste die Expression der einzelnen Kandidatengene mindestens noch im *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund untersucht werden.

Abb. 48 (auf der nachfolgenden Seite): Effekte von *omb*-GOF oder *omb*-LOF auf die Expression von Komponenten des Hh-Signalwegs.

(A-N) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) an *omb*-GOF oder *omb*-LOF (**Tab. 29**) L3-Flügelimaginalsscheiben. **(A-D)** ISH mit *boi*-Sonde (Primer: 1737/1738), (A) Kontrolle mit *dpp-Gal4*, (B) *dpp>omb*, (C) Kontrolle mit *en-Gal4*, (D) *en>ombRNAi*. **(E+F)** ISH mit *dally*-Sonde (Primer: 1731/1732). **(G+H)** ISH mit *dlp*-Sonde (Primer: 1587/1588). **(I+J)** ISH mit *disp*-Sonde (Primer: 1723/1724). **(K+L)** ISH mit *shf*-Sonde (Primer: 1729/1730). **(M+N)** ISH mit *hh*-Sonde (Primer: 1733/1734). **(E+G+I+K+M)** Kontrolle mit *en-Gal4*, **(F+H+J+L+N)** *en>ombRNAi*. In allen Fällen ist kein Unterscheid im Expressionsmuster der Kandidatengene bei *omb*-GOF oder *omb*-LOF im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. In (B) verweist der Pfeilkopf auf die notale Deformation der Flügelscheibe, in (D, F, H, J, L und N) markiert der Pfeilkopf jeweils die ektopische Falte in der *pouch*. Die Kreuzungen wurden bis zur Präparation bei 25°C gehalten. Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben.

(O) Mittels qPCR wurde das relative Expressionslevel einzelner Komponenten des *hh*-Signalwegs in *l(1)omb³¹⁹⁸*-Flügelimaginalsscheibe im Vergleich zum Wildtyp (*FM-GFP*) untersucht. Folgende Gene wurden untersucht: *hh* (Primer: 1445/1446), *ihog* (Primer: 1663/1664), *boi* (Primer: 1607/1608), *ttv* (Primer: 1717/1718), *botv* (Primer: 1609/1610), *shf* (Primer: 1653/1654), *dally* (Primer: 1621/1622), *dlp* (Primer: 1625/1626), *disp* (Primer: 1623/1624) und *Flo-2* (Primer: 1629/1630). Die grauen Balken stellen die relative Expression der einzelnen Gene dar. Die relative Expression in den *FM-GFP*-Scheiben entspricht 1 und ist hier durch die rote Linie markiert. Bei Verlust von *omb* ist besonders die Expression von *boi* (2,7-fach) erhöht. Durchgeführt wurden $\Delta\Delta C_T$ -Experimente, wobei die Normalisierung mit dem Haushaltsgen *rp49* (Primer: 1449/1450) erfolgte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei (*dlp*), zwei (*hh*, *ihog*, *boi*, *botv*, *shf*, *dally*, *Flo-2*) oder einem (*ttv*, *disp*) Experiment(en) mit je drei technischen Replikaten sowie die Standardabweichung. Die beiden unabhängigen Stichproben wurden mittels des zweiseitigen, studentischen t-Tests auf signifikante Unterschiede verglichen. *** höchst-signifikant: $p < 0,001$, **hoch-signifikant: $p < 0,01$, n.s.: nicht signifikant



5.4.9.9 Überprüfung der Auswirkungen posteriorer *omb*-Reduktion in der Flügelscheibe

Laut unveröffentlichten Ergebnissen soll der posteriore *omb*-Verlust in der Flügelscheibe nicht nur eine ektopische Faltenbildung entlang der A-/P-Grenze induzieren, sondern auch eine Reduktion der Hh-Signalgebung verursachen. Dies wurde durch eine deutliche Reduktion des Hh-Rezeptors Ptc sowie des Effektors Ci entlang der Falte gezeigt (Lui *et al.*, unveröffentlicht).

Diese Ergebnisse sollten, zumindest in Bezug auf Ptc, mittels Antikörperfärbungen überprüft werden. Für das Experiment wurden Kreuzungen mit *en>stinger-GFP* und *UAS-ombRNAi* (Tab. 29) angesetzt und die daraus resultierenden L3-Larven wurden entsprechend ihrer Fluoreszenz aufgeteilt. Die fluoreszenten Tiere wurden als Kontrolle verwendet, da die *Gal4*-Treiberlinie *stinger-GFP* enthält. Gemäß Protokoll wurde zunächst die Antikörperfärbung gegen Omb sowie Ptc durchgeführt und im Anschluss die Phalloidininfärbung, welche die Faltenbildung visualisiert (4.3.4 und 4.3.5).

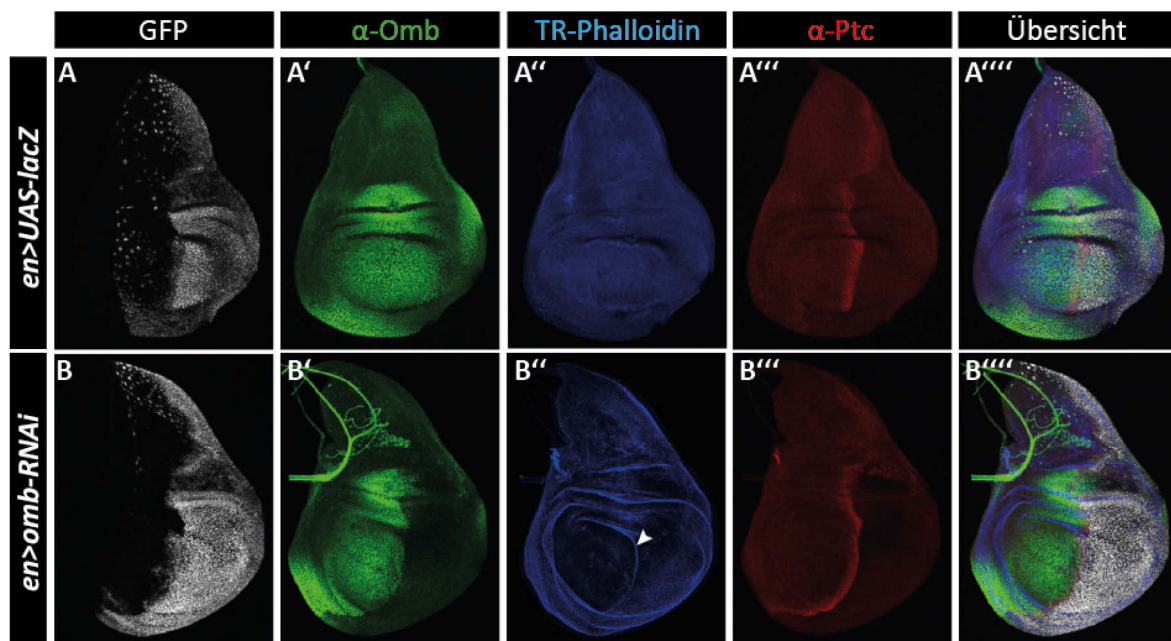


Abb. 49: Analyse der Effekte von posteriorem *omb*-Verlust auf die Morphologie und die Hh-Signalgebung in der Flügelscheibe.

(A-C) Konfokale Aufnahme (Maximumprojektion) der Antikörperfärbungen mit α -Omb (grün) und α -Ptc (rot) sowie der Phalloidininfärbung (blau) an L3-Flügelimaginalscheiben. Dargestellt sind Färbungen der Kreuzung *en>stinger-GFPxUAS-ombRNAi* sowie als Kontrolle der Kreuzung *en>stinger-GFPxUAS-lacZ* (Tab. 29). Die Färbungen sind jeweils einzeln und in einer Übersicht aller Antikörper dargestellt. *Stinger-GFP* (weiß) wird in der *en*-Domäne exprimiert und markiert somit das posteriore Kompartiment (A+B). α -Omb zeigt deutlich den Verlust der *omb*-Expression im posterioren Kompartiment durch *omb-RNAi* (B'). Die Phalloidininfärbung visualisiert die Falten in der Flügelscheibe und somit auch die ektopische Falte in der *pouch* (Pfeilkopf) bei posteriorem *omb*-Verlust (A''+B''). *Ptc* wird entlang der A-/P-Grenze exprimiert (A''' + B''').

Die Scheiben sind alle in folgender Orientierung abgebildet: anterior ist links, dorsal ist oben. Die Scheiben wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung am LaserScanning Mikroskop (LSM) dokumentiert.

In den Scheiben wird das posteriore Kompartiment durch die GFP-Visualisierung markiert (Abb. 49 A+B). Die Kontrollscheiben zeigen die wildtypische *omb*-Expression in grün sowie das *ptc*-Expressionsmuster in einem dünnen Streifen entlang der A-/P-Grenze in rot (Abb. 49 A'+A'''). Im blauen Kanal ist die Faltenbildung durch die TR-Phalloidininfärbung dargestellt (Abb. 49 A''+B''). In der letzten Reihe sind alle Färbungen zusammen abgebildet (Abb. 49A''''+B'''). Der posteriore *omb*-Verlust ist in den *en>omb-RNAi* Scheiben sehr gut zu erkennen, ebenso die ektopische Faltenbildung in der *pouch* entlang der A-/P-Grenze (Abb. 49B'+B''). Allerdings kann das Ergebnis von Lui et al. in Bezug auf die *ptc*-Expression hier nicht reproduziert werden. Die Expression entlang der *pouch*-Falte erscheint hier im Vergleich zur Kontrolle allenfalls schwach reduziert (Abb. 49B''').

5.4.9.10 Diskussion

Der Einfluss von Omb auf die A-/P-Grenze wird deutlich durch die ektopische Faltenbildung in der *pouch* bei posteriorem Verlust von Omb. Die Entstehung der Falte wird durch eine Aktivierung des Jun N-terminal Kinase (JNK)-Signalwegs und gleichzeitiger Yorkie (Yki) Aktivität induziert. Yki schwächt die pro-apoptotische Aktivität von JNK (Liu et al., 2016).

Ein Einfluss auf die Hh-Signalkaskade, wie er von Liu et al. (in Vorbereitung) in Bezug auf Ptc beschrieben wird, kann hier aber nicht abschließend bewertet werden. Die Reduktion von Ptc entlang der A-/P-Grenze als Resultat von posteriorer Omb-Reduktion wird hier nicht deutlich gesehen. Mit Epistase-Experimenten hätte der Einfluss des posterioren Omb-Verlusts auf Komponenten des Hh-Signalwegs überprüft werden können. Dabei wäre deutlich geworden, ob die *en*-getriebene posteriore Expression von z. B. *boi-EP* die durch *en>ombRNAi* initiierte Faltenbildung in der *pouch* verhindert.

Laut qPCR beeinflusst der Verlust von Omb durchaus die Expression einzelner Komponenten der Hh-Signalkaskade. Wo oder wie Omb in den Signalweg eingreift ist aber weiterhin völlig unklar und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

5.5 Ansätze zu einer *in vivo* Analyse von TBEs

5.5.1 Das Tbx-Protein Org-1 reguliert *ladybird-late* und *slouch*

Das Tbox-Transkriptionsfaktor Org-1 wirkt in der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* als transkriptionaler Aktivator (Lee *et al.*, 2003). Während der somatischen Myogenese aktiviert Org-1 die Muskelidentitätsgene *ladybird* (*lbl*) und *slouch* (*slou*). Die Arbeitsgruppe von C. Schaub und M. Frasch konnte 2012 für *lbl* und *slou* Enhancerelemente (CRMs) identifizieren, in denen TBEs *in vivo* durch Org-1 gebunden werden (Schaub *et al.*, 2012). Die entsprechenden Reporterkonstrukte verloren in *org-1*-mutanten Embryonen ihre Aktivität. Gleiches geschah in Folge der Mutation sämtlicher TBEs (Abb. 7).

Christoph Schaub konnte somit demonstrieren, dass die normale Aktivierung von *slou* und *lbl* durch Org-1 die Bindung an spezifische Bindestellen (TBEs) innerhalb des Enhancerelements voraussetzt. Da in diesem Versuch allerdings alle TBEs mutiert wurden, stellt sich weiterhin die Frage, ob auch die Mutation einer einzelnen, hoch-konservierten TBE ausreichend ist, um diesen Effekt zu reproduzieren. Dafür wurden auf der Grundlage von Schaub *et al.* ebenfalls Enhancer-Reporter-Konstrukte hergestellt und einzelne TBEs mutiert. Der Effekt sollte im Embryo analysiert werden. Leider war diese Analyse der neuen Konstrukte aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

5.5.2 Mutagenese von *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukten der Org-1 Zielgene *lbl* und *slou*

Für unsere Mutationsversuche stellten uns die Kollegen um Manfred Frasch aus Erlangen freundlicherweise die Konstrukte *lbl*-SBMs und *slou*SK16 zur Verfügung. Da sie die Fragmente synthetisieren ließen, existierten keine Vorstufen mit nur einzeln mutierten TBEs.

In den jeweiligen Enhancerfragmenten sollten die besonders hoch konservierten TBEs mutiert werden und die neuen Fragmente in den Expressionsvektor pGW-attB-lacZ überführt werden.

Das 923bp-große *lbl*-SBMs Fragment (7.8.1) verfügt über sechs TBEs (Tab. 18). Davon wurden bis auf TBE3 alle in dem bioinformatischen Screen von H. Binbas identifiziert. TBE5 wurde hingegen nicht von Schaub *et al.* identifiziert und mutiert. Da aber auch nur die TBE1 und TBE2 eine fast vollständige Konservierung durch alle Spezies aufweisen, sollten drei Plasmide mit jeweils zwei Einzelmutationen sowie eine Doppelmutante hergestellt werden. Das *slou*SK16-Fragment (7.8.2) enthält laut Schaub sieben TBEs, wovon nur eine, TBE6 in unserem bioinformatischen Ansatz identifiziert wurde (Tab. 19).

Tab. 18: TBEs im Fragment *lbi-SBMs* (basierend auf Schaub *et al.*, 2012 sowie dem TBE-Screen)

TBE	Orientierung	Sequenz [5'-3']	Mutation	Lokalisation	Dm Score
1	rev	CTTCACACTT	CTTCA AG CTT	3R: 17,252,389	8.78
2	for	AGGTGTTAAA	AG AT CTTAAA	3R: 17,252,455	7.68
3	/	TAACACCA	/	3R: 17,252,686	/
4	for	AGGCGTGAAA	/	3R: 17,252,839	5.47
5	for	TAGTGGGAGG	/	3R: 17,252,915	5.55
6	rev	TGTGACACTT	/	3R: 17,253,028	7.16

Anm. 1: Die eingefügten Mutationen in den TBEs sind rot hervorgehoben.

Anm. 2: Der Dm (*Drosophila melanogaster*) Score entstammt dem TBE-Screen (siehe 2.4.1) und stellt die Konservierung der TBE in Bezug auf alle anderen bekannten TBEs innerhalb von *Drosophila melanogaster* dar.

Tab. 19: TBEs in Fragment *slouSK16* (basierend auf Schaub *et al.*, 2012 sowie dem TBE-Screen)

TBE	Orientierung	Sequenz [5'-3']	Mutation	Lokalisation	Dm Score
1	/	TGACACAAA	/	3R: 17,392,569	/
2	/	TTACACAT	/	3R: 17,392,509	/
3	/	ATGCGTTA	/	3R: 17,392,345	/
4	/	ATGTGCCA	/	3R: 17,392,166	/
5	/	TCCCACTA	/	3R: 17,392,118	/
6	for	AAGTGTTAAA	AG AT CTTAAA	3R: 17,392,086	6.40
7	/	ATGTGGCA	/	3R: 17,391,843	/

Anm. 1: Die eingefügten Mutationen in den TBEs sind rot hervorgehoben.

Anm. 2: Der Dm (*Drosophila melanogaster*) Score entstammt dem TBE-Screen (siehe 2.4.1) und stellt die Konservierung der TBE in Bezug auf alle anderen bekannten TBEs innerhalb von *Drosophila melanogaster* dar.

