

**Konservierte und nicht-konservierte Funktionen der Lef/Tcf  
Transkriptionsfaktoren**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) -Universitätsbereich

genehmigte  
DISSERTATION

von  
Susanne Klingel  
aus  
Pforzheim

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: PD Dr. Dietmar Gradl

Koreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2012



Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der Zeit von März 2009 bis Februar 2012 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich meine Doktorarbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.

Susanne Klingel, Februar 2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
1.1 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg	2
1.2 Evolutionäre Aspekte des Wnt-Signalwegs	3
1.3 Die Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren	4
1.3.1 Evolutionäre Betrachtung der Lef/Tcfs	4
1.3.2 Die Struktur der Lef/Tcfs	7
1.3.3 Diversität der Lef/Tcfs in der Ausbildung der endogenen Körperachse	10
1.4 Modifikationen der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren	11
1.5 Subtypspezifische und redundante Funktionen der vertebraten Lef/Tcfs	14
1.6 Die invertebraten Tcfs der Spezies <i>Hydra magnipapillata</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> und <i>Caenorhabditis elegans</i>	16
1.6.1 Tcf im Süßwasserpolyphen <i>Hydra magnipapillata</i>	16
1.6.2 Das <i>Drosophila melanogaster</i> Tcf Pangolin	17
1.6.3 Der Wnt-Signalweg in <i>C.elegans</i> und die Rolle des Tcfs Pop-1	19
<b>2. ZIELSETZUNG</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAL</b>	<b>23</b>
<b>4. METHODEN</b>	<b>37</b>
4.1 Entwicklungsbiologische Methoden	37
4.1.1 Haltung von <i>Xenopus laevis</i>	37
4.1.2 Eiablage	37
4.1.3 Testisextarktion	38
4.1.4 <i>In vitro</i> Fertilisation	38
4.1.5 Entfernen der Gallerthülle	38
4.1.6 Anfärben von unpigmentierten Eiern	38
4.1.7 Mikroinjektion	39
4.1.8 Gen-Suppression durch antisense Morpholino Oligonukleotide	40
4.1.9 Embryonenpflege und Fixierung	41
4.1.10 Ganzkeimfärbung oder <i>in situ</i> Hybridisierung	41

<b>4.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden</b>	<b>42</b>
4.2.1 Fällung und Reinigung von DNA/RNA	42
4.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	43
4.2.3 DNA-Restriktionsanalyse	43
4.2.4 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese	44
4.2.5 Präparative Flachbett-Gelelektrophorese	45
4.2.6 Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende	45
4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten	45
4.2.8 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	46
4.2.9 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien	46
4.2.10 Blau-Weiß-Selektion	47
4.2.11 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Kleinmaßstab nach Birnboim und Doly	47
4.2.12 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab	48
4.2.13 <i>In vitro</i> Transkription von <i>sense</i> und <i>antisense</i> RNA	49
4.2.14 PCR zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente	50
4.2.15 DNA-Sequenzanalyse	52
<b>4.3 Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>52</b>
4.3.1 Proteinextraktion aus <i>Xenopus laevis</i> Embryonen	52
4.3.2 Immobilisierung von GST-Fusionsproteinen an Sepharosekugeln	53
4.3.3 GST-Pulldown Assay	53
4.3.4 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	53
4.3.5 Coomassie Blau Färbung von Polyacrylamidgelen	55
4.3.6 Proteinanalyse mittels Western Blot	55
<b>4.4 Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>57</b>
4.4.1 Fliegenfutter und -haltung	57
4.4.2 Geschlechtsbestimmung	57
4.4.3 Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	58
4.4.4 Allgemeine Nomenklatur	58
4.4.5 Auslesen virgineller Weibchen	59
4.4.6 Ansetzen von Kreuzungen	59
4.4.7 Balancer- Chromosom	60
4.4.8 Erzeugung transgener Tiere	61
4.4.9 Etablierung transgener Stämme	61
4.4.10 Gewebespezifische Überexpression	62
4.4.11 Präparation von Flügeln	63
4.4.12 Immunfärbung an Imaginalscheiben	63
<b>4.5 Zellbiologische Methoden</b>	<b>64</b>
4.5.1 Kultivieren und Passagieren von HEK293 Zellen	64
4.5.2 Transfektion unter Verwendung der Calciumphosphatmethode	64
4.5.3 Ernten von Gewebekulturzellen	65

<b>5. ERGEBNISSE</b>	<b>66</b>
5.1 Herstellung und Verifizierung der Werkzeuge zur funktionalen Analyse in Vertebraten	66
5.2 Aktivität der invertebraten Tcfs in Achseninduktionsexperimenten in <i>Xenopus</i> Embryonen	67
5.2.1 Die invertebraten Tcfs im <i>Xenopus</i> Achsenduplikationsexperiment	67
5.2.2 Einfluss der invertebraten Tcfs auf den Aktivator XTcf-1 im <i>Xenopus</i> Achsenduplikationsexperiment	68
5.2.3 Auswirkungen der dorsal überexprimierten invertebraten Tcfs auf die dorsale Achsenformierung	69
5.2.4 Einfluss der invertebraten Tcfs auf den Repressor XTcf-3 im Hinblick auf den dorsoanterioren Index (DAI)	71
5.3 Überprüfung der Spezifität im Wiederherstellungsexperiment	72
5.3.1 Das <i>Drosophila</i> Tcf Pangolin kann die XTcf-4 Expression in XTcf-1- depletierten Embryonen wiederherstellen	72
5.3.2 Die invertebraten Tcfs Pangolin und HyTcf können XTcf-4 ersetzen	74
5.3.3 Die invertebraten Tcfs Pangolin und Pop-1 können XTcf-3 im Wiederherstellungsexperiment ersetzen	75
5.4 Einfluss des C-Terminus von XTcf-1	77
5.5 Relevanz der C-Termini von XTcf-1 und XTcf-3 im Hinblick auf deren spezifische Funktionen	78
5.6 Austausch der Domänen von XTcf-1 und HyTcf	82
5.7 Herstellung der Werkzeuge zur funktionalen Analyse der XTcfs in <i>Drosophila</i>	86
5.8 Analyse der <i>Xenopus</i> Tcfs in Überexpressionsexperimenten	88
5.9 Überprüfung der Venenphänotypen in Überexpressionsstudien	94
5.10 Einfluss der <i>Xenopus</i> Tcfs auf das Wingless Zielgen <i>distalless</i>	97
<b>6. DISKUSSION</b>	<b>100</b>
6.1 Einfluss der invertebraten Tcfs auf die endogene Körperachse: Aktivatoren oder Repressoren?	101
6.2 Die funktionale Analyse der invertebraten Tcfs ermöglicht deren neue Einteilung in den Stammbaum	104
6.3 Die CRD und der C-Terminus ermöglichen die subtypspezifische Funktionen der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren	108
6.4 Doppelachseninduktion erfordert das komplette XTcf-1 Protein	111

6.5 Die funktionale Diversität der <i>Xenopus</i> Tcfs zeigt sich auch in <i>Drosophila melanogaster</i>	112
6.5.1 Diversität der distinkten <i>Xenopus</i> Tcfs in der Venenentwicklung	113
6.5.2 Distinkte Auswirkungen der <i>Xenopus</i> Tcfs auf die Distalless Expression	115
6.6 Fazit und Ausblick	116
<b>7. LITERATUR</b>	<b>119</b>
<b>8. ANHANG</b>	<b>144</b>
Liste der verwendeten Abkürzungen	144
Anlagerung der Lef/Tcf Sequenzen	146
Danksagung	154
Publikationen	155
Lebenslauf	157

## Zusammenfassung

Die Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf Familie sind die nukleären Mediatoren des Wnt-Signalwegs. In allen bisher untersuchten Invertebraten liegt nur ein Ortholog dieses Transkriptionsfaktors vor, welches als Aktivator und als Repressor Wnt-abhängiger Zielgenregulation wirkt. Dagegen sind in Vertebraten vier distinkte Vertreter der Lef/Tcfs zu finden, Lef-1, Tcf-1, Tcf-3 und Tcf-4. Die Schwestergruppe Tcf-1/Lef-1 wirkt eher als Aktivator, die Schwestergruppe Tcf-3/Tcf-4 dagegen eher als Repressor.

Jedoch unterstreichen Überexpressionsstudien in *Drosophila melanogaster*, dass diese Aktivator-/Repressoreigenschaften in erster Linie Kontext-abhängig sind. Die Überexpression von XTcf-1 und XLeF-1 führte zu Phänotypen, ähnlich der Pangolin Überexpression, wobei diese Phänotypen einerseits auf Repression von Wingless-Zielgenen (Verlust von Flügelvenen), andererseits auf Aktivierung von Wingless-Zielgenen (Distalless Expression) zurückzuführen sind.

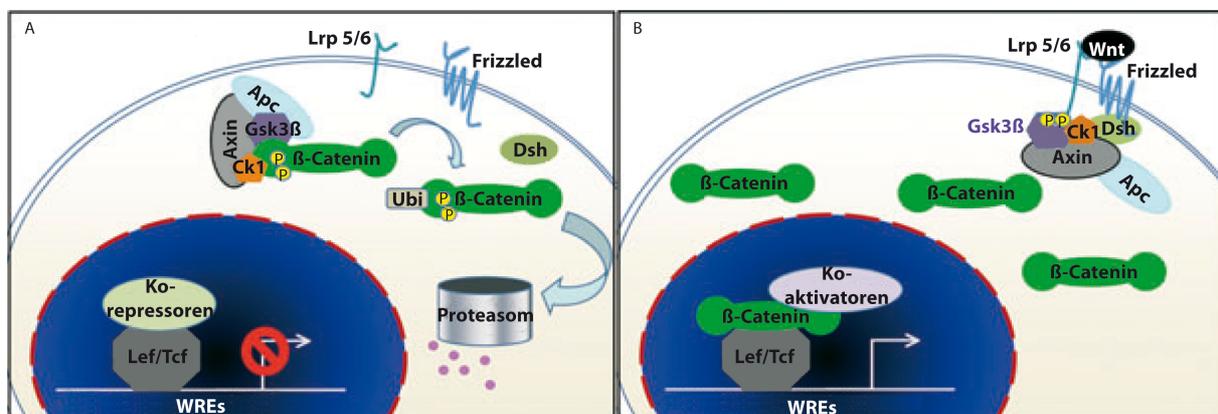
Anhand nicht-redundanter Funktionen der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren in der Gehirnentwicklung von *Xenopus laevis* wurde untersucht, inwieweit invertebraten Tcfs ihre vertebraten Homologe ersetzen können. Tatsächlich konnte Pangolin aus *Drosophila melanogaster* XTcf-1, XTcf-3 und XTcf-4 ersetzen, HyTcf aus *Hydra magnipapillata* dagegen nur XTcf-4, Pop-1 aus *Caenorhabditis elegans* nur XTcf-3. Diese erstaunlich große Spezifität der invertebraten Tcfs lässt den Rückschluss zu, dass das Tcf des gemeinsamen Vorfahren bereits alle regulatorischen Elemente enthielt, die später für die Gehirnentwicklung benutzt wurden, und dass die vertebraten Tcfs ihre distinkten Funktionen über Subfunktionalisierung erhielten. Diese Annahme konnte auch durch Überexpressionsexperimente der vertebraten Lef/Tcfs in *Drosophila* untermauert werden.