Mit den Fragmenten *lbi-SBMs* und *slouSK16* wurden ähnlich vorgegangen. Die jeweilige genomische Region von Interesse wurde zunächst mit der KAPAHifi™ Polymerase (4.4.10) aus den Originalplasmiden pH-Stinger-*lbi-SBMs*-AttB bzw. pGreen H-Pelican-*slou-SK16* amplifiziert (siehe Abb. 20 (3)) und per Gelelektrophorese überprüft.

Im Anschluss erfolgte die Klonierung der PCR-Produkte in den pCR8®/GW/Topo®-Vektor, der als Subklonierungsvektor dient (4.4.5.1). Die rekombinanten Plasmide wurden mittels Minipräparation isoliert und durch eine Restriktionsanalyse mit nachfolgender Gelelektrophorese sowie einer Sequenzierung charakterisiert (4.4.1, 4.4.3, 4.4.8 und 4.4.13). Sofern ein positiver Klon identifiziert wurde, erfolgte die gezielte Mutation der jeweiligen TBEs. Für die Mutagenesen wurde das QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet. Die Erfolgskontrolle wurde in identischer Weise zu den Ausgangsplasmiden durchgeführt.

Letzlich wurden alle Fragmenten mit und ohne Mutationen mittels LR-Rekombination (4.4.5.2) in den Expressionsvektor pGW-attB-lacZ überführt und per Midipräparation aufgereinigt (4.4.8), um eine ausreichende DNA-Menge für die Injektion (Abb. 20 (4)) zu isolieren. Die nachfolgende Tabelle liefert einen Überblick zu den betroffenen Konstrukten und den eingefügten Mutationen (Tab. 20).

Tab. 20: Übersicht der hergestellten Org-1 Zielgenkonstrukte

Name	Primer	Vektor	TBE	Konzentration [ng/μl]	Sequenzierung (Primer)
<i>lbiSBMs</i>	1904, 1905	pGW-attB-lacZ	CTTCACACTT/ AGGTGTAAAA	999,95	1033/1374
<i>lbiSBMsTBE1mut</i>	1679, 1680	pGW-attB-lacZ	CTTCA AG CTT	1839	1033/1374
<i>lbiSBMsTBE2mut</i>	1681, 1682	pGW-attB-lacZ	AG ATC TAAAA	1550,8	1033/1374
<i>lbiSBMsTBE1TBE2mut</i>	1681, 1682	pGW-attB-lacZ	CTTCA AG CTT/ AG ATC TAAAA	1522,05	1033/1374
<i>slouSK16</i>	1687, 1688	pGW-attB-lacZ	AAGTGTAAAA	872	1033/1374
<i>slouSK16TBE6mut</i>	1683, 1684	pGW-attB-lacZ	AGATC TAAAA	1673	1033/1374

Anm. 1: Das 923bp-große *lbi-SBMs*-Fragment ist auf dem 3. Chromosom im Bereich von 17,252,293-17,253,215 lokalisiert.

Anm. 2: Das 744bp-große *slouSK16*-Fragment ist auf dem 3. Chromosom im Bereich von 17,391,091-17,391,834 lokalisiert.

5.5.3 Diskussion

Leider konnten die hergestellten Konstrukten durch die Arbeitsgruppe von Herny Sun, Taiwan nicht erfolgreich injiziert werden. Es gab keine überlebenden Embryonen. In einem anschließenden Troubleshooting stellte sich heraus, dass die Plasmide trotz ethanolischer Fällung nach der Midipräparation zu viele Toxine enthielten. Das verwendete Midipräparations-Kit von Sigma führt leider nicht zu einer ausreichenden Aufreinigung. Auch Rainbow Transgenic Flies, Inc. rät zur Verwendung der Kits von Qiagen und zur Vermeidung von Sigma.

Die Kollegen um Manfred Frasch identifizierten mit SELEX das Org-1 Konsensus-Bindemotif TCACACCT (Schaub *et al.*, 2012). Dies entspricht tatsächlich der Hälfte der palindromische Brachyury-Konsensussequenz TCACACCT/AGGTGTGA (Kispert und Hermann, 1993). Die Frage, ob für die Bindung von Org-1 nur eine dieser TBEs ausreichend ist, kann hier nicht abschließend beantwortet werden.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Zielgene von Tbx-Proteinen in *Drosophila melanogaster* identifiziert und verifiziert werden. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Suche nach Omb-Zielgenen in der larvalen Flügelentwicklung gelegt. Bislang standen nur Daten aus einem bioinformatischen TBE-Screen (Binbas, 2009) und aus einer Microarray-Analyse von Ansgar Klebes zur Verfügung.

Ausgangspunkt für meine Arbeit war ein eigens durchgeführtes ChIP-on-chip Experiment mit Chromatin aus Flügel- und Augenimaginalscheiben wildtyischer L3-Larven (*w¹¹¹⁸*). Durch diese Methode sollten Omb-Bindestellen im Genom identifiziert und Übereinstimmungen mit den bioinformatisch bestimmten TBEs ermittelt werden. Insgesamt wurden bei einer FDR1 (*false discovery rate* von 1%) für die Augendaten 3959 potentielle Bindestellen festgestellt, für die Flügelaten 3750. Davon überlappten 65 Gene in den Augen-, Flügel- und den bioinformatischen TBE-Daten. Leider konnten aber keine direkten Übereinstimmungen der TBEs mit den ermittelten ChIP-Bindestellen festgestellt werden.

Trotzdem wurden einige interessante Kandidaten hinsichtlich ihrer endogenen Expression mittels *in situ*-Hybridisierung in verschiedenen Genotypen untersucht. Der Fokus lag dabei hauptsächlich auf Genen mit einer Beteiligung im Hh-Signalweg. Abgesehen von *hh* selbst wurden neun weitere Gene in *omb*-LOF (*en-Gal4xUAS-ombRNAi*) oder *omb*-GOF (*dpp-Gal4xUAS-omb*)-Experimenten sowie mittels qPCR im *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund untersucht. Insgesamt fielen nur die Ergebnisse der Gene *shf*, *dally* und *dlp* in der qPCR signifikant aus. Hier war jeweils eine leichte Erhöhung der Expression im *omb³¹⁹⁸*-mutanten Hintergrund zu registrieren. Eine mögliche Regulation von *boi* konnte hier nicht abschließend geklärt werden. Dieses Gen ist nach wie vor besonders interessant, da durch den bioinformatischen Screen eine hoch konservierte TBE bekannt ist.

Mittels qPCR wurden insgesamt 70 Gene hinsichtlich ihrer Expression in *l(1)omb³¹⁹⁸*-mutanten Flügelscheiben im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Bei 18 Genen erfolgte auch eine weitere histologische Analyse. Da auch die direkte Regulation von potentiellen Omb-Zielgenen über TBEs untersucht werden sollte, wurden 32 Enhancer-Reporter-Konstrukte hergestellt. Die Analyse der Enhancer-Aktivität erfolgte in der Regel über eine X-Gal Färbung an wildtypischen und *omb*-mutanten L3-Larven. Enhancer-Reporter Konstrukte von *ap* und *fz3* wurden durch Omb reprimiert, ein *al-lacZ* Konstrukt stand unter positiver Omb Kontrolle. Um die Notwendigkeit der Bindestellen und eine direkte Regulation nachzuweisen wurden für *ap* und *al* einzelne TBEs mutiert. In beiden Fällen schien der Verlust der TBE keinen Einfluss auf die Expression des Konstrukts zu haben, was auf eine indirekte Regulation durch Omb schließen lässt. Möglicherweise wirkt Omb, ähnlich wie das humane Ortholog Tbx2, als transkriptioneller Co-Faktor.

7. Anhang

7.1 Bioinformatisch ermittelte TBEs (Binbas, 2009)

Die nachfolgende Tabelle enthält Informationen zu allen TBEs, die in dieser Arbeit benannt wurden.

Tab. 21: Bioinformatisch ermittelte TBEs

Zu den jeweiligen Genen sind die Lokalisation, die Orientierung und die Sequenz der entsprechenden TBE angegeben. Der Dm Score stellt die Konservierung der TBE in Bezug auf alle anderen bekannten TBEs innerhalb von *Drosophila melanogaster* dar, wohingegen der AvAll Score die Konservierung einer identifizierten TBE innerhalb der 12 *Drosophila*-Arten angibt. Der maximale Score wurde jeweils bei 10,93 angesetzt.

Gen	Name	Chr.	Orientierung	Sequenz [5'-3']	Lokalisation	Dm Score	AvAll Score
a	<i>arc</i>	2R	for	AGGTGTCAAA	18,045,499	8,72	7,57
al	<i>aristaleless</i>	2L	for	AAGTGTGAAA	371,202	9,06	9,06
ap	<i>apterous</i>	2R	rev	ATTCACACTT	1,623,432	8,14	8,14
Awh	<i>Arrowhead</i>	3L	rev	TATCACACCT	3,848,863	8,51	8,51
B-H1	<i>Bar-H1</i>	X	rev	TGTGACACCT	17,302,182	8,44	8,21
B-H1	<i>Bar-H1</i>	X	rev	CTTCACACTT	17,302,270	8,78	8,78
B-H1	<i>Bar-H1</i>	X	for	AAGTGTGAAG	17,304,744	8,78	8,92
boi	<i>brother of ihog</i>	X	for	GGGTGTGAGA	2,361,554	10,10	7,46
brk	<i>brinker</i>	X	rev	TTTCACACCT	7,214,632	10,34	10,34
Cad74A	<i>Cadherin 74A</i>	3L	rev	CTTCACACCC	17,358,280	9,23	9,23
CR42862	CR42862	3L	for	GAGTGTGAGG	225,028	8,54	k. D.
CR42862	CR42862	3L	for	TGGTGTGAGT	225,02	8,13	k. D.
crc	<i>cryptocephal</i>	2L	rev	TTTCACACTC	21,320,394	8,23	8,23
Dll	<i>Distal-less</i>	2R	for	AAGTGTGAAA	20,698,330	9,06	8,86
Dr/msh	<i>Drop/muscle segment homeobox</i>	3R	for	GAGTGTGAAA	25,373,794	8,23	8,16
Dr/msh	<i>Drop/muscle segment homeobox</i>	3R	rev	GTTACACACTT	25,384,624	8,38	8,38
dve	<i>deveptive proventriculus</i>	2R	for	AGGTGTGAGA	18,165,193	10,93	8,55
Fz3	<i>frizzled3</i>	X	for	AGGTGTCAAC	672,885	8,04	7,94
hh	<i>hedgehog</i>	3R	for	TGGTGTGAAA	18,956,417	8,46	8,46
hh	<i>hedgehog</i>	3R	for	AGGTGTGAAC	18,960,798	9,66	9,64
inv	<i>invected</i>	2R	rev	GTTACACACTT	7,389,071	9,66	9,66
inv	<i>invected</i>	2R	for	AGGTGTGAGA	7,389,449	10,93	8,39
lbl	<i>ladybird-late</i>	3R	rev	CTTCACACTT	17,252,389	8,78	k. D.
lbl	<i>ladybird-late</i>	3R	for	AGGTGTAAAA	17,252,455	7,68	k. D.
midH15	<i>midline</i>	2L	rev	TTTCACACCT	5,484,423	10,34	k. D.
nmo	<i>nemo</i>	3L	for	AAGTGTGACA	7,962,921	8,78	8,48
nub	<i>nubbin</i>	2L	rev	ATTCACACTT	12,623,714	8,14	7,94
os	<i>outstretched</i>	X	for	AGGTGTGAGT	18,205,618	10,01	8,62
rn	<i>rotund</i>	3R	for	AGGTGTCAAA	3,122,397	8,72	8,72
shf	<i>shifted</i>	X	rev	TCTCACACCT	6,671,164	10,93	10,51
slou	<i>slouch</i>	3R	for	AAGTGTAAAA	17,392,086	6,40	k. D.
Sox15	<i>Sox box protein 15</i>	2R	for	AGGTGTGATG	10,095,372	8,23	8,23
tty	<i>tweety</i>	X	rev	GGTCACACCC	21,210,012	8,55	8,55

Gen	Name	Chr.	Orientierung	Sequenz [5'-3']	Lokalisation	Dm Score	AvAll Score
vvl	<i>ventral veins lacking</i>	3L	for	GGGTGTGAAC	6,778,400	8,83	8,83
wg	<i>wingless</i>	2L	rev	TTTCACACCC	7,304,515	9,51	9,51
zfh1	<i>Zn finger homeodomain 1</i>	3R	rev	TTTCACACTC	26,595,664	8,23	8,23

Chr.: Chromosom

Dm: *Drosophila melanogaster*

AvAll: Average All

k. D.: keine Daten verfügbar

7.2 ChIP-chip

Tab. 22: Schnittmenge aus den Eye45-Ergebnissen (FDR1) und der TBE-Liste

Von den ermittelten 3959 Bindestellen in den Eye45-Daten überlappen bei einem FDR von 1% 117 Gene mit Kandidaten der TBE-Liste (228 Gene).

Bezeichnung	Gen	CG-Nr.	FBgn-Nr.	Lokalisation
18w	<i>18 wheeler</i>	CG8896	FBgn0004364	56F8-56F8
Akap200	<i>A kinase anchor protein 200</i>	CG13388	FBgn0027932	29C3-29C4
Antp	<i>Antennapedia</i>	CG1028	FBgn0260642	84A6-84B2
a	<i>arc</i>	CG6741	FBgn0000008	58C1-58C5
al	<i>aristaleless</i>	CG3935	FBgn0000061	21C1-21C1
arr	<i>arrow</i>	CG5912	FBgn0000119	50A9-50A11
ato	<i>atonal</i>	CG7508	FBgn0010433	84F6-84F6
Atg5	<i>Autophagy-specific gene 5</i>	CG1643	FBgn0029943	7B1-7B1
B-H1	<i>BarH1</i>	CG5529	FBgn0011758	16A4-16A5
bi	<i>bifid</i>	CG3578	FBgn0000179	4C3-4C4
bib	<i>big brain</i>	CG4722	FBgn0000180	30F5-30F5
bnl	<i>branchless</i>	CG4608	FBgn0014135	92B2-92B3
boi	<i>brother of ihog</i>	CG32796	FBgn0040388	3A3-3A3
bun	<i>bunched</i>	CG42281	FBgn0259176	33E5-33E9
cic	<i>capicua</i>	CG43122	FBgn0262582	92E2-92E2
CG11200	<i>Carbonyl reductase</i>	CG11200	FBgn0034500	56F16-56F16
cher	<i>cheerio</i>	CG3937	FBgn0014141	89E12-89E13
ct	<i>cut</i>	CG11387	FBgn0004198	7B4-7B6
dac	<i>dachshund</i>	CG4952	FBgn0005677	36A1-36A2
ds	<i>dachsous</i>	CG17941	FBgn0000497	21E2-21E2
Doa	<i>Darkener of apricot</i>	CG42320	FBgn0259220	98F2-98F2
dpp	<i>decapentaplegic</i>	CG9885	FBgn0000490	22F1-22F3
dve	<i>defective proventriculus</i>	CG5799	FBgn0020307	58D2-58D2
dsf	<i>dissatisfaction</i>	CG9019	FBgn0015381	26A1-26A2
Dot	<i>Dorothy</i>	CG2788	FBgn0015663	24A1-24A2
Dscam	<i>Down syndrome cell adhesion molecule</i>	CG17800	FBgn0033159	43A4-43B1
drm	<i>drumstick</i>	CG10016	FBgn0024244	24A1-24A1
EcR	<i>Ecdysone receptor</i>	CG1765	FBgn0000546	42A9-42A12
ec	<i>echinus</i>	CG2904	FBgn0000542	3F3-3F3
Ect4	<i>Ect4</i>	CG43119	FBgn0262579	66B5-66B6
E(spl)	<i>Enhancer of split</i>	CG8365	FBgn0000591	96F10-96F10
Egfr	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	CG10079	FBgn0003731	57E9-57F1