Durch Verwendung chimärer Konstrukte, bestehend aus XTcf-1 und XTcf-3 sowie aus XTcf-1 und HyTcf, konnte gezeigt werden, dass die wenig konservierte Kontext-abhängige regulatorische Domäne CRD oder der C-Terminus des XTcf-3 für dessen spezifische Funktion der XCirp Regulation ausreicht, vermutlich weil beide Domänen Korepressoren rekrutieren. Auch bei XTcf-1 ist die CRD die relevante Domäne für die Tcf-subtypspezifische Funktion der XTcf-4 Regulation.

# 1. Einleitung

## 1.1 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

Der Wnt-Signalweg (Wingless/Int-1) ist einer der evolutionär hoch konservierten Signalwege im Tierreich. Er spielt eine Schlüsselrolle während der frühen Embryonalentwicklung und der Krebsentstehung (Logan und Nusse, 2004; Reya und Clevers 2005; Minde et al., 2011). In *Drosophila* und Vertebraten unterscheidet man den kanonischen,  $\beta$ -Catenin-abhängigen von nicht kanonischen,  $\beta$ -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalwegen (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>).



**Abbildung 1.1: Vereinfachte Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs.** A: In Abwesenheit des Wnt-Liganden wird  $\beta$ -Catenin durch den Destraktionskomplex phosphoryliert. Dieser besteht unter anderem aus Apc, Axin, Ck-1 und Gsk-3 $\beta$ . Diese Phosphorylierung resultiert in der Ubiquitinierung und der proteosomalen Degradation von  $\beta$ -Catenin. Im Kern rekrutieren die Lef/Tcfs Korepressoren an die Wnt-Zielgene und verhindern so nahezu ihre Transkription. B: Bindet der Wnt-Ligand an den Rezeptor Frizzled und den Korezeptor Lrp 5/6 wird der Destraktionskomplex durch eine Vielzahl von Protein-Protein Interaktionen des Rezeptorkomplexes und Dishevelled an die Plasmamembran rekrutiert.  $\beta$ -Catenin wird nicht mehr phosphoryliert bzw. degradiert und kann nun akkumulieren und in den Kern translozieren. Nukleäres  $\beta$ -Catenin bindet an die Lef/ Tcfs und entfernt die Korepressoren. Nun kann es Koaktivatoren rekrutieren und die Expression der Wnt-Zielgene aktivieren. Verändert nach Archbold et al., 2012.

In Abwesenheit des Wnt-Liganden wird im kanonischen Signalweg  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma von einem Destraktionskomplex bestehend aus den Proteinen Axin, Adenomatous Polyposis Coli (Apc), Casein Kinase-1 (Ck-1), Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (Gsk-3 $\beta$ ) und weiteren Komponenten phosphoryliert. Diese Phosphorylierung markiert  $\beta$ -Catenin für den Ubiquitin-abhängigen Abbau am Proteasom. Bindet ein sezerniertes Wnt-Glykoprotein an die extrazelluläre cysteinreiche Domäne des Rezeptors Frizzled sowie dessen Korezeptor Lrp (Low density lipoprotein receptor-related protein), aktiviert der Rezeptor das cytoplasmatische Protein Dishevelled (Dvl; Dsh in *Drosophila*). Dies führt wiederum zur Inhibierung der Gsk-

3 $\beta$ . Somit akkumuliert  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma und transloziert in den Zellkern (Abb. 1.1). Dort interagiert es mit den Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf-Familie (Lymphoid Enhancer Factor/T-Cell Factor). Dieser heterodimere Komplex aus  $\beta$ -Catenin und Lef oder Tcf bindet über die HMG-Box (High Mobility Group) der Lef/Tcfs sequenzspezifisch an die DNA und aktiviert über die Transaktivierungsdomäne im  $\beta$ -Catenin die Expression der Wnt-Zielgene (Brannon et al., 1997).

## 1.2 Evolutionäre Aspekte des Wnt-Signalwegs

In den einzelligen *Choanoflagellata* (Kragengeißeltierchen) wurden weder Wnt-Liganden noch  $\beta$ -Catenin Homologe gefunden (King et al., 2008). In *Metazoa* dagegen ist der Wnt-Signalweg konserviert. Selbst *Placozoa* (Scheibentiere), die primitivsten Vertreter der *Metazoa*, weisen in ihrem Genom die Sequenzen aller Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs auf (Srivastava et al., 2008). Im Schwamm *Amphimedon queenslandica* wurden drei *wnt* Gene gefunden (Adamska et al., 2010). Vier *wnt* Gene liegen im Genom der Qualle *Mnemiopsis leidyi* vor (Pang et al., 1999). In der Seeanemone *Nematostella vectensis* konnten 11 der 12 bekannten *wnt* Gensubfamilien identifiziert werden (Kusserow et al., 2005; Guder et al., 2006). Der Süßwasserpolyt *Hydra magnipapillata* weist 11 Wnt-Liganden auf (Lengfeld et al., 2009). Dies lässt vermuten, dass die Auffächerung der Wnt Familie nach der Trennung des gemeinsamen Vorläufers von *Cnidaria/Bilateria* von den *Porifera* (Schwämmen) und *Ctenophora* (Rippenquallen) stattgefunden hat (Lengfeld et al., 2009). Unter <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/conservation> sind detaillierte Informationen zur Evolution der Wnt Familie zu finden.

In *Hydra magnipapillata* konnten nicht nur Wnt-Liganden, sondern auch  $\beta$ -Catenin, Dishevelled und Gsk-3 $\beta$  Orthologe identifiziert werden (Hobmayer et al., 1996; Hobmayer et al., 2000). In *Drosophila melanogaster* finden sich 7 *wnt* Gene (Nusse, 2001). Während bei *Drosophila* über Frizzled Rezeptoren, Arrow (Lrp in *Drosophila*), Dishevelled und das  $\beta$ -Catenin Homolog Armadillo (Arm) (Seto und Bellen, 2004), der kanonische Wnt-Signalweg dem erläuterten Prinzip folgt (Abb. 1.1), wurden bei *C.elegans* einige Modifikationen festgestellt. Auch dieser Modellorganismus exprimiert die zentralen Komponenten des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, Wnt (Shackelford et al., 1993; Herman et al., 1995), Frizzled, Dishevelled,  $\beta$ -Catenin und Tcf (Sawa et al., 1996; Rocheleau et al., 1997; Herman, 2003). Allerdings kodiert das Genom dieses Fadenwurms vier unterschiedliche  $\beta$ -Catenin Homologe, *bar-1* (*beta-*

*catenin/armadillo related-1*), *wrm-1* (*worm armadillo-1*), *sys-1* (*symmetrical sister-1*) und *hmp-2* (*humpback-2*), die mit 9–29 % Aminosäureidentität teilweise nur eine geringe Verwandtschaft zu humanem  $\beta$ -Catenin aufweisen (Natarajan et al. 2001; Takeshita und Sawa 2005; Liu et al., 2008). Diese  $\beta$ -Catenin Homologe üben unterschiedliche Funktionen aus. So spielt Hmp-2 in der Adhäsion, Bar-1 und Sys-1 in der Transkriptionsaktivierung und Wrm-1 in der Regulation des Exports des *C.elegans* Tcfs Pop-1 (Posterior pharynx defect-1) aus dem Kern eine Rolle. Wobei für Bar-1 und Sys-1 noch nicht letztlich geklärt ist, ob sie an Adhäsionsprozessen beteiligt sind (Korswagen et al., 2000; Natarajan et al., 2001; Phillips und Kimble, 2009).

### 1.3 Die Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren

Ein Meilenstein in der Erforschung der Lef/Tcf Familie war der Interaktionsnachweis dieser Transkriptionsfaktoren mit  $\beta$ -Catenin (Molenaar et al., 1996; Behrens et al., 1996). Die Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf Familie sind sequenzspezifische DNA-Bindeproteine und stellen die nachgestellten Effektoren des Wnt-Signalwegs dar (Arce et al., 2006). Sie binden über ihre HMG-Box an konservierte DNA-Sequenzen die WREs (Wnt responsive elements; WRE: CTTTGWW (W=A/T)) (van de Wetering und Clevers, 1992). Diese Elemente befinden sich stromaufwärts von Wnt-Zielgenen. Die Bindung von  $\beta$ -Catenin an die N-terminale Domäne der Lef/Tcfs ermöglicht die Bildung von multimeren Komplexen, bestehend aus Koaktivatoren wie Cbp/p300 (cAMP responsive element binding (Creb) binding protein/E1A-Binding protein, 300 kDa) (Takemaru und Moon, 2000; Hecht et al., 2003) und Bcl-9/Lgs (B-cell lymphoma-9/Legless) und Pygopus (Städeli und Basler, 2005). Diese können die Zielgentranskription aktivieren. Ohne  $\beta$ -Catenin bilden die Lef/Tcfs Komplexe mit Korepressoren, wie CtBP (C-terminal binding protein) (Brannon et al., 1999), Grg/Gro/TLE (Groucho related genes/Groucho/Transducin like Enhancer of split) (Daniels und Weis, 2005) und weiteren (Willert und Jones, 2006) und agieren somit als multimere transkriptionelle Repressoren.

#### 1.3.1 Evolutionäre Betrachtung der Lef/Tcfs

Bei der evolutionären Betrachtung der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren fällt auf, dass alle bislang beschriebenen Invertebraten jeweils nur einen dieser Transkriptionsfaktoren exprimieren, in *Drosophila melanogaster* das dTcf Pangolin (Brunner et al.,

1997), in *Hydra magnipapillata* HyTcf (Hobmayer et al., 2000) und in *Caenorhabditis elegans* Pop-1 (Lin et al., 1995). Im Gegensatz dazu haben Vertebraten vier Vertreter der Lef/Tcf Familie, Lef-1 (Travis et al., 1991), Tcf-1 (van de Wetering et al., 1991), Tcf-3 und Tcf-4 (Korinek et al., 1998) bzw. nach der HUGO (Human Genome Organisation) Bezeichnung Lef-1 (Lef-1), Tcf-7 (Tcf-1), Tcf-711 (Tcf-3) und Tcf-712 (Tcf-4) (Arce et al., 2006). Der Zebrafisch *Danio rerio* bildet die Ausnahme und weist zusätzlich einen durch Duplikation des Tcf-3 entstandenen, fünften Vertreter, Tcf-3b, auf (Dorsky et al., 1999; Veien et al., 2005).

Diese vertebraten Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren weisen eine erhebliche Diversität bezüglich ihrer jeweiligen Funktion und Struktur auf (Arce et al., 2006; Archbold et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Lef/Tcfs ihre Zielgene unterschiedlich regulieren. So agieren Tcf-1 und Lef-1 generell als Aktivatoren der Transkription, Tcf-3 dagegen als Repressor. Durch alternatives Spleißen von Tcf-4 im Bereich der Kontext-abhängigen regulatorischen Domäne (context dependent regulatory domain, CRD) und des C-Terminus können die verschiedenen Tcf-4 Isoformen Aktivatoren oder Repressoren sein (Pukrop et al., 2001; Gradl et al., 2002; Wöhrle et al., 2007; Weise et al., 2010).

Für Pangolin ist sowohl eine Repressor-, als auch eine Aktivatorfunktion beschrieben (Cavallo et al., 1998; Schweizer et al., 2003). Diese Bifunktionalität des Pangolins steht im Zusammenhang mit der Bindung an unterschiedliche DNA-Sequenzen. Dabei führt die Bindung des einen Motivs zur Zielgenaktivierung, während die Bindung an eine alternative Sequenz zu einer Reprimierung führt (Blauwkamp et al., 2008). Auch Pop-1 kann sowohl als Aktivator, als auch als Repressor fungieren. Dies wird über die Bindung an die unterschiedlichen  $\beta$ -Catenin Homologe und durch den Kernexport des Pop-1 vermittelt (Phillips und Kimble, 2009). Die Regulation des Wnt-Signalwegs scheint bei Vertebraten auch durch die Nutzung der unterschiedlichen Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren gegeben zu sein. Invertebraten mit nur einem Tcf vermitteln diese unter anderem durch alternative DNA-Sequenzen oder die Bindung an unterschiedliche  $\beta$ -Catenin Homologe.

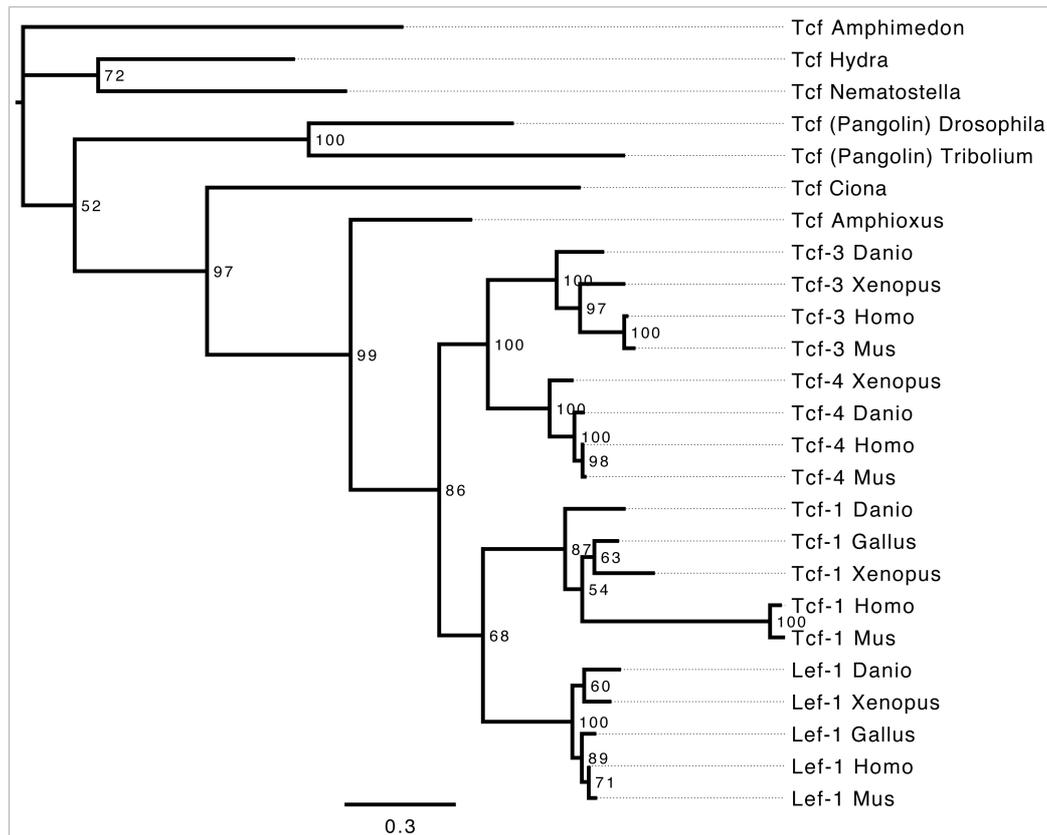
Eine Untersuchung zur Evolution der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren beschäftigt sich mit dem Amphioxus Tcf (AmphiTcf) von *Branchiostoma floridae*. Auch das Florida Amphioxus weist nur einen Vertreter der Lef/Tcf Familie auf (Lin et al., 2006). Bei *Branchiostoma floridae* handelt es sich um eine Art innerhalb des Unterstamms der

Schädellosen (*Cephalochordata*). Dieser Fisch gehört damit zur basalsten Gruppe der Chordatiere (Blair und Hedges, 2005). Das einzelne *tcf* Gen in *Amphioxus* steht im Gegensatz zu der Vielfältigkeit der homologen Gene in Vertebraten. Nach der evolutionären Trennung der Vertebraten von ihrem invertebraten *Chordata* Vorläufer entstand diese Vielfalt offenbar durch weitreichende Gen- oder Genomduplikationen (Force et al., 1999; He und Zhang, 2005). Die letzten gemeinsamen Vorfahren von *Amphioxus* und Wirbeltieren lebten vor ungefähr 550 Millionen Jahren (Putnam et al., 2008). Die phylogenetische Analyse der Lef/Tcfs ergab, dass das AmphiTcf eine Schwestergruppe zu dem Stamm, bestehend aus den vertebraten Tcfs Tcf-1, Lef-1, Tcf-3 und Tcf-4, darstellt. Für die Anlagerung der Lef/Tcfs wurden in dieser Studie jeweils die  $\beta$ -Catenin Bindedomäne ( $\beta$ Bd), die HMG-Box und circa ein Dutzend Aminosäuren C-terminal zur HMG-Box verwendet (Lin et al., 2006).

Ein ähnliches Ergebnis ergab ein phylogenetischer Stammbaum der Lef/Tcfs, welcher auf der gesamten Aminosäuresequenz der Proteine basiert (Abb. 1.2). Dafür wurden *Porifera*, *Cnidaria*, *Ecdysozoa* (*Caenorhabditis* und *Drosophila*) und die Sequenzen verschiedener vertebraten Lef/Tcfs verwendet. Die außenstehende Gruppe bildet das Tcf aus dem Schwamm *Amphimedon*. Dieser stellt eine Fremdgruppe zu allen *Eumetazoa* dar (Srivastava et al., 2010). Hierbei zeigt sich, dass *Cnidaria* und *Ecdysozoa* Tcfs einen Cluster der ursprünglichen Tcfs darstellen. Die vertebraten Lef/Tcfs bilden vier verschiedene Subfamilien. Diese Subfamilien lassen sich wiederum zwei Clustern zuordnen. So stellen die vertebraten Tcfs Tcf-1 und Lef-1 und vertebraten Tcf-3 und Tcf-4 je eine Schwestergruppe dar.

---

**Abbildung 1.2: Phylogenetischer Stammbaum der Lef/Tcfs.** Der Stammbaum basiert auf der Anlagerung der kompletten Aminosäuresequenzen. Als außenstehende Gruppe wurde das Tcf des Schwamms *Amphimedon* genutzt. Die Zahlen an den Knotenpunkten zeigen die Wahrscheinlichkeit dieser Abzweigung in Prozent. Die verwendeten Sequenzen sowie ihre Anlagerung sind im Anhang einzusehen (Abb. 8.1). Der Maßstabsbalken zeigt die evolutionäre Distanz gemessen in Aminosäuresubstitutionen pro Position. Die folgenden Proteine wurden verwendet: Tcf *Amphimedon* (*Amphimedon queenslandica*, AD016566); Tcf Hydra (*Hydra magnipapillata*, AAG13664); Tcf *Nematostella* (*Nematostella vectensis*, ABF55257); Tcf (Pangolin) *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*, P91943); Tcf (Pangolin) *Tribolium* (*Tribolium castaneum*, NP\_001034990); Tcf *Ciona* (*Ciona savignyi*, BAB68354); Tcf *Amphioxus* (*Branchiostoma floridae*, AAZ77711); Tcf-3 Zebrafisch (*Danio rerio*, Q9YHE8); Tcf-3 *Xenopus* (*Xenopus laevis*, AAK58835); Tcf-3 Human (*Homo sapiens*, NP\_112573); Tcf-3 Maus (*Mus musculus*, CAA11070); Tcf-4 *Xenopus* (*Xenopus laevis*, NP001083866); Tcf-4 Zebrafisch (*Danio rerio*, NP\_571334); Tcf-4 Human (*Homo sapiens*, NP\_110383); Tcf-4 Maus (*Mus musculus*, NP\_001136394); Tcf-1 Zebrafisch (*Danio rerio*, NP\_001012389); Tcf-1 Huhn (*Gallus gallus*, gj|21666820|gb|AAM73851.1|AF454504\_1HMG); Tcf-1 *Xenopus* (*Xenopus tropicalis*, AAO23662); Tcf-1 Human (*Homo sapiens*, AAH48769); Tcf-1 Maus (*Mus musculus*, EDL33620); Lef-1 Zebrafisch (*Danio rerio*, NP\_571501); Lef-1 *Xenopus* (*Xenopus laevis*, AAK58834); Lef-1 Huhn (*Gallus gallus*, gj|45384346|ref|NP\_990344.1); Lef-1 Human (*Homo sapiens*, NP\_057353); Lef-1 Maus (*Mus musculus*, NP\_034833). Der Stammbaum wurde von T.W. Holstein (Heidelberg) erstellt.



Dies deutet darauf hin, dass die Evolution der vertebraten Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren zwei verschiedene Genomduplikationen beinhaltet. Durch diese Duplikationen des Vorläufer invertebraten Tcfs entstanden vier Kopien.

### 1.3.2 Die Struktur der Lef/Tcfs

Alle Lef/Tcfs lassen sich in vier Domänen unterteilen, eine N-terminale  $\beta$ -Catenin Bindedomäne ( $\beta$ Bd), eine Kontext-abhängige regulatorische Domäne (context dependent regulatory domain, CRD), eine hoch konservierten DNA-Bindedomäne und ein C-Terminus (Abb. 1.3). Die  $\beta$ -Catenin Bindedomäne der Lef/Tcfs ist hoch konserviert (~60 % Sequenzhomologie der Tcf-Orthologe), umfasst etwa 50 Aminosäuren und bindet an die Armadillo Motive 3-10 im  $\beta$ -Catenin (Graham et al., 2000).