Bezeichnung	Gen	CG-Nr.	FBgn-Nr.	Lokalisation
Fas2	<i>Fasciclin 2</i>	CG3665	FBgn0000635	4B1-4B3
flil	<i>flightless I</i>	CG1484	FBgn0000709	19F5-19F5
f	<i>forked</i>	CG42864	FBgn0262111	15F4-15F4
fj	<i>four-jointed</i>	CG10917	FBgn0000658	55C1-55C1
fz3	<i>frizzled 3</i>	CG16785	FBgn0027343	1C4-1C4
fry	<i>furry</i>	CG32045	FBgn0016081	67C3-67C4
Gprk2	<i>G protein-coupled receptor kinase 2</i>	CG17998	FBgn0261988	100C3-100C4
grn	<i>grain</i>	CG9656	FBgn0001138	84F1-84F1
Gap1	<i>GTPase-activating protein 1</i>	CG6721	FBgn0004390	67C10-67C11
htl	<i>heartless</i>	CG7223	FBgn0010389	90E2-90E2
Hs6st	<i>Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase</i>	CG4451	FBgn0038755	92B9-92C1
heph	<i>hephaestus</i>	CG31000	FBgn0011224	100D3-100E1
hbs	<i>hibris</i>	CG7449	FBgn0029082	51D8-51D8
inv	<i>invected</i>	CG17835	FBgn0001269	47F15-47F17
kst	<i>karst</i>	CG12008	FBgn0004167	63D2-63D2
kirre	<i>kin of irre</i>	CG3653	FBgn0028369	3C6-3C7
lola	<i>longitudinals lacking</i>	CG12052	FBgn0005630	47A11-47A13
mirr	<i>mirror</i>	CG10601	FBgn0014343	69D3-69D4
MESR3	<i>Misexpression suppressor of ras 3</i>	CG15162	FBgn0032694	36F7-36F9
Msp-300	<i>Muscle-specific protein 300</i>	CG42768	FBgn0261836	25C6-25C6
NetA	<i>Netrin-A</i>	CG18657	FBgn0015773	12F1-12F2
Nos	<i>Nitric oxide synthase</i>	CG6713	FBgn0011676	32B1-32B1
opa	<i>odd paired</i>	CG1133	FBgn0003002	82D8-82E1
orb	<i>oo18 RNA-binding protein</i>	CG10868	FBgn0004882	94E9-94E9
Optix	<i>Optix</i>	CG18455	FBgn0025360	44A3-44A3
osp	<i>outspread</i>	CG3479	FBgn0003016	35B3-35B4
Pdp1	<i>PAR-domain protein 1</i>	CG17888	FBgn0016694	66A14-66A17
pwn	<i>pawn</i>	CG11101	FBgn0003174	43A3-43A3
px	<i>plexus</i>	CG4444	FBgn0003175	58E4-58E8
pnt	<i>pointed</i>	CG17077	FBgn0003118	94E10-94E13
pdm2	<i>POU domain protein 2</i>	CG12287	FBgn0004394	33F2-33F3
pk	<i>prickle</i>	CG11084	FBgn0003090	42F3-43A1
Ptp61F	<i>Protein tyrosine phosphatase 61F</i>	CG9181	FBgn0003138	61F7-62A1
pum	<i>pumilio</i>	CG9755	FBgn0003165	85C4-85D1
pyr	<i>pyramus</i>	CG13194	FBgn0033649	48C2-48C2
qsm	<i>quasimodo</i>	CG13432	FBgn0028622	57A5-57A6
Ref2	<i>RNA and export factor binding protein 2</i>	CG17031	FBgn0032439	33F1-33F1
S6k	<i>RPS6-p70-protein kinase</i>	CG10539	FBgn0015806	64E8-64E11
shn	<i>schnurri</i>	CG7734	FBgn0003396	47D6-47D7
srp	<i>serpent</i>	CG3992	FBgn0003507	89A11-89A12
sano	<i>serrano</i>	CG12758	FBgn0034408	55F8-56A1
Stat92E	<i>Signal-transducer and activator of transcription protein at 92E</i>	CG4257	FBgn0016917	92F1-92F1
sob	<i>sister of odd and bowl</i>	CG3242	FBgn0004892	24A1-24A1
smi35A	<i>smell impaired 35A</i>	CG4551	FBgn0016930	35A1-35A2
salm	<i>spalt major</i>	CG6464	FBgn0261648	32F1-32F2
ss	<i>spineless</i>	CG6993	FBgn0003513	89B14-89B15

Bezeichnung	Gen	CG-Nr.	FBgn-Nr.	Lokalisation
S	<i>Star</i>	CG4385	FBgn0003310	21E4-21E4
Sb	<i>Stubble</i>	CG4316	FBgn0003319	89B4-89B6
stumps	<i>stumps</i>	CG31317	FBgn0020299	88C8-88C9
Sulf1	<i>Sulfated</i>	CG6725	FBgn0040271	89B12-89B12
Sdc	<i>Syndecan</i>	CG10497	FBgn0010415	57E1-57E6
tup	<i>tailup</i>	CG10619	FBgn0003896	37B1-37B1
trol	<i>terribly reduced optic lobes</i>	CG33950	FBgn0261451	3A3-3A4
tkv	<i>thickveins</i>	CG14026	FBgn0003716	25D1-25D2
ths	<i>thisbe</i>	CG12443	FBgn0033652	48C3-48C4
tRNA:CR31215	<i>transfer RNA:CR31215</i>	CR31215	FBgn0051215	92B2-92B2
tRNA:V3b:92Bb	<i>transfer RNA:val3b:92Bb</i>	CR31430	FBgn0012004	92B2-92B2
Tim17b2	<i>Translocase inner membrane 17</i>	CG15257	FBgn0020371	35D2-35D2
Tom	<i>Twin of m4</i>	CG5185	FBgn0026320	71A3-71A3
Ugt37c1	<i>UDP-glycosyltransferase 37c1</i>	CG8652	FBgn0026754	53D12-53D12
Unc-76	<i>Unc-76</i>	CG3981	FBgn0040395	2C10-2D1
uzip	<i>unzipped</i>	CG3533	FBgn0004055	60E12-60F1
vn	<i>vein</i>	CG10491	FBgn0003984	64E12-64F2
wg	<i>wingless</i>	CG4889	FBgn0004009	27F1-27F1
CG8611	/	CG8611	FBgn0027602	16A5-16A5
CG1677	/	CG1677	FBgn0029941	7A8-7B1
CG5080	/	CG5080	FBgn0031313	21F1-21F1
CG3702	/	CG3702	FBgn0031590	24D8-24E1
CG13955	/	CG13955	FBgn0033412	45D5-45D5
CG8317	/	CG8317	FBgn0034140	53C8-53C8
CG3640	/	CG3640	FBgn0035042	60D10-60D10
CG4781	/	CG4781	FBgn0035043	60D10-60D10
CG9630	/	CG9630	FBgn0037561	84F6-84F6
CG14316	/	CG14316	FBgn0038567	90F3-90F3
CG4662	/	CG4662	FBgn0038735	92B3-92B3
CG6015	/	CG6015	FBgn0038927	94A1-94A1
CG6129	/	CG6129	FBgn0039152	95E1-95E1
CG9743	/	CG9743	FBgn0039756	99E2-99E2
CG11334	/	CG11334	FBgn0039849	100C4-100C4
CG11333	/	CG11333	FBgn0039850	100C4-100C4
CG32773	/	CG32773	FBgn0052773	4C2-4C2
CG32816	/	CG32816	FBgn0052816	1A2-1A3
CG34380	/	CG34380	FBgn0085409	26B10-26B10
CG42673	/	CG42673	FBgn0261555	67B13-67C1
CR43622	/	CR43622	FBgn0263613	51D9-51D9

Tab. 23: Schnittmenge aus den Wing23b-Ergebnissen (FDR1) und der TBE-Liste

Von den ermittelten 3750 Bindestellen in den Wing23b-Daten überlappen bei einem FDR von 1% 96 Gene mit Kandidaten der TBE-Liste (228 Gene).

Bezeichnung	Gen	CG-Nr.	FBgn-Nr.	Lokalisation
Antp	<i>Antennapedia</i>	CG1028	FBgn0260642	84A6-84B2
ap	<i>apterous</i>	CG8376	FBgn0000099	41F8-41F8
a	<i>arc</i>	CG6741	FBgn0000008	58C1-58C5

Bezeichnung	Gen	CG-Nr.	FBgn-Nr.	Lokalisation
Argk	<i>Arginine kinase</i>	CG32031	FBgn0000116	66F3-66F4
al	<i>aristaless</i>	CG3935	FBgn0000061	21C1-21C1
Awh	<i>Arrowhead</i>	CG1072	FBgn0013751	63F4-63F4
Baldspot	<i>Baldspot</i>	CG3971	FBgn0260960	73B4-73B5
Bx	<i>Beadex</i>	CG6500	FBgn0000242	17C3-17C4
bi	<i>bifid</i>	CG3578	FBgn0000179	4C3-4C4
bnl	<i>branchless</i>	CG4608	FBgn0014135	92B2-92B3
Cad74A	<i>Cad74A</i>	CG6445	FBgn0036715	74A5-74A6
cic	<i>capicua</i>	CG43122	FBgn0262582	92E2-92E2
cher	<i>cheerio</i>	CG3937	FBgn0014141	89E12-89E13
ct	<i>cut</i>	CG11387	FBgn0004198	7B4-7B6
ds	<i>dachsous</i>	CG17941	FBgn0000497	21E2-21E2
Doa	<i>Darkener of apricot</i>	CG42320	FBgn0259220	98F2-98F2
dpp	<i>decapentaplegic</i>	CG9885	FBgn0000490	22F1-22F3
dve	<i>defective proventriculus</i>	CG5799	FBgn0020307	58D2-58D2
dsf	<i>dissatisfaction</i>	CG9019	FBgn0015381	26A1-26A2
Dot	<i>Dorothy</i>	CG2788	FBgn0015663	24A1-24A2
Doc2	<i>Dorsocross2</i>	CG5187	FBgn0035956	66F1-66F1
Dscam	<i>Down syndrome cell adhesion molecule</i>	CG17800	FBgn0033159	43A4-43B1
drm	<i>drumstick</i>	CG10016	FBgn0024244	24A1-24A1
dy	<i>dusky</i>	CG9355	FBgn0004511	10E2-10E2
ec	<i>echinus</i>	CG2904	FBgn0000542	3F3-3F3
Ect4	<i>Ect4</i>	CG43119	FBgn0262579	66B5-66B6
Egfr	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	CG10079	FBgn0003731	57E9-57F1
f	<i>forked</i>	CG42864	FBgn0262111	15F4-15F4
fz	<i>frizzled</i>	CG17697	FBgn0001085	70D4-70D5
fry	<i>furry</i>	CG32045	FBgn0016081	67C3-67C4
Gprk2	<i>G protein-coupled receptor kinase 2</i>	CG17998	FBgn0261988	100C3-100C4
gsb-n	<i>gooseberry-neuro</i>	CG2692	FBgn0001147	60F1-60F2
grn	<i>grain</i>	CG9656	FBgn0001138	84F1-84F1
Hs6st	<i>Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase</i>	CG4451	FBgn0038755	92B9-92C1
heph	<i>hephaestus</i>	CG31000	FBgn0011224	100D3-100E1
inv	<i>invected</i>	CG17835	FBgn0001269	47F15-47F17
kst	<i>karst</i>	CG12008	FBgn0004167	63D2-63D2
kirre	<i>kin of irre</i>	CG3653	FBgn0028369	3C6-3C7
lola	<i>longitudinals lacking</i>	CG12052	FBgn0005630	47A11-47A13
mthl1	<i>methuselah-like 1</i>	CG4521	FBgn0030766	14F4-14F5
mirr	<i>mirror</i>	CG10601	FBgn0014343	69D3-69D4
MESR3	<i>Misexpression suppressor of ras 3</i>	CG15162	FBgn0032694	36F7-36F9
Mnt	<i>Mnt</i>	CG13316	FBgn0023215	3E4-3E5
Msp-300	<i>Muscle-specific protein 300</i>	CG42768	FBgn0261836	25C6-25C6
Mbs	<i>Myosin binding subunit</i>	CG32156	FBgn0005536	72D1-72D1
opa	<i>odd paired</i>	CG1133	FBgn0003002	82D8-82E1
odd	<i>odd skipped</i>	CG3851	FBgn0002985	24A1-24A1

Bezeichnung	Gen	CG-Nr.	FBgn-Nr.	Lokalisation
orb	<i>oo18 RNA-binding protein</i>	CG10868	FBgn0004882	94E9-94E9
Optix	<i>Optix</i>	CG18455	FBgn0025360	44A3-44A3
osp	<i>outspread</i>	CG3479	FBgn0003016	35B3-35B4
os	<i>outstretched</i>	CG5993	FBgn0004956	17A5-17A5
px	<i>plexus</i>	CG4444	FBgn0003175	58E4-58E8
pnt	<i>pointed</i>	CG17077	FBgn0003118	94E10-94E13
pdm2	<i>POU domain protein 2</i>	CG12287	FBgn0004394	33F2-33F3
Poxn	<i>Pox neuro</i>	CG8246	FBgn0003130	52C7-52C7
pk	<i>prickle</i>	CG11084	FBgn0003090	42F3-43A1
Ptp61F	<i>Protein tyrosine phosphatase 61F</i>	CG9181	FBgn0003138	61F7-62A1
pum	<i>pumilio</i>	CG9755	FBgn0003165	85C4-85D1
RNaseX25	<i>Ribonuclease X25</i>	CG8194	FBgn0010406	66A21-66A21
S6k	<i>RPS6-p70-protein kinase</i>	CG10539	FBgn0015806	64E8-64E11
rg	<i>rugose</i>	CG6775	FBgn0086911	4F3-4F3
shn	<i>schnurri</i>	CG7734	FBgn0003396	47D6-47D7
scrt	<i>scratch</i>	CG1130	FBgn0004880	64A2-64A2
sano	<i>serrano</i>	CG12758	FBgn0034408	55F8-56A1
sob	<i>sister of odd and bowl</i>	CG3242	FBgn0004892	24A1-24A1
smi35A	<i>smell impaired 35A</i>	CG4551	FBgn0016930	35A1-35A2
salm	<i>spalt major</i>	CG6464	FBgn0261648	32F1-32F2
S	<i>Star</i>	CG4385	FBgn0003310	21E4-21E4
sr	<i>stripe</i>	CG7847	FBgn0003499	90E4-90F1
Sb	<i>Stubble</i>	CG4316	FBgn0003319	89B4-89B6
Sulf1	<i>Sulfated</i>	CG6725	FBgn0040271	89B12-89B12
Sdc	<i>Syndecan</i>	CG10497	FBgn0010415	57E1-57E6
tup	<i>tailup</i>	CG10619	FBgn0003896	37B1-37B1
tap	<i>target of Poxn</i>	CG7659	FBgn0015550	74A5-74A5
trol	<i>terribly reduced optic lobes</i>	CG33950	FBgn0261451	3A3-3A4
ths	<i>thisbe</i>	CG12443	FBgn0033652	48C3-48C4
Traf4	<i>TNF-receptor-associated factor 4</i>	CG3048	FBgn0026319	24E1-24E4
Ugt37c1	<i>UDP-glycosyltransferase 37c1</i>	CG8652	FBgn0026754	53D12-53D12
uzip	<i>unzipped</i>	CG3533	FBgn0004055	60E12-60F1
vn	<i>vein</i>	CG10491	FBgn0003984	64E12-64F2
zfh1	<i>Zn finger homeodomain 1</i>	CG1322	FBgn0004606	100A4-100A5
CG1677	/	CG1677	FBgn0029941	7A8-7B1
CG3702	/	CG3702	FBgn0031590	24D8-24E1
CG15086	/	CG15086	FBgn0034374	55E6-55E6
CG10089	/	CG10089	FBgn0036369	70B2-70B2
CG11370	/	CG11370	FBgn0037181	79F6-79F6
CG11671	/	CG11671	FBgn0037562	84F8-84F8
CG11672	/	CG11672	FBgn0037563	84F9-84F9
CG4467	/	CG4467	FBgn0039064	94E7-94E8
CG11334	/	CG11334	FBgn0039849	100C4-100C4
CG11333	/	CG11333	FBgn0039850	100C4-100C4

Bezeichnung	Gen	CG-Nr.	FBgn-Nr.	Lokalisation
CG32773	/	CG32773	FBgn0052773	4C2-4C2
CG32816	/	CG32816	FBgn0052816	1A2-1A3
CG33158	/	CG33158	FBgn0053158	72F1-73A3
CG42272	/	CG42272	FBgn0259167	64E8-64E11
CR43622	/	CR43622	FBgn0263613	51D9-51D9

7.3 RNA-Sonden

In der nachfolgenden Tabelle sind weitere Sonden verzeichnet, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden. Einige Sonden (kn, MESR3, nmo, sda und vvl) kamen nicht zum Einsatz. Mit weiteren Sonden fand zwar eine Analyse des Expressionsmusters statt, die Gene wurden aber in dieser Arbeit nicht weiter in Bezug auf Omb untersucht. Die wildtypischen Expressionmuster dieser Kandidaten in den Imaginalscheiben sind nach der Tabelle in einer Abbildung (**Abb. 50**) zusammengestellt.