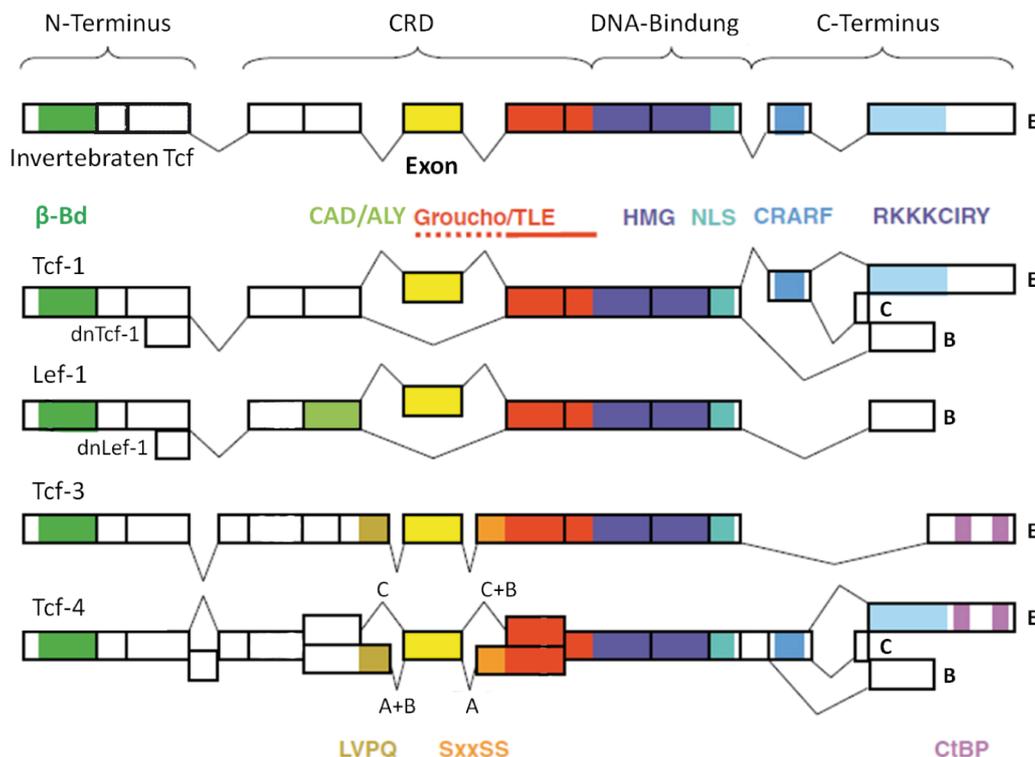
Die Verwendung alternativer Promotoren im Bereich des zweiten Introns in den *tcf-1* und *lef-1* Genen bei Mäusen und Menschen führt zu N-terminal trunkierten Varianten (dnTcf-1 und dnLef-1) (van de Wetering et al., 1996; Hovanes et al., 2001). Bedingt durch das Fehlen der N-terminalen  $\beta$ -Catenin-Interaktionsdomäne bilden diese dominant negativen Faktoren Repressorkomplexe (Roose et al., 1999; Hamilton et al., 2001). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass derartige Isoformen auch

für andere vertebraten Tcfs existieren (Duval et al., 2000; Shulewitz et al., 2006; Vakic et al., 2011). In Abwesenheit eines Wnt-Liganden liegen die Lef/Tcfs im Komplex mit Korepressoren, wie Groucho, DNA-gebunden vor und werden erst durch die Bindung von  $\beta$ -Catenin zu starken Transkriptionsaktivatoren (de la Roche und Bienz, 2007; Kioussi et al., 2002; Kirmizis et al., 2003; Sierra et al., 2006). Dabei kommt es zu einer Kompetition von  $\beta$ -Catenin mit dem Repressor um die Bindung der Lef/Tcfs (Daniels und Weis, 2005). Somit verdrängt in Anwesenheit eines Wnt-Liganden  $\beta$ -Catenin Groucho von den Lef/Tcfs, wobei der relevante Bereich bei den Lef/Tcfs innerhalb der CRD liegt (Daniels und Weis, 2005).

Diese CRD ist die am schwächsten konservierte Domäne der Lef/Tcfs (15-20 % Sequenzhomologie der Tcf-Orthologe). In diesem Bereich befinden sich bei den vertebraten Tcfs alternativ gespleißte Exons, die auch durch die Benutzung unterschiedlicher Spleißdonor- und akzeptorstellen zu einer Vielzahl verschiedener Varianten führen. Für eines dieser Exons, Exon IV bei Tcf-1, bzw. Exon VI bei Lef-1, wurde ein aktivierender Charakter beschrieben (Gradl et al., 2002; Liu et al., 2005). Es stellt aber auch eine Bindungsregion für das modulierende Protein Hic-5 (Hydrogen peroxide-induced clone-5) dar, dessen Bindung zur Reprimierung von Wnt-Zielgenen führt (Ghogomu et al., 2006). Ein Teil der Vertreter der Lef/Tcfs weist flankierende Aminosäuresequenzen in diesem Bereich auf (LPVQ und SxxSS). Diese bewirken die Repression der Transkription (Pukrop et al., 2001; Gradl et al., 2002; Liu et al., 2005), wobei der molekulare Mechanismus für diese Repression noch nicht geklärt ist. Insgesamt handelt es sich bei der CRD also um eine Modulatorregion. An diese binden Korepressoren der Groucho Familie (Daniels und Weis, 2005) sowie weitere Proteine (Valenta et al., 2006), die teilweise spezifisch sind für die Vertreter der Lef/Tcf Familie oder für alternativ gespleißte Bereiche (Ghogomu et al. 2006). Für Groucho konnte eine zweite Bindestelle im Bereich der HMG-Box identifiziert werden (Arce et al., 2009). Lef-1 ist der einzige Vertreter der Lef/Tcf Familie, welcher im Bereich der CRD eine Kontext-abhängige Transaktivierungsdomäne (context dependent transactivation domain, CAD) aufweist (Carlsson et al., 1993). Durch Interaktion mit dem Koaktivator ALY (Ally of AML-1 and Lef-1) anstelle von  $\beta$ -Catenin ermöglicht die CAD Lef-1 eine Wnt-unabhängige Transkriptionsaktivierung (van de Wetering et al., 1996; Bruhn et al., 1997).

Die DNA-Bindedomäne beinhaltet eine HMG-Box (High Mobility Group) und direkt C-terminal angrenzend eine Kernlokalisationssequenz (nuclear localization sequence,

NLS). Die HMG-Box zeichnet sich durch die sequenzspezifische DNA-Bindung aus. Dieser hoch konservierte Bereich (95-98 % Sequenzhomologie der Tcf-Orthologe) bindet in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix (Hurlstone und Clevers, 2002) an die 8-12 Basenpaare umfassende Konsensussequenz CTTTGWW (W=A/T) (van de Wetering und Clevers, 1992; van Beest, 2000). Außerdem kann sie, wie für Lef-1 gezeigt, die DNA um 130° biegen (Giese et al., 1991; Oosterwegel et al., 1991; Waterman et al., 1991; Giese et al., 1992). Diese Krümmung der DNA nimmt Einfluss auf die Koordination der Bindung verschiedener Kofaktoren an den TCR $\alpha$  (T-cell receptor  $\alpha$  chain) Enhancer (Carlsson et al., 1993; Giese und Grosschedl 1993; Giese et al., 1995). Die starke Konservierung der HMG-Box der Lef/Tcf Familie spricht dafür, dass alle Mitglieder dasselbe Sequenzmotiv binden und in der Lage sind diese DNA-Biegung durchzuführen (Archbold et al., 2012).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren.** Die Lef/Tcfs sind aus vier Hauptdomänen aufgebaut. Dem N-Terminus mit  $\beta$ -Catenin Bindedomäne (grün) folgt die CRD, die DNA-Bindedomäne und ein C-Terminus. Durch die Verwendung alternativer Promotoren entstehen dominant negative Formen von Tcf-1 und Lef-1. Durch differentielles Spleißen entstehen verschiedene C-terminale Varianten. Lef-1 existiert nur in der B-Variante des C-Terminus. Im Bereich der CRD befindet sich in Lef-1 die CAD (hellgrün), diese interagiert mit ALY. Das alternative Exon in der CRD (gelb) wird bei manchen Isoformen von den Peptidmotiven LVPQ (braun) und SxxSS (orange) flankiert. Die Bindungsstelle für den Korepressor Grg/Gro/TLE ist in rot gekennzeichnet. Die DNA-Bindedomäne enthält die HMG-Box (lila) und eine NLS (türkis). Der variable C-Terminus weist bei Tcf-1E und Tcf-4E die Motive CRARF (mittelblau) und RKKKCIRY (hellblau) auf. Tcf-3, Tcf-4 (ausgenommen das *Xenopus* Homolog XTcf-4) und Pangolin tragen Bindestellen für CtBP (violett). Verändert nach Hoppler und Kavanagh, 2007.

Durch alternatives Spleißen des C-Terminus von Tcf-1 und Tcf-4 entstehen zahlreiche Isoformen. Die wesentlichsten Unterschiede dieser Isoformen sind das Vorhandensein oder Fehlen dreier Bereiche, das CRARF Motiv und das RKKKCIRY Motiv sowie Bindestellen für den Kofaktor CtBP (van de Wetering et al., 1996; Duval et al., 2000; Hovanes et al., 2001; Young et al., 2002; Roël et al., 2003). Die langen Tcf-4 (Tcf-4E) Isoformen enthalten alle drei Regionen, während die lange Tcf-1 Variante (Tcf-1E) nur die Motive CRARF und RKKKCIRY aufweist. Interessanterweise enthalten die bisher untersuchten invertebraten Tcfs ebenfalls diese CRARF und RKKKCIRY Motive, wobei in einigen Organismen CRALF anstelle von CRARF steht. Im Falle von HyTcf findet sich ein CRARY anstelle des CRARF Motivs (Archbold et al., 2012). Das CRARF Motiv stellt die ersten fünf Aminosäuren der so genannten Cystein-Klammer dar. Dieser 30-33 Aminosäuren umfassende Bereich enthält außerdem fünf hoch konservierte Cysteine. Diese Cystein-Klammer stellt eine zusätzliche DNA-Bindedomäne dar, die GC-reiche Motive (Konsensussequenz GCCGCCR R=A/G) stromabwärts der WREs erkennt und so die Bindung der HMG-Box an klassische Wnt-abhängige Elemente unterstützt. Sie wird somit für eine starke Zielgenaktivierung benötigt (Hecht und Stemmler, 2003; Atcha et al., 2007; Chang et al., 2008). Das RKKKCIRY Motiv ist ausschließlich mit dem CRARF Motiv im E-Terminus zu finden. Es ermöglicht die Bindung des Koaktivators Cbp/p300. Diese Histonacetyltransferase unterstützt die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin. Somit ist das RKKKCIRY Motiv als ein aktivierendes Element anzusehen (Atcha et al., 2003). In Tcf-4E, Tcf-3 und Pangolin liegen außerdem Bindestellen für den Korepressor CtBP vor. Vor allem für XTcf-3 wurde gezeigt, dass das Zielgen *xshamois* über die CtBP Bindung reprimiert wird (Brannon et al., 1999). Allerdings ist CtBP auch in der Lage die Wnt-Signalkaskade Tcf-unabhängig zu regulieren sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten (Hamada und Bienz, 2004; Fang et al., 2006).

### **1.3.3 Diversität der Lef/Tcfs in der Ausbildung der endogenen Körperachse**

Diese Vielzahl an Unterschieden in der Struktur, Bindung von Kofaktoren sowie die unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Spleißvarianten spiegelt sich auch in dem Verhalten der Lef/Tcfs in Bezug auf die Ausbildung der endogenen Körperachse in *Xenopus* Embryonen wider. So zeigen die Mitglieder der Lef/Tcf Familie auch hier eine große Diversität. Die Ausbildung der Körperachse ist abhängig von der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs in *Xenopus* Embryonen (Smith und Harland, 1991;

Sokol et al., 1991). Dort bestimmt er maßgeblich die dorso-ventrale Polarität des Embryos. Das Zusammenspiel des Tgf- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) Signals am vegetativen Pol mit der dorsalen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs ist maßgeblich für die Ausprägung des Nieuwkoop-Zentrums und legt somit die dorso-ventrale Polarität der Blastula fest. Wird der Wnt-Signalweg ventral aktiviert führt dies zur Ausbildung eines zweiten Nieuwkoop-Zentrums, im Anschluss zu einem zweiten Spemann Organisator und somit zur Ausbildung einer sekundären Körperachse (Smith und Harland, 1991; Sokol et al., 1991). Wird der Wnt-Signalweg dorsal durch einen Repressor inhibiert, dann wird die Entstehung der endogenen Körperachse unterdrückt.

Die ventrale Überexpression von murinem Lef-1 (mLef-1) und auch von *Xenopus* Lef-1 (XLef-1) führt zur Ausbildung von sekundären Körperachsen (Behrens et al., 1996; Gradl et al., 2002). Allerdings wird Lef-1 nicht zur Ausbildung der endogenen Körperachse benötigt, denn die Lef-1 Expression beginnt erst während der Gastrulation (Molenaar et al., 1998). XTcf-3 dagegen induziert keine sekundären Körperachsen, wird aber zur Bildung der endogenen Körperachse benötigt (Gradl et al., 2002; Lemaire et al., 1995; Brannon et al., 1997). Die dorsale Überexpression von XTcf-3 oder dominant negativem mLef-1 unterdrückt dagegen die Entstehung der endogenen Körperachse (Brannon et al., 1999; Behrens et al., 1996). Wird XTcf-4 ventral überexprimiert, führt dies zu einer gedrungenen und verkürzten Körperachse sowie zu Schwanzdeformierungen und zur Ausbildung von soliden tumorösen Auftreibungen an der ventralen Körperseite (König, Doktorarbeit, 2003). Wird jedoch XTcf-4 dorsal überexprimiert, bilden die Embryonen zwar eine endogene Körperachse aus, aber die Ausbildung von für die dorsale Körperhälfte typischen Kopforgane ist behindert (König, Doktorarbeit, 2003). Die ventrale XTcf-1 Überexpression führt zur Ausbildung einer sekundären Körperachse (Hamdi, Diplomarbeit, 2009).

#### **1.4 Modifikationen der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren**

Neben subtypspezifischem Rekrutieren von Kofaktoren beeinflussen vor allem posttranslationale Modifikationen der Lef/Tcfs ihre funktionalen Eigenschaften. Diese Modifikationen sind in Abhängigkeit des Kontexts stimulierend oder inhibierend. Der Sumo (Small ubiquitin-related modifier) Modifikationsmechanismus ähnelt dem Ubiquitin-konjugierten Signalweg, verwendet aber eine andere Enzymaschinerie

(Kadoya et al., 2002). Die Sumo E3 Ligase PIASy (Protein inhibitor of activated STATy) ermöglicht die Sumoylierung von Lef-1 und dadurch die Zielgenreprimierung (Sachdev et al., 2001). Den gegenteiligen Effekt hat die Tcf-4 Sumoylierung. Diese führt zu einer höheren Bindungsaffinität an  $\beta$ -Catenin und so zu einer Aktivierung der Zielgene (Yamamoto et al., 2003). Die Sumoylierungsstellen in den Proteinen befinden sich an unterschiedlichen Stellen. In Lef-1 befinden sie sich im Bereich der  $\beta$ -Catenin-Interaktionsdomäne, in Tcf-4 hingegen in der Groucho Interaktionsdomäne (Hoppler und Kavanagh, 2007). Die physiologische Rolle von PIASy im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist nicht vollständig geklärt, zumal der Verlust des Gens in Mäusen keine morphologischen Auswirkungen hat und auch die Wnt-Zielgene kaum betroffen sind (Roth et al., 2004).

Die Lef/Tcfs werden außerdem von Cbp und p300 acetyliert. Diese Proteine sind als Histonacetyltransferasen bekannt und werden somit mit Genaktivierung assoziiert (Ogryzko et al., 1996). In *Drosophila* wird Cbp über Armadillo an WREs rekrutiert und führt zur Aktivierung von Wingless-Zielgenen (Mosimann et al., 2009). Überraschend war, dass der partielle Verlust von Cbp aktivierend auf den Wingless-Signalweg wirkt (Waltzer und Bienz, 1998). Dies wird auf eine Acetylierung des K25 im Pangolin zurückgeführt. Bei dieser Acetylierungsstelle handelt es sich um ein konserviertes Lysin in der Armadillo Bindedomäne. Eine inhibierende Rolle des p300 wurde auch in Säugerzellen beobachtet, wobei der exakte Mechanismus nicht geklärt ist (Li et al. 2008). Auch in *C. elegans* ist eine Acetylierung von Pop-1 durch Cbp-1, hier aber an Position K185 N-terminal der HMG-Box beschrieben (Gay et al., 2003). Diese Region des Pop-1 ist in anderen Tcfs nicht konserviert. Daher ist unklar, ob ein ähnlicher Mechanismus auch in anderen Organismen eine Rolle spielt (Archbold et al., 2012). Die Nlk (Nemo like kinase) -abhängige Phosphorylierung von Pop-1 wird im Kapitel 1.6.3 (S.19) zusammen mit den Besonderheiten des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in *C.elegans* besprochen. Eine Phosphorylierung durch die Nlk ist auch für Lef-1 und Tcf-4 beschrieben. Hier reduziert sie die DNA-Bindung dieser Tcfs und führt so zu einer Abschwächung der Wnt-abhängigen Genexpression (Ishitani et al., 1999; Ishitani et al., 2003). Die Phosphorylierung der Tcfs durch die Nlk kann jedoch auch eine aktivierende Wirkung auf die Zielgene ausüben (Thorpe und Moon, 2004). Da die Phosphorylierung durch die Nlk zur Verdrängung der Tcfs vom Zielgenpromotor führt, lässt vermuten, dass abhängig vom jeweiligen Zielgen und vom Lef/Tcf-Subtyp die Nlk einen aktivierenden oder reprimierenden Einfluss hat. Wird ein Repressor

vom Zielgenpromotor entfernt, wirkt dies aktivierend auf die Transkription, wird dagegen ein Aktivator entfernt, führt dies zur Reprimierung der Zielgene (Sokol, 2011). In *Drosophila* konnte Nemo (NF-kappaB essential modulator like kinase) als Antagonist des Wntless-Signalwegs identifiziert werden. Nemo stellt ein Wntless-Zielgen dar, daher handelt es sich bei dieser Regulation um eine negative Rückkopplung, bei der Wntless selbst die Expression des Antagonisten Nemo induziert (Zeng und Verheyen, 2004).

Für die Aktivierung der Wnt-Zielgene in *Xenopus* Embryonen mittels Phosphorylierung besteht eine interessante Hypothese. Diese besagt, dass die Kinasen Hipk-2 (Homeodomain-interacting protein kinase-2) und Tnik (Traf2- and Nck-interacting kinase) gemeinsam agieren. Die Hipk-2 phosphoryliert  $\beta$ -Catenin-abhängig Tcf-3 und entfernt es so von den WREs (Hikasa et al., 2010). Gleichzeitig rekrutiert  $\beta$ -Catenin Tnik an Tcf-4. Dies ermöglicht dem Tcf-4/ $\beta$ -Catenin Komplex die Transkription zu aktivieren (Satow et al., 2010). Das bedeutet, dass  $\beta$ -Catenin einen Austausch der Tcfs induziert und so die Reprimierung beziehungsweise Aktivierung beeinflusst. Kürzlich konnte, anhand des Wnt-Zielgens *vent-2* (*ventricular size-2*), gezeigt werden, dass die Signalwegaktivierung einen Austausch von Tcf-3 zu Tcf-1 an der regulatorischen Region des *vent-2* Promotors bewirkt. Da Tcf-3 reprimierend und Tcf-1 aktivierend auf die *Vent-2* Expression wirkt, stellt dies den ersten Beweis für einen direkten Tcf Wechsel dar, in dem der Wnt-Signalweg den Austausch von verschiedenen Tcfs verursacht (Hikasa und Sokol, 2011). Da Invertebraten nur ein Tcf Ortholog exprimieren, ist ein ähnlicher Austausch bei diesen Organismen unmöglich.

Die Ck-1 $\epsilon$  (Casein kinase 1 $\epsilon$ ) phosphoryliert Tcf-3 und erhöht so die Tcf/ $\beta$ -Catenin Komplexbildung. Die Tcf-3 Phosphorylierung durch Gsk-3 $\beta$  inhibiert dagegen diese Interaktion (Lee et al., 2001). Die Ck-1 $\delta$  (Casein kinase-1 $\delta$ ) hat einen negativen Einfluss auf die Lef-1/ $\beta$ -Catenin Komplexbildung (Hammerlein et al., 2005). Im Gegensatz dazu fördert die Ck-2 (Casein kinase-2) die Lef-1 Bindung an Chromatin, (Wang und Jones, 2006) reduziert aber die Tcf-4 Assoziation an  $\gamma$ -Catenin (Miravet et al., 2002). Insgesamt erfolgt die Regulation der Aktivität der Lef/Tcfs also über komplexe posttranslationale Ereignisse, die an unterschiedlichen Positionen die Transkriptionsfaktoren modifizieren. Dabei ist das Resultat dieser Modifikationen, ob

sie aktivierend oder reprimierend wirken, nicht nur vom Tcf-Subtyp, sondern auch vom zellulären Kontext und dem Zielgenpromoter abhängig.

## 1.5 Subtypspezifische und redundante Funktionen der vertebraten Lef/Tcfs

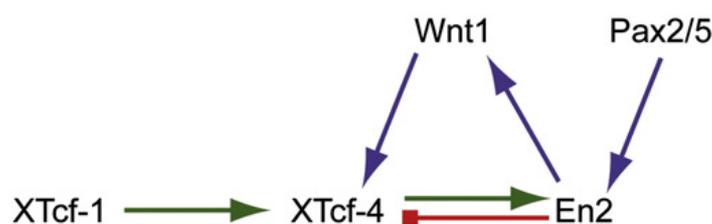
In *Xenopus* Embryonen wurde eine Vielzahl redundanter und nicht-redunder Funktionen der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren identifiziert (Kunz et al., 2004; Standley et al., 2006; Heeg-Truesdell und LaBonne, 2006; van Venrooy et al., 2009; Koenig et al., 2010).