Tab. 24: antisense RNA-Sonden für *in situ*-Hybridisierungen (Teil 2)

Bezeichnung	Gen	Verdünnung	Primer	Länge [bp]	RNA-Pol	Matrize*
kn	<i>knot</i>	/	1438, 1439	625	T7	PCR-Produkt
MESR3	<i>Misexpression suppressor of ras 3</i>	/	1823, 1824	348	T7	PCR-Produkt
nmo	<i>nemo</i>	/	1825, 1826	271	T7	PCR-Produkt
os	<i>outstretched</i>	/	1352, 1353	1583	T7	cDNA
sda	<i>slamdance</i>	/	1827, 1828	269	T7	PCR-Produkt
vvl[1042bp]	<i>ventral veins lacking</i>	/	1426, 1428	1042	T7	cDNA
vvl[755bp]	<i>ventral veins lacking</i>	/	1427, 1428	755	T7	cDNA
Csk	<i>C-terminal Src kinase</i>	1:500	1666, 1667	368	T7	PCR-Produkt
e	<i>ebony</i>	1:100	1522, 1523	523	T7	PCR-Produkt
en	<i>engrailed</i>	1:500	1585, 1586	325	T7	PCR-Produkt
inv	<i>invected</i>	1:500	1558, 1559	684	T7	cDNA
tup	<i>tailup</i>	1:500	/	3317	SP6	GH12341

Pol: Polymerase

*Primer: Die Sequenzen der genutzten Primer sind in Tab. 30 (7.9.1) zu finden.

**Anmerkungen (zur Herstellung der Sonden, siehe auch 4.4.14):

PCR-Produkt: über T7-Promotor-Sequenz an 3'-Primer der relevanten DNA-Sequenz

EST-Klon: kommerziell erhältlicher cDNA-Klon als Matrize zur Sondenherstellung

cDNA: selbst hergestellte cDNA im pCR-XL-Topo-Vektor

EST-Klon GH12341: cDNA im Vektor pOT2; mit SmaI linearisiert

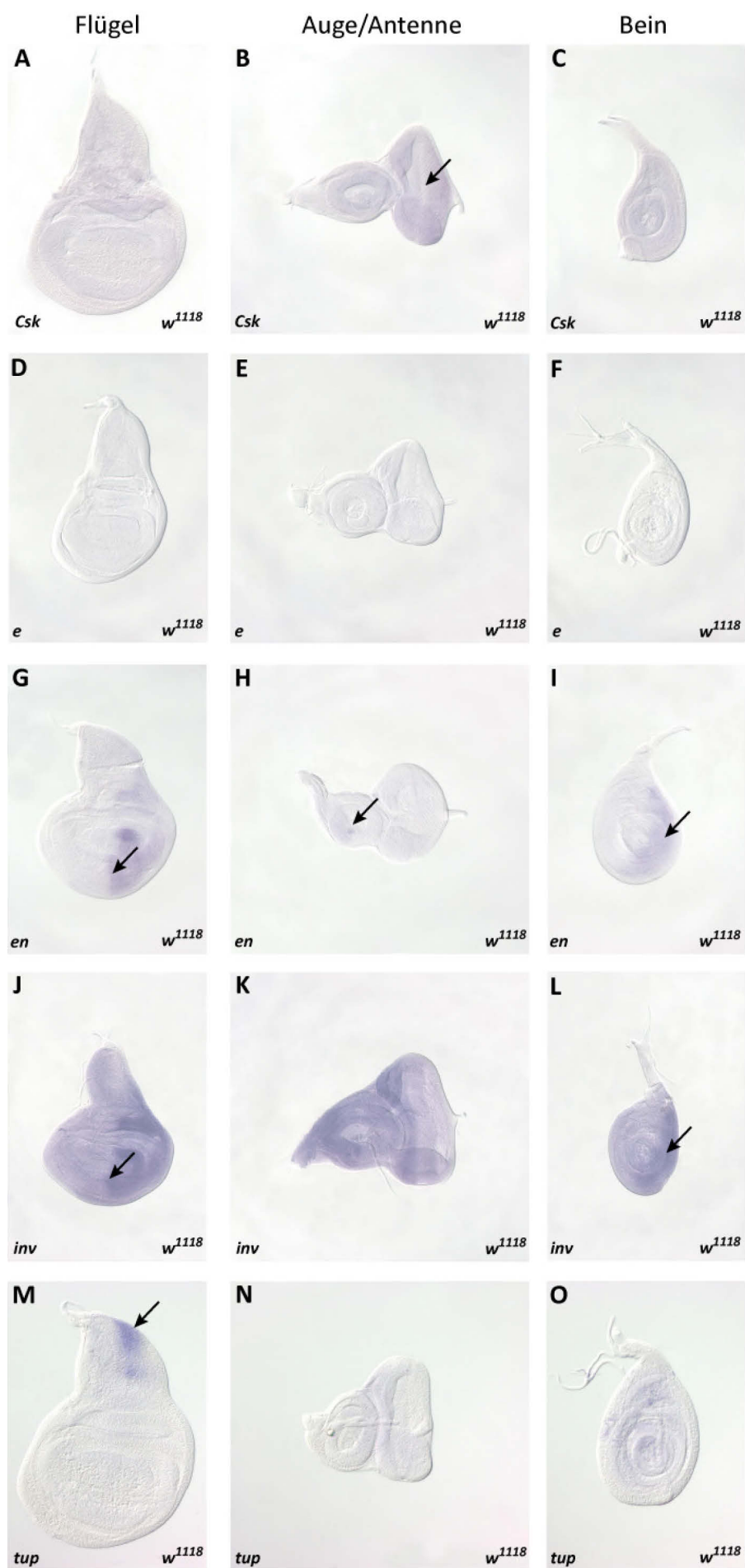


Abb. 50: Wildtypische Expressionsmuster verschiedener Gene in Imaginalscheiben (vorherige Seite)

(A-O) Sichtbare *in situ*-Hybridisierungen (ISH) an wildtypischen (*w¹¹¹⁸*) L3-Imaginalscheiben (Flügel, Auge/Antenne, Bein). (A-C) *Csk*: Alle Scheibentypen sind weitestgehend ubiquitär gefärbt. Die MF in der Augenscheibe scheint ungefärbt (Pfeil). (D-F) *e*: Die Scheiben weisen keine Färbung auf. (G-I) *en*: In der Flügel-(G) und der Beinscheibe (I) ist deutlich das posteriore Kompartiment (Pfeil) gefärbt. In der Anntenenscheibe (H) ist ebenfalls eine Färbung zu sehen (Pfeil). (J-L) *inv*: In der Flügel-(J) und der Beinscheibe (L) ist deutlich das posteriore Kompartiment (Pfeil) gefärbt. Die Augen-/Antennenscheibe (K) ist weitestgehend ubiquitär gefärbt. Generell ist die Hintergrundfärbung in allen Scheiben (J-L) sehr hoch. (M-O) *tup*: Die Flügelscheibe (M) zeigt eine sehr spezifische Färbung im Notum (Pfeil), die Augen-/Anntenenscheibe (N) erscheint ungefärbt, die Beinscheibe (O) zeigt eine leichte, diffuse Färbung.

7.4 qPCR

7.4.1 Rohdaten zur statistischen Auswertung der qPCR

Mit Hilfe des Programms Statistica 13 wurden Mittelwerte aus den RQ-Werten der *FM-GFP*- und *omb³¹⁹⁸*-Proben aus unabhängigen Experimenten berechnet. Signifikante Unterschiede der unabhängigen Stichproben wurden mit dem zweiseitigen, studentischen t-Test ermittelt. Sie werden wie folgt bewertet: * signifikant: $p < 0,05$, ** hoch-signifikant: $p < 0,01$, *** höchst-signifikant: $p < 0,001$. Alle anderen Werte gelten als nicht signifikant.

Tab. 25: Rohdaten zur statistischen Auswertung der qPCR (außer *hh*-Kaskade)

Gen	Mittelwert RQ (<i>FM-GFP</i>)	Mittelwert RQ (<i>omb³¹⁹⁸</i>)	t-Wert	p	N	Stdabw. (<i>FM-GFP</i>)	Stdabw. (<i>omb³¹⁹⁸</i>)	F-Quot. (Varianzen)
<i>al</i>	1,001444	0,473444	11,81504	0,000000	9 (3)	0,056192	0,121722	4,692367
<i>ap</i>	1,001222	1,757111	-6,01953	0,000018	9 (3)	0,054861	0,372702	46,153230
CR42862	1,002333	2,313778	-7,87886	0,000001	9 (3)	0,071894	0,49415	47,242500
<i>Dll</i>	1,003833	0,533667	3,445651	0,006272	6 (2)	0,096186	0,320099	11,07502
<i>e</i>	1,002333	5,471167	-7,99967	0,000012	6 (2)	0,075203	1,366283	330,0751
<i>fz3</i>	1,002667	2,081333	-7,09731	0,000003	9 (3)	0,076271	0,449523	34,73652
<i>msh</i>	1,001833	1,216833	-1,51688	0,160253	6 (2)	0,068616	0,340338	24,60197
<i>sens</i>	1,002667	0,426667	8,41255	0,000008	6 (2)	0,079354	0,147753	3,466863
<i>wg</i>	1,003500	0,855167	1,298507	0,223258	6 (2)	0,092156	0,264203	8,219220
<i>y</i>	1,023833	0,256833	6,372448	0,000081	6 (2)	0,242949	0,167026	2,115731

N: Anzahl der technischen Replikate für *FM-GFP* und *omb³¹⁹⁸*; () Anzahl der biologischen Replikate

Stdabw.: Standardabweichung

F-Quot.: F-Quotient

Tab. 26: Rohdaten zur statistischen Auswertung der *hh*-qPCR

Gen	Mittelwert RQ (<i>FM-GFP</i>)	Mittelwert RQ (<i>omb³¹⁹⁸</i>)	t-Wert	p	N	Stdabw. (<i>FM-GFP</i>)	Stdabw. (<i>omb³¹⁹⁸</i>)	F-Quot. (Varianzen)
<i>boi</i>	1,005833	1,702000	-1,518830	0,159767	6 (2)	0,119687	1,116340	86,996060
<i>botv</i>	1,011333	1,026167	-0,072756	0,943435	6 (2)	0,167542	0,470454	7,884762
<i>dally</i>	1,001000	1,319333	-8,322870	0,000008	6 (2)	0,049202	0,079729	2,625854
<i>disp</i>	1,001333	1,052000	-0,776785	0,480661	3 (1)	0,057012	0,097535	2,926777
<i>dip</i>	1,004111	1,500111	-7,235160	0,000002	9 (3)	0,096054	0,181853	3,584361

Gen	Mittelwert RQ (<i>FM-GFP</i>)	Mittelwert RQ (<i>omb</i> ³¹⁹⁸)	t-Wert	p	N	Stdabw. (<i>FM-GFP</i>)	Stdabw. (<i>omb</i> ³¹⁹⁸)	F-Quot. (Varianzen)
<i>Flo-2</i>	1,003500	1,628833	-3,414140	0,006612	6 (2)	0,090796	0,439365	23,416320
<i>hh</i>	1,002000	0,745833	4,068584	0,002255	6 (2)	0,071069	0,136874	3,709228
<i>ihog</i>	1,001500	1,024000	-0,346472	0,736168	6 (2)	0,056373	0,148747	6,962334
<i>shf</i>	1,002000	1,254167	-5,020930	0,000521	6 (2)	0,067154	0,103076	2,355989
<i>ttv</i>	1,005333	1,241667	-1,919390	0,127361	3 (1)	0,123087	0,174162	2,002090

N: Anzahl der technischen Replikate für *FM-GFP* und *omb*³¹⁹⁸; () Anzahl der biologischen Replikate

Stdabw.: Standardabweichung

F-Quot.: F-Quotient

7.4.2 qPCR-Ergebnisse

Tab. 27: qPCR-Kandidatengene mit RQ-Werten

Die nachfolgenden Kandidaten wurden nicht weiter verfolgt. Die Bestimmung der RQ-Werte erfolgte je einmal in technischen Triplikaten. In Ausnahmefällen wurde das Experiment auch in zwei biologischen Replikaten ((1) und (2)) durchgeführt, dann sind die Ergebnisse untereinander aufgelistet. Die Tabelle enthält für die *FM-GFP*- und *omb*³¹⁹⁸-Proben jeweils die ΔC_T -Werte sowie die Standardabweichung (SD) und den RQ-Wert.