So wirkt maternal exprimiertes XTcf-3, sowohl dorsal als auch ventral, als Repressor auf die Zielgene *xsia* (*Xenopus siamois*) und *xnr-3* (*Xenopus nodal related-3*). Im Gegensatz dazu wirkt maternales XTcf-1 dorsal aktivierend auf die Expression dieser Zielgene, während es ventral und lateral reprimierend wirkt (Standley et al., 2006). Wiederum ist also der Kontext, in dem die Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren vorliegen entscheidend dafür, welche Aktivität sie zeigen. Für die Induktion des Mesoderms in der dorsalen Marginalzone ist sowohl die Repression durch XTcf-3, als auch die Aktivierung durch XTcf-1, notwendig. Somit handelt es sich um komplementäre und nicht-redundante Funktionen dieser beiden Tcfs. Rekonstitutionsexperimente, bei denen die Expression des panmesodermalen Markergens *xbra* (*Xenopus brachyury*) untersucht wurde, untermauern die Bedeutung dieser nicht-redundanten Funktionen (Liu et al., 2005). So war zwar die XBra Expression sowohl nach XTcf-1, als auch nach XTcf-3 Depletion reduziert, doch konnte diese nach XTcf-1 Depletion durch XTcf-3 nicht wieder hergestellt werden, jedoch durch XLef-1 und die aktivierende XTcf-4C Isoform. Für die XBra Expression nach XTcf-3 Depletion gilt, dass sie nicht durch XTcf-1, aber durch die reprimierende XTcf-4A Isoform rekonstituiert wurde. Somit konnte eine funktionale Ersetzbarkeit von XTcf-1 durch XLef-1 und XTcf-4C sowie von XTcf-3 durch XTcf-4A nachgewiesen werden. Jedoch wird die XBra Expression weder von endogenem XLef-1 noch von XTcf-4 reguliert (Liu et al., 2005). Aufgrund zahlreicher Depletionsexperimente und anschließender Analyse mittels RT-PCR (Real time-polymerase chain reaction) wird für die Regulation der ventralen Reprimierung der Zielgene *xsia* und *xnr-3* jedoch eine redundante Funktion von XTcf-1 und XTcf-3 vermutet (Standley et al., 2006).

Die zygotische XTcf-4 Expression beginnt in der späten Neurula und ist auf die Mittelhirnregion begrenzt (König et al., 2000). Dort spielt XTcf-4 eine entscheidende

Rolle in der Mittelhirn- und Isthmusentwicklung. Jedoch weisen die verschiedenen zygotischen XTcf-4 Varianten deutliche Unterschiede in Bezug auf die *Xenopus* Gehirnentwicklung auf. So kann in Wiederherstellungsexperimenten die Isoform XTcf-4A die Expression der mittelhirnspezifischen Markergene *xpax-6* (*Xenopus paired box-6*) und *xwnt-2b* rekonstituieren, die Isoform XTcf-4C ist hierzu nicht in der Lage. Der umgekehrte Fall ergibt sich in Rekonstitutionsexperimenten bezüglich der Expression des isthmusspezifischen Markergens *xen-2* (*Xenopus engrailed-2*). Folglich ist XTcf-4A für die Spezifizierung des Mittelhirns, XTcf-4C dagegen für die Ausbildung des Isthmus verantwortlich. Demnach handelt es sich um nicht-redundante Funktionen der verschiedenen XTcf-4 Isoformen (Kunz et al., 2004).

Die Restriktion der XTcf-4 Expressionsdomäne erfordert eine komplexe Regulation durch XTcf-1, XWnt-1, XEn-2 und XPax-2/5 (Abb. 1.4). Die genaue Analyse dieser Faktoren spricht für eine hierarchische Regulation der Genexpression in der Mittelhirn-Isthmus-Region. In dieser steht XPax-2/5 über XEn-2. Die XTcf-4 Expressionsdomäne überlappt weder mit der von XEn-2, noch mit der von XPax-2/5. Die XTcf-4 Regulation erfolgt über den parakrinen Wachstumsfaktors, XWnt-1. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass XTcf-1 essentiell für die XTcf-4 Expression ist und aktivierend auf XTcf-4 wirkt (Koenig et al., 2010). Diese Regulation ist vermutlich direkt, da in Chromatin-Immünpräzipitationsexperimenten nachgewiesen wurde, dass  $\beta$ -Catenin ein Wnt-responsives Element im XTcf-4 Promoter bindet (Koenig et al., 2008)



**Abbildung 1.4: Die XTcf-4 Expression wird durch einen autoregulatorischen Kreislauf reguliert.** Das komplexe Zusammenspiel von XEn-2, XPax-2/5 und XTcf-4 ist entscheidend für die Gehirnmusterung in *Xenopus*. Die Restriktion der XTcf-4 Expressionsdomäne erfordert die Regulation durch XTcf-1, XWnt-1, XEn-2 und XPax-2/5. Dabei aktiviert XTcf-1 die XTcf-4 Expression im Mittelhirn. XTcf-4 ist seinerseits notwendig für die Regulation des isthmusspezifischen Markergens XEn-2 (Kunz et al., 2004). XEn-2 wiederum reprimiert XTcf-4, dies verhindert die XTcf-4 Expression im Isthmus. In einem autoregulatorischen Kreislauf wird XEn-2 von XPax-2/5 reguliert, dies führt zur Aktivierung von XWnt-1 und so wiederum zur XTcf-4 Aktivierung. Aus Koenig et al., 2010.

*Xcirp* (*Xenopus cold inducible RNA binding protein*) konnte als XTcf-3 spezifisches Zielgen identifiziert werden. Als solches wird es nur von XTcf-3 nicht aber von XTcf-1, XTcf-4 oder XLeF-1 reguliert. Der Verlust von XTcf-3 führt neben der reduzierten

XCirp Expression auch zu einer Verbreiterung des anterioren Neuralgewebes. Der Verlustphänotyp nach XTcf-3 Depletion kann nur durch die Koinjektion von XTcf-3 und XLef-1 partiell wiederhergestellt werden, jedoch nicht durch XTcf-4. Somit ergibt sich für XTcf-3 und XLef-1 eine funktionale Redundanz in der Wiederherstellung der XCirp Expression, nicht jedoch für XTcf-4. Für die Entwicklung des anterioren Gehirns scheint XTcf-3 und in der Folge XCirp unabdingbar. Der Einfluss dieser Faktoren basiert auf der mRNA Stabilisierung durch das XTcf-3 Zielgen *xcirp* (van Venrooy et al., 2008).

Neben diesen spezifischen Funktionen in *Xenopus* konnten in der Maus auch redundante Funktionen für Tcf-1 und Lef-1 in der Thymocytenentwicklung und zum anderen von Tcf-1 und Tcf-4 in der intestinalen Entwicklung nachgewiesen werden. Tcf-1 und Lef-1 werden in T-Zellen des murinen Thymus koexprimiert. Es zeigte sich, dass bei Doppelmutanten schwerwiegendere Defekte innerhalb der Thymocytenreifung auftraten, als durch Addition der Einzelmutationen zu erwarten wäre (van Genderen et al., 1994; Verbeek et al., 1995; Okamura et al., 1998; Galceran et al., 1999). In murinen intestinalen Stammzellen sind Tcf-1 und Tcf-4 koexprimiert. Tcf-4<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen erhebliche Defekte der intestinalen Entwicklung. So ist zum Beispiel die Anzahl der Epithelzellen der Intervillus-Bereiche reduziert. Auch die Zahl der Dünndarmzotten ist verringert, die enteroendokrine Zellen des Dünndarms fehlen sogar vollständig. Tcf-4 Nullmutanten sterben innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Korinek et al., 1998). Auch hier sind die Effekte in Doppelmutanten schwerwiegender als durch Addition der Einzelmutationen (Gregorieff et al., 2004).

## **1.6 Die invertebraten Tcfs der Spezies *Hydra magnipapillata*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans***

### **1.6.1 Tcf im Süßwasserpolypen *Hydra magnipapillata***

Im Süßwasserpolypen *Hydra magnipapillata* werden HyTcf und Hyβ-Catenin im Hypostom (Mundfeld bei Nessel- und Gliedertieren) stark koexprimiert (Hobmayer et al., 2000). Zu Beginn der Knospenbildung ist vor dem morphologisch sichtbaren Auswachsen der Tochterpolypen in der Knospungszone eine ringförmig um den Rumpf verlaufende Aufregulierung von Hyβ-Catenin und HyTcf zu erkennen. Auch bei der Kopfregeneration werden Hyβ-Catenin und HyTcf in der regenerierenden Spitze in einer breiten Expressionsdomäne vermehrt exprimiert (Hobmayer et al.,

2000; Cramer von Laue, Doktorarbeit, 2003). Der Wnt-Signalweg beziehungsweise  $\beta$ -Catenin und sein Interaktionspartner scheinen also auch in *Hydra magnipapillata* eine entscheidende Rolle in der Ausbildung der Körperachse zu spielen. Entsprechend führt eine pharmakologische Inhibierung der Gsk-3 zur Ausbildung multipler Köpfe und Tentakeln entlang des Körpers (Broun et al., 2005, Müller et al., 2007, Duffy et al., 2010). Der gegenteilige Effekt kann nach  $\beta$ -Catenin Depletion beobachtet werden. Diese resultiert in einem Verlust der Kopfstrukturen (Gee et al., 2010). Ob HyTcf vorwiegend als Repressor oder Aktivator Wnt-vermittelter Transkription fungiert ist allerdings noch unklar. Tatsächlich sind bislang noch keine funktionalen Studien zu diesem Tcf veröffentlicht.

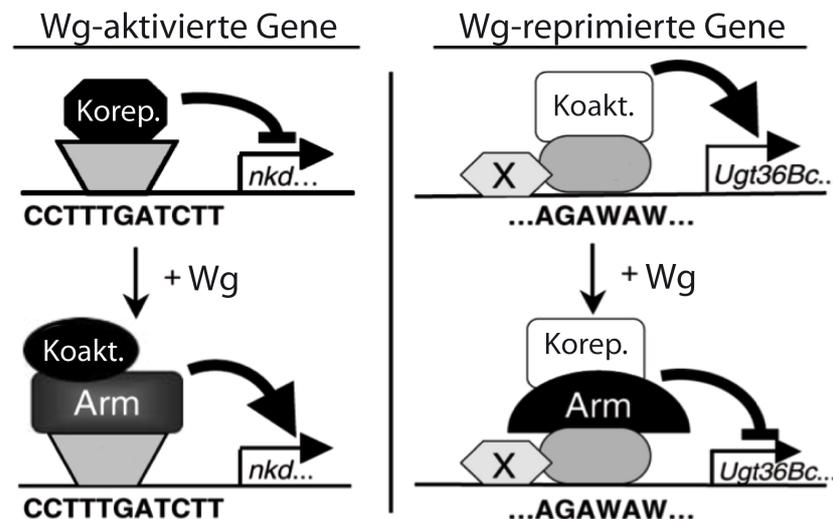
### 1.6.2 Das *Drosophila melanogaster* Tcf Pangolin

*Pangolin* Mutationen führen zu einem Segmentpolaritätsphänotyp, welcher dem Phänotyp der *wingless* Mutation entspricht (Brunner et al., 1997). Die Aktivierung der Transkription durch Armadillo und Pangolin hängt von einem weiteren Protein ab, Pygopus. Dieses Kernprotein bildet über das Adapterprotein Legless einen Komplex mit Armadillo und Pangolin. In diesem Komplex rekrutiert Pygopus weitere Koaktivatoren, welche die Transkription der Zielgene aktivieren (Thompson et al., 2004). Jedoch konnte auch eine konstitutive Bindung von Pygopus an Zielgene nachgewiesen werden. Somit würde Legless in diesem Prozess keine Rolle spielen (de la Roche und Bienz, 2007). In Abwesenheit von Armadillo agiert Pangolin als transkriptioneller Repressor der Wingless-Zielgenexpression.

Der Wingless-Signalweg ist maßgeblich an der Entwicklung beteiligt und ist essentiell in der Musterung des Flügels (Couso et al., 1994). Eine erstaunliche Beobachtung war, dass die Pangolin Überexpression auch hier zu einer Reprimierung des Wingless-Signalwegs führt. Der Pangolin Überexpressionsphänotyp, vor allem der Verlust der Borsten an der Flügelkante, entspricht dem Wingless Verlustphänotyp. Dieser dominant negative Effekt von Pangolin auf den Wingless-Signalweg wird durch die Interaktion mit Groucho vermittelt (Lawrence et al., 2000). Offensichtlich übt Pangolin darüber hinaus im sich entwickelnden Flügel auch eine gegenteilige Funktion aus, so war die Expression der Wingless Zielgene *distalless* und *vestigial* im *pangolin* mutanten Hintergrund reduziert. Somit aktiviert Pangolin dort die Expression von Zielgenen (Schweizer et al., 2003). Für die embryonale Musterung,

insbesondere des Flügels, spielt somit die reprimierende als auch die aktivierende Funktion von Pangolin eine entscheidende Rolle.

Beides, die Signal-induzierte Aktivierung und die Signal-induzierte Reprimierung, setzt die Bindung von Armadillo an den N-Terminus von Pangolin voraus. Ein molekularer Erklärungsansatz dieser Bifunktionalität des Armadillo/Pangolin Komplexes liegt in der selektiven Zielsequenzbindung des Pangolins (Blauwkamp et al., 2008). Für Wingless aktivierte Zielgene gilt, dass in Abwesenheit des Liganden, Pangolin zusammen mit Korepressoren an die Konsensussequenz CCTTTGATCTT gebunden vorliegt. Erfolgt nun die Bindung des Liganden Wingless aktiviert der Armadillo/Pangolin Komplex gemeinsam mit Koaktivatoren die Zielgenexpression. Diese Signal-induzierte Aktivierung ist für die Gene *nkd* (*naked cuticle*) und *CG6234* (Parker et al., 2008; Blauwkamp et al., 2008; Fang et al., 2006) gezeigt. Im Gegensatz dazu steht die Regulation der Zielgene *Ugt36Bc*, *Pxn* (*Peroxidasin*), *Tig* (*Tiggrin*) und *Ugt58Fa*. Bei dieser Signal-induzierten Reprimierung erfolgt die Transkriptionsaktivierung in Abwesenheit des Wingless-Signals durch die Pangolin Bindung an die Sequenz AGAWAW im Zielgen *Ugt36Bc*. Bindet der Ligand, wird die Zielgentranskription durch den Armadillo/Pangolin Komplex reprimiert (Abb. 1.5; Blauwkamp et al., 2008).



**Abbildung 1.5: Modell für die Zielgenregulation durch Bindung von Pangolin und Armadillo an unterschiedliche DNA-Sequenzen.** Pangolin kann zwei unterschiedliche Klassen von DNA-Sequenzen binden. Bindet Pangolin an die traditionelle Konsensussequenz CCTTTGATCTT führt dies in Abwesenheit des Wingless-Signals zur Reprimierung der Transkription. Nach Wingless Stimulation aktiviert der Pangolin/Armadillo Komplex gemeinsam mit Koaktivatoren die Transkription. Bindet Pangolin jedoch an die alternative Sequenz AGAWAW im Zielgen *Ugt36Bc* wird die Transkription ohne Wingless-Signal aktiviert. Die Anwesenheit von Wingless führt dann zur Reprimierung der Transkription. Verändert nach Blauwkamp et al., 2008.

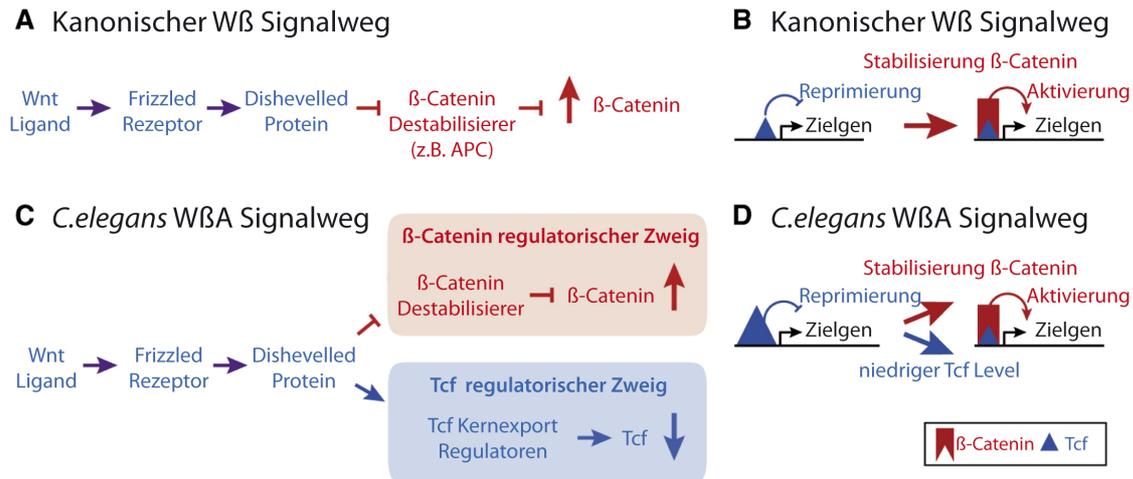
Im Experiment kann durch den Austausch dieser DNA-Sequenzen eine eigentliche Wingless regulierte Aktivierung in eine Reprimierung umgekehrt werden (Blauwkamp et al., 2008). Somit hängt eine Reprimierung oder eine Aktivierung, in Folge eines Wingless-Signals, von der DNA-Sequenz des Promotors ab.

Eine direkte Reprimierung durch Pangolin und Armadillo beziehungsweise durch Tcf und  $\beta$ -Catenin konnte für die *Drosophila* Zielgene *stripe* (Piepenburg et al., 2000) und *decapentaplegic* (Theisen et al., 2007) sowie für die murinen Zielgene *e-cadherin* (Jamora et al., 2003) und *osteocalcin* (Kahler und Westendorf, 2003) gezeigt werden.

### 1.6.3 Der Wnt-Signalweg in *C.elegans* und die Rolle des Tcfs Pop-1

Im Gegensatz zu anderen Modellorganismen benutzt *C.elegans* zwei distinkte Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwege. Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in *C.elegans* ist vergleichbar mit dem kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg anderer Spezies (Abb. 1.1; Abb. 1.6 A,B). Dabei wird das  $\beta$ -Catenin Homolog Bar-1 verwendet. Der andere, *C.elegans* spezifische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, oder Wnt/ $\beta$ -Catenin/Asymmetrie-Signalweg (W $\beta$ A-Signalweg) unterscheidet sich davon erheblich. Dieser W $\beta$ A-Signalweg schließt die beiden  $\beta$ -Catenin Homologe Wrm-1 und Sys-1 ein und übernimmt im Fadenwurm einige Funktionen, die in anderen Organismen von  $\beta$ -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalwegen übernommen werden. Sowohl Bar-1, als auch Sys-1, interagieren mit der N-terminalen Domäne des Pop-1 (Tcf) und führen so zur Transkriptionsaktivierung (Korswagen et al., 2000; Natarajan et al., 2001). Das augenscheinlichste Merkmal des W $\beta$ A-Signalwegs ist, dass er sich unterhalb von Dishevelled in zwei Zweige aufgabelt; in einen Pop-1 regulatorischen und einen Sys-1 regulatorischen Zweig (Abb. 1.6 C; Thorpe et al., 1997; Park und Priess, 2003; Phillips et al., 2007). Diese beiden Zweige werden gemeinsam für die Zielgenaktivierung benötigt (Abb. 1.6 D; Maduro et al., 2005; Shetty et al., 2005; Huang et al., 2007).

Der Tcf regulatorische Zweig wird in erster Linie zur Absenkung des Pop-1 Niveaus, im Kern der aktiv auf das Signal reagierenden Zelle, benötigt und in der Folge zur Zielgenaktivierung (Lin et al., 1998; Maduro et al., 2002; Rocheleau et al., 1997; Siegfried und Kimble, 2002; Arata et al., 2006).



**Abbildung 1.6: Die Wnt-Signalwege in *C.elegans*.** In A ist der kanonische Wnt-Signalweg stark vereinfacht dargestellt. B: Der kanonische Wnt-Signalweg wandelt das Tcf von einem transkriptionellen Repressor zu einem Transkriptionsaktivator der Zielgene um. Dies erfolgt über die Stabilisierung und Bindung von  $\beta$ -Catenin an das Tcf. C: Der *C.elegans* W $\beta$ A-Signalweg ist unterteilt in einen Tcf regulatorischen Zweig und einen  $\beta$ -Catenin regulatorischen Zweig. In dieser Abbildung werden nicht die *C.elegans* spezifischen Namen verwendet. Auch der W $\beta$ A-Signalweg ist stark vereinfacht dargestellt. D: Der W $\beta$ A-Signalweg wandelt das Tcf von einem transkriptionellen Repressor zu einem Transkriptionsaktivator der Zielgene um. Dazu wird ebenfalls eine  $\beta$ -Catenin Stabilisierung benötigt, allerdings auch ein gleichzeitiges Absenken der Tcf Konzentration. Verändert nach Phillips und Kimble, 2009.

Ein Absenken des Pop-1 Levels wird bei jeder durch den W $\beta$ A-Signalweg kontrollierten asymmetrischen Zellteilung beobachtet (Phillips und Kimble, 2009). Im Kern der Tochterzelle, die aktiv auf das Signal reagiert, ist das nukleäre Pop-1 Niveau niedrig, in der anderen Tochterzelle dagegen hoch. Reguliert wird der Kernexport von Pop-1 über die Phosphorylierung durch die Nlk (Nemo like kinase), die im Fadenwurm Lit-1 (Loss of intestine-1) heißt. Lit-1 ist eine Serin/Threonin Kinase, die in *C. elegans* selbst durch die Tgf- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) aktivierte Kinase Tak-1 reguliert wird (Kaletta et al., 1997; Meneghini et al., 1999). Eine Vielzahl an Experimenten zeigt, dass neben Lit-1 auch das  $\beta$ -Catenin Homolog Wrm-1 für die Phosphorylierung von Pop-1 benötigt wird (Lo et al., 2004; Rocheleau et al., 1999; Shin et al., 1999). Ein erstaunlicher Aspekt dieses Pop-1 Kernexports ist die daraus resultierende Aktivierung der Wnt-Zielgene. Diese wird durch die zwei  $\beta$ -Catenin Homologe Wrm-1 und Sys-1 reguliert. Wrm-1 vermittelt den Kernexport, während Sys-1 als Koaktivator von Pop-1 wirkt (Kidd et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen einer durch den W $\beta$ A-Signalweg kontrollierten, asymmetrischen Zellteilung, eine Tochterzelle kein Wnt/Lit-1-Signal erhält und Pop-1 in einer hohen Konzentration im Kern vorliegt. In dieser Situation ist der Großteil von Pop-1 nicht im Komplex mit Sys-1. So kann Pop-1 entweder die Zielgene aktiv reprimieren oder sie können nicht aktiviert werden. Die

andere Tochterzelle erhält das Wnt/Lit-1-Signal und Pop-1 wird aus dem Kern Wrm-1/Lit-1-abhängig exportiert. In diesem Fall liegen Pop-1 und Sys-1 im Komplex vor. Dies führt zur Aktivierung der Zielgene. Somit ist eine höhere Sys-1 Konzentration für eine stärkere Aktivierung fördernd. Die Regulation ihrerseits wird durch den  $\beta$ -Catenin (Sys-1) regulatorischen Zweig des W $\beta$ A-Signalwegs vermittelt (Kidd et al., 2005). Der W $\beta$ A-Signalweg stabilisiert Sys-1, vergleichbar mit der  $\beta$ -Catenin Stabilisierung im kanonischen Wnt-Signalweg (Phillips et al., 2007). Tatsächlich erfolgt die Kontrolle der Sys-1 Menge Apr-1 (APC related-1; Apc in *C.elegans*)-abhängig auf Proteinebene (Huang et al., 2007). Die beiden Zweige des W $\beta$ A-Signalwegs führen an diesem Punkt also wieder zusammen und letztlich reguliert das Verhältnis von Sys-1 und Pop-1 die Expression der Zielgene (Bertrand und Hobert, 2009; Kidd et al., 2005; Lam et al., 2006; Phillips und Kimble, 2009).