Gen	Bezeichnung	CG-Nummer	Primer-Nr.	Genotyp	ΔC_T	SD	RQ
18w	<i>18wheeler</i>	CG8896	1595/1596	<i>FM-GFP</i>	1,055	0,044	1,142
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	0,863	0,043	
a	<i>arc</i>	CG6741	1601/1602	<i>FM-GFP</i>	6,261	0,108	1,712
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	5,485	0,031	
ac	<i>achaete</i>	CG3796	1597/1598	<i>FM-GFP</i>	5,647	0,049	1,126
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	5,475	0,019	
Akap200	<i>A kinase anchor protein 200</i>	CG13388	1599/1600	<i>FM-GFP</i>	-0,180	0,107	0,768
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	0,201	0,071	
AP-50	<i>Adaptor Protein complex 2, μ subunit</i>	CG7057	1461/1462	<i>FM-GFP</i>	4,652	0,044	0,939
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	4,744	0,057	
Atg5	<i>Autophagy specific gene 5</i>	CG1643	1603/1604	<i>FM-GFP</i>	8,232	0,055	1,207
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	7,961	0,018	
bib	<i>big brain</i>	CG4722	1605/1606	<i>FM-GFP</i>	4,140	0,045	0,834
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	4,403	0,019	
brn	<i>brainiac</i>	CG4934	1465/1466	<i>FM-GFP</i>	9,937	0,059	1,575
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	9,282	0,060	
Bx	<i>Beadex</i>	CG44425	1611/1612	<i>FM-GFP</i>	9,094	0,046	1,099
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	8,958	0,022	
caps (1)	<i>capricious</i>	CG11282	1613/1614	<i>FM-GFP</i>	9,259	0,099	5,091
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	6,911	0,058	
caps (2)	<i>capricious</i>	CG11282	1613/1614	<i>FM-GFP</i>	11,327	0,059	2,475
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	10,020	0,125	
cbtNEU	<i>cabut</i>	CG4427	1711/1712	<i>FM-GFP</i>	6,491	0,035	3,807
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	4,563	0,147	
CCS	/	CG17753	1467/1468	<i>FM-GFP</i>	8,639	0,038	1,334
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	8,244	0,068	
cic	<i>capicua</i>	CG43122	1619/1620	<i>FM-GFP</i>	1,716	0,041	1,734
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	0,922	0,035	
cg	<i>combgap</i>	CG8367	1471/1472	<i>FM-GFP</i>	5,357	0,045	1,121
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	5,193	0,076	
coro	/	CG9446	1473/1474	<i>FM-GFP</i>	6,863	0,050	1,516

Gen	Bezeichnung	CG-Nummer	Primer-Nr.	Genotyp	ΔC_T	SD	RQ
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	6,263	0,064	
Csk1-2	<i>C-terminal Src kinase Exon1-2</i>	CG42317	1701/1702	<i>FM-GFP</i>	7,958	0,273	1,130
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	7,782	0,455	
CycE	<i>CyclinE</i>	CG3938	1554/1555	<i>FM-GFP</i>	7,539	0,015	1,239
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	7,231	0,076	
CG18128	/	CG18128	1469/1470	<i>FM-GFP</i>	14,423	0,066	1,182
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	14,182	0,120	
CG34380	<i>CG34380</i>	CG34380	1617/1618	<i>FM-GFP</i>	8,400	0,019	1,295
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	8,027	0,046	
da (1)	<i>daughterless</i>	CG5102	1292/1293	<i>FM-GFP</i>	2,967	0,040	1,157
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	2,757	0,227	
da (2)	<i>daughterless</i>	CG5102	1292/1293	<i>FM-GFP</i>	1,591	0,094	1,385
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	1,121	0,105	
dap	<i>dacapo</i>	CG1772	1548/1549	<i>FM-GFP</i>	7,617	0,020	1,303
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	7,235	0,086	
dpp	<i>decapentaplegic</i>	CG9885	1627/1628	<i>FM-GFP</i>	4,493	0,019	1,137
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	4,309	0,038	
Dll	<i>Distal-less</i>	CG3629	1443/1444	<i>FM-GFP</i>	8,218	0,021	0,242
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	10,263	0,115	
Dsp1	<i>Dorsal switch protein 1</i>	CG12223	1477/1478	<i>FM-GFP</i>	4,480	0,038	1,192
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	4,226	0,081	
E2F2	<i>E2F transcription factor 2</i>	CG1071	1479/1480	<i>FM-GFP</i>	1,361	0,029	1,266
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	1,021	0,059	
fz2	<i>frizzled 2</i>	CG9739	1631/1632	<i>FM-GFP</i>	13,004	0,029	2,087
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	11,943	0,082	
GalNAc-T1 (1)	/	CG8182	1483/1484	<i>FM-GFP</i>	7,659	0,086	1,354
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	7,222	0,060	
GalNAc-T1 (2)	/	CG8182	1483/1484	<i>FM-GFP</i>	7,246	0,044	1,268
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	6,903	0,061	
inv	<i>invected</i>	CG17835	1485/1486	<i>FM-GFP</i>	3,751	0,023	0,877
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	3,940	0,070	
Kuz	<i>Kuzbanian</i>	CG7147	1556/1557	<i>FM-GFP</i>	7,101	0,039	1,311
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	6,710	0,072	
Mcm5	<i>Minichromosome maintenance 5</i>	CG4082	1487/1488	<i>FM-GFP</i>	7,145	0,081	1,090
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	7,021	0,070	
miple2	/	CG18321	1489/1490	<i>FM-GFP</i>	4,314	0,086	1,176
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	4,080	0,048	
mirr (1)	<i>mirror</i>	CG10601	1491/1492	<i>FM-GFP</i>	7,293	0,035	2,417
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	6,020	0,028	
mirr (2)	<i>mirror</i>	CG10601	1491/1492	<i>FM-GFP</i>	6,524	0,046	1,403
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	6,035	0,028	
Nca	<i>Neurocalcin</i>	CG7641	1495/1496	<i>FM-GFP</i>	7,417	0,088	1,284
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	7,057	0,060	
nmo	<i>nemo</i>	CG7892	1713/1714	<i>FM-GFP</i>	7,53	0,027	0,767
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	7,913	0,140	
nmo	<i>nemo</i>	CG7892	1715/1716	<i>FM-GFP</i>	4,409	0,053	0,687
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	4,950	0,146	
nub	<i>nubbin</i>	CG34395	1637/1638	<i>FM-GFP</i>	8,531	0,004	2,840
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	7,025	0,039	
omb (1)	<i>optomotor-blind</i>	CG3578	1497/1498	<i>FM-GFP</i>	9,050	0,024	0,766
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	9,434	0,118	
omb (2)	<i>optomotor-blind</i>	CG3578	1497/1498	<i>FM-GFP</i>	8,114	0,044	1,063
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	8,025	0,031	

Gen	Bezeichnung	CG-Nummer	Primer-Nr.	Genotyp	ΔC_T	SD	RQ
org-1	<i>optomotor-blind related gene 1</i>	CG11202	1719/1720	FM-GFP	12,254	0,784	2,896
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	10,721	0,256	
Pdp1	<i>PAR-domain protein 1</i>	CG17888	1643/1644	FM-GFP	3,678	0,021	1,876
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	2,771	0,016	
pk	<i>prickle</i>	CG11084	1645/1646	FM-GFP	7,501	0,018	1,288
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	7,136	0,035	
PNUTS	/	CG33526	1499/1500	FM-GFP	18,298	0,020	1,235
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	17,994	0,188	
qsm	<i>quasimodo</i>	CG13432	1647/1648	FM-GFP	5,994	0,015	0,925
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	6,107	0,012	
rasp	<i>rasp</i>	CG11495	1707/1708	FM-GFP	3,366	0,055	1,070
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	3,269	0,108	
RpS15Aa	<i>Ribosomal protein S15Aa</i>	CG2033	1501/1502	FM-GFP	-4,205	0,095	0,986
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	-4,185	0,063	
salm	<i>spalt-major</i>	CG6464	1294/1295	FM-GFP	1,560	0,010	0,504
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	2,547	0,081	
sc	<i>scute</i>	CG3827	1651/1652	FM-GFP	6,984	0,015	0,908
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	7,122	0,036	
sda (1)	<i>slamdance</i>	CG5518	1503/1504	FM-GFP	2,637	0,018	1,672
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	1,895	0,083	
sda (2)	<i>slamdance</i>	CG5518	1503/1504	FM-GFP	1,442	0,035	2,001
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	0,441	0,031	
Sec23	<i>Sec23 ortholog</i>	CG1250	1505/1506	FM-GFP	5,428	0,026	1,159
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	5,215	0,075	
sens (1)	<i>senseless</i>	CG32120	1507/1508	FM-GFP	10,483	0,052	0,518
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	11,431	0,138	
sens (2)	<i>senseless</i>	CG32120	1507/1508	FM-GFP	10,545	0,040	0,320
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	12,188	0,0852	
shg	<i>shotgun</i>	CG3722	1709/1710	FM-GFP	1,380	0,032	1,107
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	1,234	0,105	
vg	<i>vestigial</i>	CG3830	1453/1454	FM-GFP	2,296	0,028	0,626
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	2,971	0,059	
vvl	<i>ventral veins lacking</i>	CG10037	1509/1510	FM-GFP	6,011	0,024	1,297
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	5,636	0,068	
vn	<i>vein</i>	CG10491	1657/1658	FM-GFP	8,291	0,018	1,075
				<i>omb</i> ³¹⁹⁸	8,187	0,026	

SD: Standard Deviation (Standardabweichung)

RQ: Relative Quantification (Relative Quantifizierung)

7.5 *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukte

Tab. 28: Aufstellung von *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukte

Die nachfolgenden Konstrukte wurden erfolgreich hergestellt und sequenziert, allerdings nicht mehr injiziert und analysiert.

Bezeichnung	Gen	Primer*	Länge [bp]	Chromosomale Lokalisation**	TBE-Lokalisation
a	<i>arc</i>	1691, 1692	3555	2R: 18,043,664-18,047,218	18,045,499
Awh	<i>Arrowhead</i>	1190, 1191	2867	3L: 3,846,908-3,849,774	3,848,863
Cad74A	<i>Cadherin 74A</i>	1198, 1199	1364	3L: 17,358,010-17,359,373	17,358,280
CR42862	/	1693, 1694	2994	3L: 223,578-226,571	225,028/ 225,020
Cyp310a1	<i>Cyp310a1</i>	1397, 1387	2703	2L: 18,639,494-18,642,196	18,641,359

Bezeichnung	Gen	Primer*	Länge [bp]	Chromosomale Lokalisation**	TBE-Lokalisation
<i>inv</i>	<i>invected</i>	1920, 1921	5314	2R: 7,386,499-7,391,812	7,389,071/ 7,389,449
<i>lbl</i>	<i>ladybird late</i>	1904, 1905	923	3R: 17,252,293-17,253,215	17,252,389/ 17,252,455
<i>lblTBE1mut</i>	<i>ladybird late</i>	1679, 1680	923	3R: 17,252,293-17,253,215	17,252,389
<i>lblTBE2mut</i>	<i>ladybird late</i>	1681, 1682	923	3R: 17,252,293-17,253,215	17,252,455
<i>lblTBE1+2mut</i>	<i>ladybird late</i>	1681, 1682	923	3R: 17,252,293-17,253,215	17,252,389/ 17,252,455
<i>nmo</i>	<i>nemo</i>	1392, 1393	3196	3L: 7,960,642-7,963,837	7,962,921
<i>nub</i>	<i>nubbin</i>	1697, 1698	3306	2L: 12,622,313-12,625,618	12,623,714
<i>os</i>	<i>outstretched</i>	1918, 1919	3054	X: 18,203,122-18,206,175	18,205,618
<i>slou</i>	<i>slouch</i>	1687, 1688	744	3R: 17,391,091-17,391,834	17,392,086
<i>slouTBE6mut</i>	<i>slouch</i>	1683, 1684	744	3R: 17,391,091-17,391,834	17,392,086
<i>tup</i>	<i>tailup</i>	1341, 1342	5767	2L: 18,874,912-18,880,678	18,876,460

* Anmerkung: Die Sequenzen der genutzten Primer sind in Tab. 31 (7.9.2) zu finden.

**Anmerkung: gemäß Flybase Version FB2012_06, released November 6th, 2012

7.6 Vektor-Karte pGW-attB-lacZ

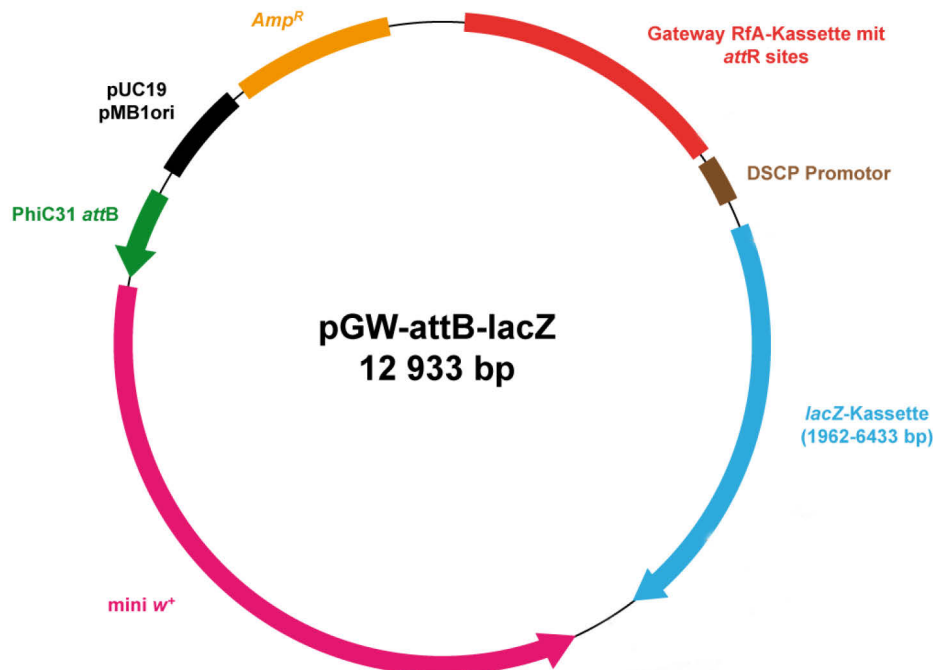


Abb. 51: Vektorkarte pGW-attB-lacZ

Expressionsvektor für die Herstellung eigener *lacZ*-Enhancer-Reporter Konstrukte. Über die Gateway RfA-Kassette und die *attR*-Sequenz (rot) erfolgt die Integration des potentiellen Enhancers von Interesse mittels Gateway-Klonierung. Die *lacZ*-Kassette (blau) stellt das Reportergen dar, welches für die β -Galactosidase kodiert. Die PhiC31 *attB*-Sequenz (grün) ist für die Integration des Plasmids in das Genom der Injektionslinie notwendig. Das Mini-*w*⁺-Gen (pink) ermöglicht die Selektion der Transformanten nach der Injektion.

7.7 Kreuzungen

Tab. 29: Kreuzungen für verschiedene Färbungen

Weiter Informationen zu den einzelnen Linien finden sich in Tab. 9.

Gal4-Linie (Nr.)	UAS-Linie (Nr.)	Zweck
GOF- und LOF-Analysen in Bezug auf verschiedene potentielle Omb-Zielgene		
<i>en>stinger/Pm</i> (V-1017)	<i>UAS-ombRNAi</i> (1007)	ISH mit <i>ap</i> -Sonde (Abb. 26)
<i>dpp-Gal4/TM6b, Tb</i> (577)	<i>UAS-omb</i> 2-17 (256)	ISH mit <i>ap/MMP2</i> -Sonde (Abb. 26, Abb. 35)
<i>dpp-Gal4/TM6, Tb</i> (577)	<i>UAS-omb</i> 4-15 (255)	ISH mit CR4286/ <i>msh/MMP1</i> -Sonde (Abb. 31, Abb. 28, Abb. 34)
<i>en>stinger/Pm</i> (V-1017)	<i>UAS-ombRNAi</i> (1007)	ISH mit <i>MMP1</i> -Sonde (Abb. 34)
Effekte von <i>omb</i>-GOF oder -LOF auf die Expression von Komponenten des Hh-Signalwegs		
<i>en>stinger/Pm</i> (V-1017)	<i>UAS-ombRNAi</i> (1007)	ISH mit <i>boi/dally/disp/dlp/hh/shf</i> -Sonde (Abb. 48)
<i>dpp-Gal4/TM6, Tb</i> (577)	<i>UAS-omb</i> 4-15 (255)	ISH mit <i>boi</i> -Sonde (Abb. 48)
Überprüfung der Auswirkungen posteriorer <i>omb</i>-Reduktion auf Ptc		
<i>en>stinger/Pm</i> (V-1017)	<i>UAS-lacZ</i> (297)	AK-Färbung α -Omb, α -Ptc, Phalloidin (Abb. 49)
<i>en>stinger/Pm</i> (V-1017)	<i>UAS-ombRNAi</i> (1007)	AK-Färbung α -Omb, α -Ptc, Phalloidin (Abb. 49)

7.8 Org-1

7.8.1 Sequenz von *lbi*-SBMs mit TBEs

Das 923bp-große *lbi*-SBMs Fragment verfügt über sechs TBEs (fett hervorgehoben). Die rot markierten TBEs wurden auch von C. Schaub (Schaub *et al.*, 2012) identifiziert, TBE5 entstammt dem bioinformatischen Screen von H. Binbas (Binbas, 2009). Nur TBE1 und TBE2 weisen eine fast vollständige Konservierung durch alle Spezies auf.

```

1  CAGCTGTGCA AGGGGATTAA TTAATCTTGT CAGCGATTGC AAGTCATTTG
51 CCATGGAAAC AGCGGCAAAC ATCTCGCATA GTCAAATTAA TTTACTTCAC TBE1
101 ACTTTAATAA ACGATTACAC AAATACCCAC CAGCACATGG GGCTGCTGTT
151 GTGCCGATGA AGGTGTTAAA TGCTTTGTTG ACATTGCCCA CAGTAGCAGC TBE2
201 CCATATAGAT ATAGAACTAT ATATATACCG ATCTGAGGAA GCAATTCGGG
251 GGAAGAAAAC ATTTTCCACA GCTTCCTTCG ATTTTACCGT GAAGTTTGTC
301 GTTCTCGGCC TGTTTTATTG CGGTGATTGT TGGTGGTTGT TGTTTGGTTC
351 TCAGTCGTGT TGCGTGTAAG TAGCAACATC CACATCCACA ATAACACCAA TBE3
401 CTTGTGCTTG TTTTTCCTTT TCACTGAGTT TTCCATTCAT TCCCGCATTC
451 GTTATGCCCT TCGTCCCTTT GGATTGGGC GAAGTCTCGA ATATGTTCCA
501 GCGAAGGGCT GAATGCCTCT TTGATGTACT GACTGTGCGG GGGAAAGGCGT TBE4
551 GAAAATGACT TAATGTACTG ATTAGGGAAA GTCAATCGTC GGGAAAGGAAA
601 TGATTTCGTG CATCCGACTG TAGTGGGAGG TTGAGAAATT GAAGAAATCA TBE5
651 CAGGTGATGA TTAACAGATT GAATGGGACT AATACATGCT CAGCGGAACT
701 AATGGGAGAC GTAACAATAA ATGTGAATAA AAATGTGACA CTTTAAACTT TBE6
751 CTTGCCATGT GTTTTGACCA CTTCCTCTG ATATCATAAT ATATTTTAAA
801 TCCATTTAAC CACCTTATCA AGATCAGCTA GATCTCCTGC ACTTCATGTT
851 ATTATCGAAA TACATTAAGA ATCCGCCACG CTGCAGAATT TAAGCGTTCT
901 TTGAAGATCC TATGACGGAG CG

```

7.8.2 Sequenz von *slouSK16* mit den TBEs

Das *slouSK16*-Fragment enthält laut C. Schaub (Schaub *et al.*, 2012) sieben TBEs (rot markiert), wovon nur eine, TBE6 in unserem bioinformatischen Ansatz identifiziert wurde (Binbas, 2009).

```

1 CTGACACAAA TATTGCTTGC AGGCGAGTCG TGTGCAAGCA AATGTCGGCG TBE1
51 GCAAAAATAA TTACACATC TAATTAGGAT ACTGGTGAAT ATAATGCTTT TBE2
101 TATGACTCTT TAATGCATGC TCTAAATACT GCATTATAAC CAGTTTAATC
151 ACTTGGCTGC TCGGAAAAAT TAGCTTGCCA AATATTTTTT CCTGCCATCA
201 TTGCGTACAT ACTATACTCC CAGAAATGCG TTATAAAAAAT GTCGACCACT TBE3
251 CTGCCAACTG AGCACACTCA AAACACAATA AAAAAAGAAA ACGTATTTTG
301 AATATATTGC TTTATAAAAC ATAGCATCAT TTGGCCCTTT CGTCGACCGA
351 AAAACAAACA TAGACCGAAA AGACATTGTA TCTGCTGGTT GTTCTCGCAT
401 TTTTATGTGC CATGAAATTA ATTTACGATT ACGACAATTT AAATTTTAA TBE4
451 AATCCCACTA AAAGTATGCC AACAAAGCCC TCGAAGTGTT TAAAAAGCAA TBE5/TBE6
501 GTCAGAGAAA GAGGAAGCGG CCACAAATGT GCCCGGATA TTGTTTGTGT
551 ATTGGGGGCT GTGGGTCCTG AGAAAAGGGG CTTCTGGGGC CATGTGTGTCG
601 CTGTTCAATA GCAAAGTGTT GACTTGAGTT TATGTTTCAT ATTTGTGTCAG
651 AAGTCATTTA ATTTCTATAA ACAGACAGCC AGCTGCAGG GGTGCTACT
701 CCGCCGACA GGATGATGAT GATGATGATG TGGCACTGAC ATTT TBE7

```

7.9 Primer

Primer wurden mit dem Programm “Primer-BLAST” von NCBI konstruiert und mit dem “Oligonucleotide Properties Calculator” überprüft.

Die Synthese wurde von Eurofins MWG Biotech oder Sigma durchgeführt. Die Schmelztemperaturen (T_m) der Primer wurden aus deren Analyse entnommen.

7.9.1 Primer zur Herstellung von RNA-Sonden

Tab. 30: Primer zur Herstellung von RNA-Sonden

Oligo-Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	T _m [°C]
1424	MMP2ex2-116for	CCACAACAACCGCACCTACAT	59,8
1425	MMP2ex2-1244rev	TGGAAACAAGTAAAGCGGACC	57,9
1426	vvl-2596for	TTGGTGGCCATCTCAATCTGA	57,9
1427	vvl-2883for	GAGCAGCCCTAGAATCGTACA	59,8
1428	vvl-3638rev	GGGCATGGAAACATTTACCTT	55,9
1438	knot-76for	CCCAAATTCTCTACGGTGCAT	57,9
1439	knot-640rev-T7	GCGTAATACGACTCACTATAGGGTTGCTCTGGTCAACGACTGGC	>75
1522	e-461for	AGAGCAGCTACCGCCAGA	64,0
1523	e-926rev-T7	GCGTAATACGACTCACTATAGGGGCCACTGGAGCCGATTGA	83,0
1558	inv-for	GGAAGCTTACCTTGCCAGCACTCG	74,7
1559	inv-rev	CCGGATCCCAGCTGAGCAAGTGCATC	79,0
1585	en-for	GGCAAGTCGATGGAGAACCA	67,5
1586	en-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGGACAGGGATCCCAGAGCAGAT	80,7
1587	dlp-for	ACTGCCATATGCGGGTAGTG	64,8
1588	dlp-rev-T7	GCGTAATACGACTCACTATAGGGCGCAGCGTCATCTTTTCTGG	82,5
1591	CR42862-for	TGCAGAGGATCGTTTGACCC	67,5
1592	CR42862-rev-T7	GCGTAATACGACTCACTATAGGGACCTCCAGCCTACTTGTTC	79,6
1666	Csk-1061-for	AGCGGGTCTAATGTCTCCT	63,8
1667	Csk-1409-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGGCGTTTCAGTTTGACCTCGCAC	79,1
1723	disp685-for	AGAGCAGGGCTATGTGGAGA	63,9
1724	disp1167-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGGTGAGAGTACTCTCCGGGG	77,3

Oligo-Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]
1725	ttv740-for	GCCAAGGATGGTGGAGTTCA	67,4
1726	ttv1075-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG ACCGAGCACAAAGAGACAGG	77,7
1727	botv1995-for	ACCCTATCCGAGTCTGCTT	63,8
1728	botv2380-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG TATCCGGCCACCTTAGGTCA	77,7
1729	shf280-for	GCTGCCTGGTCAAGTGGTTA	65,2
1730	shf624-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG TGATCCACAACGAGATGCCG	79,8
1731	dally1337-for	CCAGAGCAACTTGGAGGAGG	66,2
1732	dally1729-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG TTGCAGTAGCCGTAGCACAA	76,9
1733	hh898-for	CTCTTCATGGACCGCAACCT	66,4
1734	hh1381-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG CTTGACCTTGTAGAGCGCA	78,7
1735	ihog1644-for	AAGCAGATTCAAGGAACCCCG	67,4
1736	ihog1986-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG AAACGGCTAGGATGCGGAAA	78,6
1737	boi472-for	AACCGGGACAGGGAGTATGA	65,5
1738	boi813-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG ATCCACCGTGGCCTTCAAAT	78,9
1739	Flo-2-558for	ACAAGGACCGCGACCAATTC	68,3
1740	Flo-2-861rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG TTGGCCTTCTGCAGCTTGTA	77,5
1819	ap261-for	AGCCGCCAAATTCTCCATCA	68,8
1820	ap383-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG CCGAAGGGTTCGTCTTGAA	80,0
1821	al1205-for	ATCTCCGATCTGCATTTCG	68,6
1822	al1390-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG AAGGCGATCCCAACCAGATG	79,4
1823	MESR3-562-for	TTTGGGCTCCGTTAGCGATT	67,6
1824	MESR3-911-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG TGAACACCAAACGCCAGTC	79,0
1825	nmo1387-for	GGTGGATGTATGGTCGGTGG	67,4
1826	nmo1657-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG ATCGAAGACGAGCATCTGGC	78,7
1827	sda1396-for	TCGAACGGGATGTGTCCAAG	68,4
1828	sda1664-rev-T7	AATACGACTCACTATAGGG CCCTGCAGTGTATCCGTTA	78,3
1896	MMP1-1116for	CCTCGAGGCACCAATCTGTT	66,4
1897	MMP1-1249rev-T7	GCGTAATACGACTCCTATAGGG TCGTCCAACCTGAAGACGGG	81,2

Anmerkung: Die T7-Promotorsequenz ist bei den entsprechenden Primern **fett** gedruckt.

7.9.2 Primer zur Herstellung von Enhancer-Reporter-Konstrukten

Tab. 31: Primer zur Herstellung von Enhancer-Reporter-Konstrukten

Oligo-Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]
1186	al-956for	AAACGAAGCCTCCGCTAATG	59,8
1187	al-6179rev	ATTAAGGTGACCCCAAACGA	55,9
1188	ap-929for	CTTTAATGAACACGGGATTTTC	54
1189	ap-4136rev	GTCTAAGTGTCAGCGGACTCA	59,8
1190	Awh-908for	GCATGTTCCACCCGTATTGCT	59,8
1191	Awh3754rev	GGTGAGTTTCAAACGGCAAAG	57,9
1192	B-H1-523for	GGCCGAAGTAGTAGATATGCT	57,9
1193	B-H1-5503rev	AGTACCGCTTGTCGAGTTTGC	59,8
1194	brk5517for	GGCATATGCGGATCTAATCTA	55,9
1195	brk7117rev	TTCTTTGTCCTGCCGTCTGAA	57,9
1198	Cad74A-4010for	CGAGCGTAATAATTCTTCGT	55,9
1199	Cad74A-5353rev	ATTTTATCGGACTCACAATGC	54
1202	crc-711for	GTAAAATTCAATCCGCTCGAA	54
1203	crc-2841rev	TTAAATAAGGCGATGCGTGAT	54
1206	dve-903for	GGCAACTTACCACCGCTACCC	63,7
1207	dve-3891rev	CGATTAATTGCCGCCCATTA	55,9
1208	Fz3-751for	AATGCCGATAAGTCCCTACAA	55,9
1209	Fz3-3213rev	CACCGGCTAATGTCTGGTATT	57,9
1216	rn-174for	ATAAACATTCAAGAGCGTGCCT	55,9
1217	rn-4422rev	GTGATGGCCGAGCACATGACC	63,7

Oligo-Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]
1220	Sox15-120f0r	ACTTGC GGCTTCCTCTTAATC	57,9
1221	Sox15-2887rev	GGAGATCGCCAAAGTGGTTAG	59,8
1224	tty-170for	ACAATTTGGCGTTTCGAGCAAG	57,9
1225	tty-911rev	TGAATTC CCGGAACCGAGCTA	59,8
1228	vvl-90for	CATTGGTAAGCCTGCGTGTGG	61,8
1229	vvl-5887rev	TTTGATTAGCGGAGCGTTAT	54
1232	wg407-for	CCAGAAAATGTAGCCGAGCAT	57,9
1233	wg-3960rev	TTTGGCATTCCGAACCGAGTT	57,9
1234	zfh1-38for	ATCAATTAGCCAAGTTAAGCC	54
1235	zfh1-2637rev	ATTTCTATAGGTTCCGGTCTCA	54
1341	tup413for	GAAAGCGAATTCGTCTAAAGA	54
1342	tup6159rev	TGCCATGGACACGATGTGATA	57,9
1390	midH15-512for	AATCATATGTCAGCACTCGGA	55,9
1391	midH15-4603rev	ACCCACACAGAGAGGCGGTAA	61,8
1392	nmo-222for	GGCGGATAGGTGGAGGTTAAG	61,8
1393	nmo-3397rev	GGGCGTGGATTTGATAGTCAC	59,8
1397	Cyp310a1-1494for	GTGGTCAGTTTGGGCGGTGTC	63,7
1387	Cyp310a1-4176rev	ATTCCATAGCCAGCGGTCACT	59,8
1412	ap1007for	GGCATTCTTCGCGGGACGGT	63,7
1413	ap2238rev	CTCGAGGCTCGGCTGATAAGG	63,7
1687	slouSK16-1for	CTGACACAAATATTGCTTGC	58,4
1688	slouSK16-725rev	AAATGTCAGTGCCACATCAT	60,5
1691	arc-664for	GGCCAAACGGTTGTATATCT	60,3
1692	arc-4199rev	GCGCAGACATTGGTCTAAAT	61,7
1693	CR42862-TBE578for	ACCGGTATACCATCTAATGC	57,9
1694	CR42862-TBE3552-rev	TTTAAGCGGCCTTATCTAGC	60
1697	nub-TBE2-1313for	TCTTAGGTAGCGAAATCGAA	59,1
1698	nub-TbE2-4599rev	GTTCAAATGGTGCGGATTGT	64,6
1904	lbl-for	GCAGCTGTGCAAGGGGATTA	67,3
1905	lbl-rev	CGCTCCGTCATAGGATCTTCA	66,3
1918	os-122for	TGGAGACTGATTCGCGGACA	69,4
1919	os-3156rev	ATTGGAATCGGGCGCATT	68,1
1920	inv499down-new	GAGGCGGAAAGGTTTGGTAGAA	67,1
1921	inv5791up-new	GCATGTTGGCAAGCGGAGATAA	70

7.9.3 Mutagenese-Primer

Tab. 32: Mutagenese-Primer

Oligo-Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]
1408	apTBEmut-for	GTTGAGCCCGGCTCTATTTAACTTTCTTTCTGAACCGAGTCG	73,3
1409	apTBEmut-rev	CGACTCGGTTTCGAAAGAAAGTTTAAATAGAGCCGGGCTCAAC	73,3
1410	alTBEmut-for	CACAGCAACAAGTCATTTTGAACCTTTGATCACGCTGCTGC	72,5
1411	alTBEmut-rev	GCAGCAGCGTGATCAAAGTTTCAAATGACTTGTTGCTGTG	72,5
1679	lbl-TBE1mut-for	CGCATAGTCAAATTAATTTACTTCAAGCTTTAATAAACGATTACACAAATACCC	75,8
1680	lbl-TBE1mut-rev	GGGTATTTGTGTAATCGTTTATTAAAGCTTGAAGTAAATTAATTTGACTATGCG	75,8
1681	lbl-TBE2mut-for	GCTGCTGTTGTGCCGATGAAGATCTTAAATGCTTTGTTGACATTGC	84,1
1682	lbl-TBE2mut-rev	GCAATGTCAACAAAGCATTTAAGATCTTCATCGGCACAACAGCAGC	84,1
1683	slouSK16TBE6-for	GTATGCCAACAAAGCCCTCGAAGATCTTAAAAAGCAAGTCAGAGAAAGAGG	82,1
1684	slouSK16TBE6-rev	CCTCTTTCTCTGACTTGCTTTTAAAGATCTTCGAGGGCTTTGTTGGCATAC	82,1

7.9.4 Sequenzierprimer

Tab. 33: Sequenzierprimer

Oligo-Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Zweck
/	GW1 (Invitrogen)	GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC	Insert pCR™8/GW/TOPO®
/	GW2 (Invitrogen)	GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA	Insert pCR™8/GW/TOPO®
1131	M13for (Invitrogen)	GTAAACGACGGCCAG	Insert TOPO® XL-Vektor
1033	BDFfor	AAATAGGGGTTCCGCGCACAT	Insert pGW-attB-lacZ
1374	pGWattBlacZ-1874	ACGTCTGCTCGGCTCGAACAT	Insert pGW-attB-lacZ

7.9.5 Primer für qPCR

Tab. 34: Primer für qPCR

Oligo-Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]
1292	da-for	GCTGCTGGTGGCTCAACGTC	63,5
1293	da-rev	GTGCATCGGCTCATCGTCAC	61,4
1294	salm-for	CACACCAAAGAGCGGCCATT	59,4
1295	salm-rev	ATTCGCGATCTTCGTTCCAC	57,3
1443	DII-for	CTCCTACTCCGGCTACCATC	62,6
1444	DIIrev	ACCAGATTTTCACCTGCGTTT	64,5
1445	hh-for	GAGATGGAATCCTGGAAGAGC	64,0
1446	hh-rev	GTGGGTTTTTGATTTGTGGTG	63,9
1447	omb-for	ACGGACTGGAGGTTCAACA	63,3
1448	omb-rev	ATGGTGCGAGTGTAGATGG	61,2
1449	rp49-for	TACAGGCCCAAGATCGTGAA	65,5
1450	rp49-rev	TCTCCTTGCCTTCTTGGA	66,2
1453	vg-for	CCAGGGACAGGCTCAATATCT	64,2
1454	vg-rev	TGCCATACAAGTCGTAACCT	63,4
1455	wg-for	GATTATTCGCGAGTCTGGTC	61,1
1456	wg-rev	CTATTATGCTTGCCTCCCTG	62,1
1459	al-for	GATCTCCCGATCTGCATTCG	66,9
1460	al-rev	TGAGCGGTTGGATGTTGTTG	67,1
1461	AP-50for	CCCGCAGGGTCAGGTTT	66,3
1462	AP-50rev	TCTTGTCGTTAATCCCGAAGTTG	65,9
1463	ap-for	CGAGTCCACAAGCGATAGCAA	67,4
1464	ap-rev	TTTTTCCACAGCGGAGAGGTA	65,7
1465	brn-for	CCTTGAAAGCGGGCATTTT	66,6
1466	brn-rev	TGCGAGGCTATCACCGAACT	67,0
1467	CCS-for	TTAGATTTGTGGATCCAGTGCTAGA	64,6
1468	CCS-rev	GCAATCCTTTCCCAGAGTTG	66,8
1469	CG18128-for	GGAGAAGGCACTCGAGATTGG	67,2
1470	CG18128-rev	GGCCACAGTGCCGAGAAT	66,5
1471	cg-for	GTTGGAGCCAGGCACATTAGA	66,2
1472	cg-rev	GTACGGGCGTTCCTTCTTGA	66,2
1473	coro-for	GGATGCGGATCCGATCAC	66,7
1474	coro-rev	GCCTTAGGCTTGTTCAGGATGT	66,6
1475	CR42862-for	CAAAAATAATCTGCACGTGTCTAAAT	64,0
1476	CR42862-rev	GGCGCGTGTCTCTTGGAT	66,6
1477	Dsp-1-for	CCCCAATGCTCCAAAACG	66,4
1478	Dsp-1-rev	TGTCGCCCCACTCCGAAC	67,2
1479	E2F2-for	ACGAGCTGACGGCCAAGATA	67,0
1480	E2F2-rev	AGCAGCGGCGGGTTTT	67,0
1481	Fz3-for	GCGGGACGCCTTCCA	67,7
1482	Fz3-rev	CACCAAGGCGAACAGTGTCA	67,5
1483	GalNac-T1-for	GTGCGGCGGCACCAT	68,9

Oligo-Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]
1484	GalNAc-T1-rev	ACCGTGTGTATCGCGATCGT	67,7
1485	inv-for	AGAACAAACGGGCCAAGCT	65,9
1486	inv-rev	AGCGGTATCGTCGAGTGGTT	65,8
1487	Mcm5-for	TCGCTGGCAAAGATTCGTT	65,8
1488	Mcm5-rev	CCAGTCATCGCAGCATCAAG	67,0
1489	miple-2-for	CAGCGAGGACATAGCCAACA	66,3
1490	miple-2-rev	ACCAAGCGCTCTTTGCGTAT	65,8
1491	mirr-for	ATCGCCCTGGCCATATCC	67,1
1492	mirr-rev	CCTTCTGGCCCCATTCAAAT	67,0
1493	msh-for	TGCCCCACGATCATCTTCATC	66,1
1494	msh-rev	ACGTAAATGCGCTAACATCACA	65,2
1495	Nca-for	CCCATATGGTGACGCTAGCA	65,9
1496	Nca-rev	TTAGTGCACACAAGAACTCTCTAAAGTCT	64,4
1497	omb1633-for	TTGTAAGTACTACGATCTGAACTCGAT	64,7
1498	omb1745-rev	GAAGACGTACGTGCGAAACG	65,6
1499	PNUTS-for	GGAGCCGCCAAGCTGATA	66,4
1500	PNUTS-rev	GACGTACGCTTGCGCTTCA	67,6
1501	RpS15Aa-for	TTGCCCTCGCGTCAGTTT	67,0
1502	RpS15Aa-rev	CGAGAATTTTGCTCCCAA	66,0
1503	sda-for	TTCCGAGAAGGAGGAGATACTGA	65,1
1504	sda-rev	TTAGTATGCCCCGATGTTGGATTG	66,4
1505	Sec23-for	TGATTCGTCTGTGCCAAAAGTT	65,6
1506	Sec23-rev	GTGGTACATGAATTGCGGGAATA	66,4
1507	sens1534-for	GGCCATATCCCTGCCAATATT	65,5
1508	sens1634-rev	GGTGCACTTGTGTGGCTTCTC	67,1
1509	vvl-for	GCCTTTGCCAAGCAGTTCAA	67,4
1510	vvl-rev	TGGGAGAACACATTGCCATAGA	66,4
1548	dap480for	CGAGTCGCTGGCAATGC	67,2
1549	dap580rev	GCTCCTTCATGAATTCTGTGATTTT	65,2
1552	ebony2211for	TGGCACAGCGTTGAACTTTG	67,3
1553	ebony2331rev	GGGCAGGTAGTTATCCCTGATG	65,4
1554	CycE1181for	CGCAATTCTCTGGCTTTGAGT	65,5
1555	CycE1318rev	AAGCCATCTCCCGACTAAATGTAT	64,5
1556	Kuz1472for	CGGCCTGTCGCAATTCC	68,0
1557	Kuz1610rev	AAATCTCTGTAGGTGAACACGTAAGC	64,4
1595	18w-for	TGAAGCGGCCAATAAGAACG	67,0
1596	18w-rev	CGAGTCCTTTTACGCCAGTG	64,6
1597	ac-for	GGGAGCAACACCTCCTAACA	64,0
1598	ac-rev	GTCGTCCTGCCAGAGTGATA	62,9
1599	Akap200-for	GGACAGCAAATTGAGGCCAG	66,9
1600	Akap200-rev	TGTCTCAGTCTCCGTTTCGG	65,4
1601	arc-for	TGCGGTGATTTTGGATTTGC	68,7
1602	arc-rev	TGGGTTAGTTTGTGATTCGCTT	64,4
1603	Atg5-for	CCCTGCGACTTCACTATCCA	65,1
1604	Atg5-rev	TAGCTCCTTGAGATTGAGCTT	62,0
1605	bib-for	CGCTCTCCTCGAAGTACGAT	63,4
1606	bib-rev	ACACAGATTGCGAGCGATTC	65,3
1607	boi-for	TCAGAATTCGAGCATGGTGC	66,3
1608	boi-rev	GGAGTCCAGAGTTTTGTGGC	63,7
1609	botv-for	TCCTAAGCGTGGAGCAAGAT	63,8
1610	botv-rev	CCTCGATGCGCATTTTCAGA	68,4
1611	Bx-for	GGCGCGTCCAGCTAAAATAA	65,9
1612	Bx-rev	CGAAGCCCGAGTAGAATTGC	65,8
1613	caps-for	CATGTGTTAGCGGGCGAATG	68,5

Oligo-Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]
1614	caps-rev	ACACGCTCACTGTCTTTTGG	63,0
1617	CG34380-for	CATCGTCCTGCACACAAACA	66,0
1618	CG34380-rev	ACCTCCGATGCTGAAGAACA	64,8
1619	cic-for	AGCACGTCCAGTCTTCTCG	63,3
1620	cic-rev	AGTGGCCTGAGATCTTGGTG	64,3
1621	dally-for	CGACCATCGTGGACAACCTC	65,6
1622	dally-rev	GAGTGTAAGTCCCCGAAACGA	64,0
1623	disp-for	AGTTAGTTCCGAACCCTGAGT	60,6
1624	disp-rev	CTTGGGACCAAGCCAAAGTC	65,7
1625	dlp-for	CGAATCCGGAGTTTACAGGC	65,6
1626	dlp-rev	GGCAGTTCTTCTTGTTCTGCT	63,4
1627	dpp-for	TACGGTGGTGCTGAAGAACT	62,3
1628	dpp-rev	TTGAGTGGATGGCGTGGTAT	65,3
1629	Flo-2-for	AAGAACGAACTTTTTCAGCGGAG	65,5
1630	Flo-2-rev	GACCCGTCGTGTGTATGTTG	64,0
1631	fz2-for	AGTTTTCGGGATTAACGGCG	66,8
1632	fz2-rev	AACGGCGTGGTCTAACATTT	63,2
1633	ihog-for	GTTCAAGTACCGCATGGTTGG	65,3
1634	ihog-rev	CGGAAACGATAGGTGTGCTG	65,5
1637	nub-for	AAATCCACACCAACCAGTGC	64,8
1638	nub-rev	TCATCGCAATCGGAAGCATT	67,7
1643	Pdp1-for	GGCCGAGTCAACATTTTCGT	66,1
1644	Pdp1-rev	ACGAATTGCTTGCGTGACTT	64,7
1645	pk-for	GAACGGGAGTCCAGAAATCG	65,8
1646	pk-rev	ATTGATGCACATTTCCCGGC	69,0
1647	qsm-for	GATGAGGACTCTGCACCTGT	62,0
1648	qsm-rev	ACTGTGCAGCCCTTGAAGAT	63,8
1651	sc-for	AGGCACCTACGAAGGAGTTC	62,2
1652	sc-rev	GTGCAGTCCTCCTCGTCTAA	62,1
1653	shf-for	AGTGCGAAGGTGGTATTTGC	63,9
1654	shf-rev	AGGGGATCACACACTTGGAG	64,0
1657	vn-for	TATTGTAGGTGCCCAACCGA	65,1
1658	vn-rev	TGGCCGTAGATTGCAACAAA	66,3
1659	y-for	CCGCCAATTCAAGCAATGTA	67,8
1660	y-rev	GGGGACCACTTGTCTCGTAA	63,9
1701	Csk1-2qPCR-99for	GCAGCTCATCATCGCGTGTG	70,6
1702	Csk1-2qPCR-381rev	GTCACCATGTTCCCGCATTG	68,6
1707	rasp-qPCR-327for	TGGGATTTCATCGGCGTCTGT	70,1
1708	rasp-qPCR-512rev	GTGTAACCAACGCGATCTGT	62,6
1709	shg-qPCR-1144for	ACGAGCCGATCCACGAGAAG	68,9
1710	shg-qPCR-1330rev	GTCAGTGGCGCTGATAGTCA	64,2
1711	cbt353-for	GCATTCAAGGCAGCGGAAAA	69,3
1712	cbt474-rev	CGTGATCGCATGGCTGTGT	68,7
1713	nmo2065-for	TGTCCTCGAGAACCAGTCCA	68,2
1714	nmo2181-rev	GCCGGCAGATTGCGTATAGT	66,1
1715	nmo1853-for	ATCCGTGCAGCAGGTCAAAG	67,6
1716	nmo1963-rev	TCATTGGCTGGCGAAACTCT	67,0
1717	ttv2343-for	CCGTTCTGTCGCTGGATGAA	68,6
1718	ttv2486-rev	AACCCAGGCATTCTTGGA	67,6
1719	org-1-1001for	CGAAGAACGCCTCCTTGAT	67,5
1720	org-1-1113rev	CTGTGTCACCCGCTGATTCT	65,4

8. Lebenslauf

9. Versicherung

für das Gesuch um Zulassung zur Promotion in den Fachbereichen 17-22 der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Hiermit versichere ich gemäß § 11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 22.12.2003:

- Ich habe die heute als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.
- Ich habe oder hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.
- Ich hatte weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile einer Abhandlung bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, den 25.07.2017

(Inka Hoffmann)

10. Danksagung

11. Literaturverzeichnis

Barolo, S., Carver, L.A., Posakony, J.W., 2000. GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*. *Biotechniques* 29, 726, 728, 730, 732.

Basler, K., Struhl, G., 1994. Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* 368, 208-214.

Beaucher, M., Hersperger, E., Page-McCaw, A., Shearn, A., 2007. Metastatic ability of *Drosophila* tumors depends on MMP activity. *Developmental biology* 303, 625-634.

Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57, 289-300.

Binbas, H., 2009. Identifizierung potentieller Tbx-Zielgene im *Drosophila*-Genom unter Einsatz bioinformatischer und molekulargenetischer Methoden., Diplomarbeit. Johannes Gutenberg Universität, Mainz.

Boogerd, K.J., Wong, L.Y., Christoffels, V.M., Klarenbeek, M., Ruijter, J.M., Moorman, A.F., Barnett, P., 2008. Msx1 and Msx2 are functional interacting partners of T-box factors in the regulation of Connexin43. *Cardiovascular research* 78, 485-493.

Brand, A.H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

Brower, D.L., 1986. Engrailed gene expression in *Drosophila* imaginal discs. *The EMBO journal* 5, 2649-2656.

Buescher, M., Tio, M., Tear, G., Overton, P.M., Brook, W.J., Chia, W., 2006. Functions of the segment polarity genes midline and H15 in *Drosophila melanogaster* neurogenesis. *Developmental biology* 292, 418-429.

Camp, D., Haitian He, B., Li, S., Althaus, I.W., Holtz, A.M., Allen, B.L., Charron, F., van Meyel, D.J., 2014. Ihog and Boi elicit Hh signaling via Ptc but do not aid Ptc in sequestering the Hh ligand. *Development* 141, 3879-3888.

Campbell, G., Tomlinson, A., 1998. The roles of the homeobox genes *aristaless* and *Distal-less* in patterning the legs and wings of *Drosophila*. *Development* 125, 4483-4493.

Campbell, G., Weaver, T., Tomlinson, A., 1993. Axis specification in the developing *Drosophila* appendage: the role of wingless, decapentaplegic, and the homeobox gene *aristaless*. *Cell* 74, 1113-1123.

Capdevila, J., Guerrero, I., 1994. Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *The EMBO journal* 13, 4459-4468.

Carreira, S., Dexter, T.J., Yavuzer, U., Easty, D.J., Goding, C.R., 1998. Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *Molecular and cellular biology* 18, 5099-5108.

Casey, E.S., O'Reilly, M.A., Conlon, F.L., Smith, J.C., 1998. The T-box transcription factor Brachyury regulates expression of eFGF through binding to a non-palindromic response element. *Development* 125, 3887-3894.

- Castellanos, R., Xie, Q., Zheng, D., Cvekl, A., Morrow, B.E.,** 2014. Mammalian TBX1 preferentially binds and regulates downstream targets via a tandem T-site repeat. *PLoS one* 9, e95151.
- Chen, M.H., Wilson, C.W., Chuang, P.T.,** 2007. SnapShot: hedgehog signaling pathway. *Cell* 130, 386.
- Cohen, B., McGuffin, M.E., Pfeifle, C., Segal, D., Cohen, S.M.,** 1992. apterous, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes & development* 6, 715-729.
- D'Angelo, G., Matusek, T., Pizette, S., Therond, P.P.,** 2015. Endocytosis of Hedgehog through dispatched regulates long-range signaling. *Developmental cell* 32, 290-303.
- Das, S., Chen, Q.B., Saucier, J.D., Drescher, B., Zong, Y., Morgan, S., Forstall, J., Meriwether, A., Toranzo, R., Leal, S.M.,** 2013. The *Drosophila* T-box transcription factor Midline functions within the Notch-Delta signaling pathway to specify sensory organ precursor cell fates and regulates cell survival within the eye imaginal disc. *Mechanisms of development* 130, 577-601.
- del Alamo Rodriguez, D., Terriente Felix, J., Diaz-Benjumea, F.J.,** 2004. The role of the T-box gene optomotor-blind in patterning the *Drosophila* wing. *Developmental biology* 268, 481-492.
- DeSalvo, M.K., Hindle, S.J., Rusan, Z.M., Orng, S., Eddison, M., Halliwill, K., Bainton, R.J.,** 2014. The *Drosophila* surface glia transcriptome: evolutionary conserved blood-brain barrier processes. *Front Neurosci* 8, 346.
- Diaz-Benjumea, F.J., Cohen, S.M.,** 1993. Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* 75, 741-752.
- Diez del Corral, R., Aroca, P., JL, G.m.-S., Cavodeassi, F., Modolell, J.,** 1999. The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes & development* 13, 1754-1761.
- Dominguez, M., Brunner, M., Hafen, E., Basler, K.,** 1996. Sending and receiving the hedgehog signal: control by the *Drosophila* Gli protein Cubitus interruptus. *Science* 272, 1621-1625.
- Elliott, D.A., Brand, A.H.,** 2008. The GAL4 system : a versatile system for the expression of genes. *Methods Mol Biol* 420, 79-95.
- Fu, C.L., Wang, X.F., Cheng, Q., Wang, D., Hirose, S., Liu, Q.X.,** 2016. The T-box transcription factor Midline regulates wing development by repressing wingless and hedgehog in *Drosophila*. *Sci Rep* 6, 27981.
- Gadomsky, C.,** 2011. Suche nach Zielgenen des T-Box Transkriptionsfaktors Optomotor-blind aus *Drosophila melanogaster*., Doktorarbeit. Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Gallet, A., Staccini-Lavenant, L., Therond, P.P.,** 2008. Cellular trafficking of the glypican Dally-like is required for full-strength Hedgehog signaling and wingless transcytosis. *Developmental cell* 14, 712-725.
- Gorfinkel, N., Sierra, J., Callejo, A., Ibanez, C., Guerrero, I.,** 2005. The *Drosophila* ortholog of the human Wnt inhibitor factor Shifted controls the diffusion of lipid-modified Hedgehog. *Developmental cell* 8, 241-253.

- Grimm, S., Pflugfelder, G.O.**, 1996. Control of the gene *optomotor-blind* in *Drosophila* wing development by *decapentaplegic* and *wingless*. *Science* 271, 1601-1604.
- Guha, A., Lin, L., Kornberg, T.B.**, 2009. Regulation of *Drosophila* matrix metalloprotease *Mmp2* is essential for wing imaginal disc:trachea association and air sac tubulogenesis. *Developmental biology* 335, 317-326.
- Han, C., Belenkaya, T.Y., Wang, B., Lin, X.**, 2004. *Drosophila* glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process. *Development* 131, 601-611.
- Hartl, T.A., Scott, M.P.**, 2014. Wing tips: The wing disc as a platform for studying Hedgehog signaling. *Methods* 68, 199-206.
- Heisenberg, M.**, 1972. Behavioral diagnostics, a way to analyze visual mutants of *Drosophila*, in: Wehner, R. (Ed.), *Information procession in the visual system of Arthropods*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 265-268.
- Hoffmann, I.**, 2011. Untersuchung potentieller Zielgene von *Optomotor-blind* bei *Drosophila melanogaster*., Diplomarbeit. Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Isshiki, T., Takeichi, M., Nose, A.**, 1997. The role of the *msh* homeobox gene during *Drosophila* neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm. *Development* 124, 3099-3109.
- Izumikawa, T., Egusa, N., Taniguchi, F., Sugahara, K., Kitagawa, H.**, 2006. Heparan sulfate polymerization in *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry* 281, 1929-1934.
- Jafar-Nejad, H., Tien, A.C., Acar, M., Bellen, H.J.**, 2006. *Senseless* and *Daughterless* confer neuronal identity to epithelial cells in the *Drosophila* wing margin. *Development* 133, 1683-1692.
- Katanaev, V.L., Solis, G.P., Hausmann, G., Buestorf, S., Katanayeva, N., Schrock, Y., Stuermer, C.A., Basler, K.**, 2008. *Reggie-1/flotillin-2* promotes secretion of the long-range signalling forms of *Wingless* and *Hedgehog* in *Drosophila*. *The EMBO journal* 27, 509-521.
- Kispert, A., Hermann, B.G.**, 1993. The *Brachyury* gene encodes a novel DNA binding protein. *The EMBO journal* 12, 4898-4899.
- Kispert, A., Herrmann, B.G.**, 1993. The *Brachyury* gene encodes a novel DNA binding protein. *The EMBO journal* 12, 3211-3220.
- Klebes, A., Sustar, A., Kechris, K., Li, H., Schubiger, G., Kornberg, T.B.**, 2005. Regulation of cellular plasticity in *Drosophila* imaginal disc cells by the Polycomb group, trithorax group and *lama* genes. *Development* 132, 3753-3765.
- Lee, H.H., Norris, A., Weiss, J.B., Frasch, M.**, 2003. Jelly belly protein activates the receptor tyrosine kinase *Alk* to specify visceral muscle pioneers. *Nature* 425, 507-512.
- Lin, X.**, 2004. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131, 6009-6021.
- Liu, S., Sun, J., Wang, D., Pflugfelder, G.O., Shen, J.**, 2016. Fold formation at the compartment boundary of *Drosophila* wing requires *Yki* signaling to suppress JNK dependent apoptosis. *Sci Rep* 6, 38003.

- Llano, E., Adam, G., Pendas, A.M., Quesada, V., Sanchez, L.M., Santamaria, I., Noselli, S., Lopez-Otin, C.,** 2002. Structural and enzymatic characterization of *Drosophila* Dm2-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase with tissue-specific expression. *The Journal of biological chemistry* 277, 23321-23329.
- Micchelli, C.A., Blair, S.S.,** 1999. Dorsoventral lineage restriction in wing imaginal discs requires Notch. *Nature* 401, 473-476.
- Milan, M., Weihe, U., Tiong, S., Bender, W., Cohen, S.M.,** 2001. *msh* specifies dorsal cell fate in the *Drosophila* wing. *Development* 128, 3263-3268.
- Minguillon, C., Logan, M.,** 2003. The comparative genomics of T-box genes. *Briefings in functional genomics & proteomics* 2, 224-233.
- Miskolczi-McCallum, C.M., Scavetta, R.J., Svendsen, P.C., Soanes, K.H., Brook, W.J.,** 2005. The *Drosophila melanogaster* T-box genes *midline* and *H15* are conserved regulators of heart development. *Developmental biology* 278, 459-472.
- Neumann, C.J., Cohen, S.M.,** 1996. Distinct mitogenic and cell fate specification functions of *wingless* in different regions of the wing. *Development* 122, 1781-1789.
- Nitta, K.R., Jolma, A., Yin, Y., Morgunova, E., Kivioja, T., Akhtar, J., Hens, K., Toivonen, J., Deplancke, B., Furlong, E.E., Taipale, J.,** 2015. Conservation of transcription factor binding specificities across 600 million years of bilateria evolution. *Elife* 4.
- North, G., French, V.,** 1994. Insect wings. Patterns upon patterns. *Current biology : CB* 4, 611-614.
- Nose, A., Isshiki, T., Takeichi, M.,** 1998. Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the *msh* homeobox gene. *Development* 125, 215-223.
- Ouimette, J.F., Jolin, M.L., L'Honore, A., Gifuni, A., Drouin, J.,** 2010. Divergent transcriptional activities determine limb identity. *Nature communications* 1, 35.
- Packham, E.A., Brook, J.D.,** 2003. T-box genes in human disorders. *Human molecular genetics* 12 Spec No 1, R37-44.
- Page-McCaw, A., Serano, J., Sante, J.M., Rubin, G.M.,** 2003. *Drosophila* matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Developmental cell* 4, 95-106.
- Papaioannou, V.E., Silver, L.M.,** 1998. The T-box gene family. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 20, 9-19.
- Pawitan, Y., Michiels, S., Koscielny, S., Gusnanto, A., Ploner, A.,** 2005. False discovery rate, sensitivity and sample size for microarray studies. *Bioinformatics* 21, 3017-3024.
- Pflugfelder, G.O.,** 2009. *omb* and circumstance. *Journal of neurogenetics* 23, 15-33.
- Pflugfelder, G.O., Eichinger, F., Shen, J.,** 2017. T-Box Genes in *Drosophila* Limb Development. *Curr Top Dev Biol* 122, 313-354.
- Pflugfelder, G.O., Heisenberg, M.,** 1995. Optomotor-blind of *Drosophila melanogaster*: a neurogenetic approach to optic lobe development and optomotor behaviour. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology* 110, 185-202.

- Pflugfelder, G.O., Roth, H., Poeck, B., 1992a.** A homology domain shared between *Drosophila* optomotor-blind and mouse Brachyury is involved in DNA binding. *Biochemical and biophysical research communications* 186, 918-925.
- Pflugfelder, G.O., Roth, H., Poeck, B., Kerscher, S., Schwarz, H., Jonschker, B., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1199-1203.
- Pflugfelder, G.O., Schwarz, H., Roth, H., Poeck, B., Sigl, A., Kerscher, S., Jonschker, B., Pak, W.L., Heisenberg, M., 1990.** Genetic and molecular characterization of the optomotor-blind gene locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 126, 91-104.
- Phelps, C.B., Brand, A.H., 1998.** Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* 14, 367-379.
- Philippakis, A.A., Busser, B.W., Gisselbrecht, S.S., He, F.S., Estrada, B., Michelson, A.M., Bulyk, M.L., 2006.** Expression-guided in silico evaluation of candidate cis regulatory codes for *Drosophila* muscle founder cells. *PLoS Comput Biol* 2, e53.
- Poeck, B., Balles, J., Pflugfelder, G.O., 1993a.** Transcript identification in the optomotor-blind locus of *Drosophila melanogaster* by intragenic recombination mapping and PCR-aided sequence analysis of lethal point mutations. *Molecular & general genetics : MGG* 238, 325-332.
- Poeck, B., Hofbauer, A., Pflugfelder, G.O., 1993b.** Expression of the *Drosophila* optomotor-blind gene transcript in neuronal and glial cells of the developing nervous system. *Development* 117, 1017-1029.
- Porsch, M., Hofmeyer, K., Bausenwein, B.S., Grimm, S., Weber, B.H., Miassod, R., Pflugfelder, G.O., 1998.** Isolation of a *Drosophila* T-box gene closely related to human TBX1. *Gene* 212, 237-248.
- Porsch, M., Sauer, M., Schulze, S., Bahlo, A., Roth, M., 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. *Mechanisms of development* 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., 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.
- Rodriguez, M., Aladowicz, E., Lanfrancone, L., Goding, C.R., 2008.** Tbx3 represses E-cadherin expression and enhances melanoma invasiveness. *Cancer Res* 68, 7872-7881.
- Rowley, M., Grothey, E., Couch, F.J., 2004.** The role of Tbx2 and Tbx3 in mammary development and tumorigenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 9, 109-118.
- Schaub, C., Nagaso, H., Jin, H., Frasch, M., 2012.** Org-1, the *Drosophila* ortholog of Tbx1, is a direct activator of known identity genes during muscle specification. *Development* 139, 1001-1012.
- Schilling, S., Steiner, S., Zimmerli, D., Basler, K., 2014.** A regulatory receptor network directs the range and output of the Wingless signal. *Development* 141, 2483-2493.

- Sen, A., Gadomski, C., Balles, J., Abassi, Y., Dorner, C., Pflugfelder, G.O., 2010.** Null mutations in *Drosophila* Optomotor-blind affect T-domain residues conserved in all Tbx proteins. *Mol Genet Genomics* 283, 147-156.
- Shen, J., Dahmann, C., 2005.** The role of Dpp signaling in maintaining the *Drosophila* anteroposterior compartment boundary. *Dev Biol* 279, 31-43.
- Shen, J., Dahmann, C., Pflugfelder, G.O., 2010.** Spatial discontinuity of optomotor-blind expression in the *Drosophila* wing imaginal disc disrupts epithelial architecture and promotes cell sorting. *BMC Dev Biol* 10, 23.
- Shen, J., Dorner, C., Bahlo, A., Pflugfelder, G.O., 2008.** optomotor-blind suppresses instability at the A/P compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Mechanisms of development* 125, 233-246.
- Singh, A., Tare, M., Kango-Singh, M., Son, W.S., Cho, K.O., Choi, K.W., 2011.** Opposing interactions between homothorax and Lobe define the ventral eye margin of *Drosophila* eye. *Developmental biology* 359, 199-208.
- Sivasankaran, R., Calleja, M., Morata, G., Basler, K., 2000.** The Wingless target gene Dfz3 encodes a new member of the *Drosophila* Frizzled family. *Mechanisms of development* 91, 427-431.
- Skeath, J.B., 1999.** At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 21, 922-931.
- Svendsen, P.C., Formaz-Preston, A., Leal, S.M., Brook, W.J., 2009.** The Tbx20 homologs midline and H15 specify ventral fate in the *Drosophila melanogaster* leg. *Development* 136, 2689-2693.
- Tabata, T., Kornberg, T.B., 1994.** Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 76, 89-102.
- Toedling, J., Skylar, O., Krueger, T., Fischer, J.J., Sperling, S., Huber, W., 2007.** Ringo-an R/Bioconductor package for analyzing ChIP-chip readouts. *BMC bioinformatics* 8, 221.
- Tsai, Y.C., Grimm, S., Chao, J.L., Wang, S.C., Hofmeyer, K., Shen, J., Eichinger, F., Michalopoulou, T., Yao, C.K., Chang, C.H., Lin, S.H., Sun, Y.H., Pflugfelder, G.O., 2015.** Optomotor-blind negatively regulates *Drosophila* eye development by blocking Jak/STAT signaling. *PloS one* 10, e0120236.
- Umemori, M., Takemura, M., Maeda, K., Ohba, K., Adachi-Yamada, T., 2007.** *Drosophila* T-box transcription factor Optomotor-blind prevents pathological folding and local overgrowth in wing epithelium through confining Hh signal. *Developmental biology* 308, 68-81.
- Vance, K.W., Carreira, S., Brosch, G., Goding, C.R., 2005.** Tbx2 is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. *Cancer research* 65, 2260-2268.
- Villa-Cuesta, E., 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.
- Wang, D., Li, L., Lu, J., Liu, S., Shen, J., 2016.** Complementary expression of optomotor-blind and the Iroquois complex promotes fold formation to separate wing notum and hinge territories. *Developmental biology* 416, 225-234.

- Wang, H., Chen, X., He, T., Zhou, Y., Luo, H., 2013.** Evidence for tissue-specific Jak/STAT target genes in *Drosophila* optic lobe development. *Genetics* 195, 1291-1306.
- Wang, S.H., Simcox, A., Campbell, G., 2000.** Dual role for *Drosophila* epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes & development* 14, 2271-2276.
- Widmann, T.J., Dahmann, C., 2009.** Wingless signaling and the control of cell shape in *Drosophila* wing imaginal discs. *Developmental biology* 334, 161-173.
- Wilson, C.W., Chuang, P.T., 2006.** New "hogs" in Hedgehog transport and signal reception. *Cell* 125, 435-438.
- Wittkopp, P.J., True, J.R., Carroll, S.B., 2002.** Reciprocal functions of the *Drosophila* yellow and ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development* 129, 1849-1858.
- Wolfgang, W.J., Roberts, I.J., Quan, F., O'Kane, C., Forte, M., 1996.** Activation of protein kinase A-independent pathways by Gs alpha in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14542-14547.
- Zecca, M., Basler, K., Struhl, G., 1996.** Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* 87, 833-844.
- Zecca, M., Struhl, G., 2010.** A feed-forward circuit linking wingless, fat-dachsous signaling, and the warts-hippo pathway to *Drosophila* wing growth. *PLoS biology* 8, e1000386.
- Zeng, Y.A., Verheyen, E.M., 2004.** Nemo is an inducible antagonist of Wingless signaling during *Drosophila* wing development. *Development* 131, 2911-2920.