Die Verallgemeinerung unter dem Begriff des Lef/Tcf/ $\beta$ -Catenin-Komplex wird der großen Diversität dieser Transkriptionsfaktoren nicht gerecht. Die intensive Forschung der letzten Jahre gab Einblicke in eine Vielzahl verschiedener Aspekte dieser Transkriptionsfaktoren. Doch trotz vieler Erkenntnisse lassen sich bislang viele der spezifischen Funktionen der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren nicht erklären.

## 2. Zielsetzung

Die Vielfalt der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren in Vertebraten, mit vier Vertretern dieser Familie, steht den Invertebraten *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Hydra magnipapillata* gegenüber, in denen sich nur ein Tcf Ortholog findet. Nun zeichnen sich die vertebraten Lef/Tcfs durch spezifische nicht-redundante Funktionen aus. All diese Funktionen werden in Invertebraten mit nur einem dieser Transkriptionsfaktoren erfüllt. So ist ein Ziel dieser Arbeit, die funktionale Analyse der invertebraten Tcfs im vertebraten System *Xenopus laevis*. Dabei soll die Überprüfung der invertebraten Tcfs auf ihre Aktivator- und Repressorfunktion sowie die Analyse in Wiederherstellungsexperimenten Aufschluss über die Funktionalität und Spezifität der invertebraten Tcfs geben. Zusätzlich sollen neue Erkenntnisse bezüglich der Evolution der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren gewonnen werden. Eine Frage dabei ist, ob die Vielfältigkeit der vertebraten Lef/Tcfs durch Neo- oder Subfunktionalisierung entstanden ist.

Des Weiteren soll der Zusammenhang zwischen der Spezifität der distinkten Lef/Tcfs und ihren Domänen aufgeklärt werden. Dazu sollen chimäre Konstrukte aus XTcf-1 und XTcf-3 sowie ein weiteres Set mit Chimären, bestehend aus XTcf-1 und HyTcf verwendet werden. Die funktionale Analyse dieser Konstrukte soll darüber Aufschluss geben, inwiefern die verschiedenen Domänen relevant für die Ausübung der spezifischen Eigenschaften von XTcf-1 und XTcf-3 sind.

Die funktionale Analyse der *Xenopus* Tcfs im invertebraten System *Drosophila melanogaster* stellt ein weiteres Ziel dieser Arbeit dar. Im Rahmen dieser Analyse sollen die *Xenopus* Tcfs dahingehend überprüft werden, ob sie die im *Drosophila* Tcf Pangolin vereinte Repressor- und Aktivatorfunktion übernehmen können. Dabei liegt das Hauptaugenmerk nicht nur darauf, ob die XTcfs diese Funktionen übernehmen können, sondern auch ob sie sich in diesem System ebenfalls distinkt verhalten. Zur Klärung dieser Fragestellungen sollen Überexpressionsexperimente sowie Immunfärbungen herangezogen werden.

## 3. Material

### 3.1 Lösungen

Alle Lösungen werden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen und mit Aqua bidest. beziehungsweise DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt. Bei der Verwendung nicht autoklavierbarer Chemikalien wie z.B. Methanol, Glucose, Triton-X-100 oder Tween 20 werden die Lösungen bei Bedarf durch Sterilfiltration ( $\varnothing$  0,2  $\mu$ m) entkeimt.

#### 3.1.1 Allgemeine Gebrauchslösungen

- 6x Ladepuffer für DNA-Auftrennung (Orange G)  
0.25 % (w/v) Orange G, 40 % (w/v) Saccharose in Aqua bidest., bei 4°C lagern.
- DEPC-H<sub>2</sub>O  
1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht in einem Liter Aqua bidest. schütteln und anschließend durch Autoklavieren inaktivieren.
- TAE-Puffer  
40 mM Tris/Acetat pH 8.3, 1 mM EDTA.
- TE-Puffer  
10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH auf 7.5 einstellen.
- 1x PBS  
137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH auf 7.5 einstellen.
- PTW  
1x PBS, 0.1 % (v/v) Tween 20.

#### 3.1.2 Entwicklungsbiologie

- Betäubungslösung  
2.5 g/l Aminobenzoesäure-Ethylester in Aqua bidest. lösen, pH auf 7.4 einstellen.
- Cysteinhydrochloridlösung 2 % (w/v)  
Cystein in 0.1x MBSH, mit 10 M NaOH, pH auf 8.2 einstellen.
- 1x MBSH (Modified Barth's Solution)  
880 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 100 mM KCl, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 3.3 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 100 mM HEPES, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, pH auf 7.4 einstellen.

- 1x MEM  
100 mM MOPS pH 7.4, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, DEPC-H<sub>2</sub>O.
- MEMFA  
1x MEM, 0.1 % (v/v) Tween 20, 3.7 % (v/v) Formaldehyd, DEPC-H<sub>2</sub>O.
- Nilblau-Färbelösung  
Nilblau-Sulfat 0.01 % (w/v) über Nacht in 0.5 M Phosphatpuffer pH 7.8 lösen und die noch vorhandenen Partikel durch einen Filter abtrennen.

### 3.1.3 *In situ* Hybridisierung

- Antikörperlösung für Anti-Digoxigenin Antikörper  
0.02 % (v/v) Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente in Blockierungspuffer.
- Alkalische Phosphatase-Puffer (AP-Puffer)  
0.1 mM Tris/HCl pH 9.5, 0.05 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl, 0.1 % (v/v) Tween 20 in DEPC-H<sub>2</sub>O.
- Blockierungspuffer  
2 % BMB (v/v) in 1x MAB.
- 5x BMB  
10 % (w/v) Blockierungsreagenz in 5x MAB.
- 50x Denhardt's Lösung  
1 % (w/v) BSA, 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP), 1 % (w/v) Ficoll 400, in DEPC-H<sub>2</sub>O.
- Hybridisierungspuffer  
50 % (v/v) deionisiertes Formamid, 5x SSC, 2% (v/v) Torula RNA-Lösung, 0.1 % (v/v) Heparinlösung, 0.1 % (v/v) Tween 20, 0.1% (w/v) CHAPS, 5 mM EDTA in 1x Denhardt's Lösung.
- 5x MAB  
0.5 M Maleinsäure, 0.75 M NaCl, auf pH 7.5 einstellen.
- NBT/BCIP-Färbelösung  
15 µl NBT, 15 µl BCIP in 10 ml AP-Puffer.
- 20x SSC  
3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat pH 7.0 in 1x PBS.
- Waschlösung 1  
50 % (v/v) Formamid, 2x SSC, 0.1 % (v/v) Tween 20, DEPC-H<sub>2</sub>O.

- Waschlösung 2  
25 % (v/v) Formamid, 2x SSC, 0.1 % (v/v) Tween 20, DEPC-H<sub>2</sub>O.
- Waschlösung 3  
12.5 % (v/v) Formamid, 2x SSC, 0.1 % (v/v) Tween 20, DEPC-H<sub>2</sub>O.
- Waschlösung 4  
2x SSC, 0.1 % (v/v) Tween 20, DEPC-H<sub>2</sub>O.
- Waschlösung 5  
0.2x SSC, 0.1 % (v/v) Tween 20, DEPC-H<sub>2</sub>O.

### 3.1.4 Mikrobiologie

- Ampicillin-Stammlösung (1000x)  
100 mg Ampicillin pro ml Aqua bidest., bei -20°C lagern.
- Kanamycin-Stammlösung (1000x)  
100 mg Kanamycin pro ml Aqua bidest., bei -20°C lagern.
- LBAMP/KAN-Agar-Platten 1.5 % (w/v)  
Select Agar in LB-Medium lösen und autoklavieren. Nach Abkühlen auf 55°C 1 ml Ampicillin- bzw. Kanamycin-Stammlösung pro Liter zugeben und in Petrischalen (Ø 9.4 cm) gießen. Die erkalteten Platten werden kopfüber bei 4°C gelagert.
- LBAMP/KAN-Medium  
1 ml Ampicillin- oder Kanamycinlösung pro Liter LB-Medium.
- LB-Medium (Luria Bartani Medium)  
10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH auf 7.5 einstellen.
- Lysispuffer für DNA-Präparation im Kleinmaßstab  
0.2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS.
- Neutralisationspuffer für DNA-Präparation im Kleinmaßstab  
2.8 M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>, pH mit Essigsäure auf 5.1 einstellen.
- Resuspensionspuffer für DNA-Präparation im Kleinmaßstab  
50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 100µg/ml RNase A.
- SOB-Medium  
20 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 0.5 g NaCl, 2.5 g MgCl<sub>2</sub>, ad 1 l Aqua bidest., pH auf 7.0 einstellen.
- SOC-Medium  
SOB, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose.

- TFB1  
30 mM  $C_2H_3KO_2$ , 10 mM  $CaCl_2$ , 50 mM  $MnCl_2$ , 100 mM  $RbCl$ , 15% (v/v) Glycerin, pH mit Essigsäure auf 5.8 einstellen, bei Raumtemperatur lagern.
- TFB2  
100 mM MOPS, 75 mM  $CaCl_2$ , 10 mM  $RbCl$  und 15% (v/v) Glycerin, pH mit 1 M KOH auf 6.5 einstellen, bei Raumtemperatur lagern.

### 3.1.5 Proteinbiochemie

- Blockierungspuffer für Antikörper  
5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST.
- Coomassie-Entfärbelösung  
45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure.
- Coomassie-Färbelösung  
10 % (v/v) Methanol, 8 % (v/v) Essigsäure, 0.1 % (v/v) Coomassie Brilliant Blue R 250.
- Blotpuffer für Western Blot  
25 mM Tris/Base, 1.5 % Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol.
- Elektrophorese-Laufpuffer für SDS-PAGE  
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS.
- RIPA-Puffer  
50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM  $CaCl_2 \cdot H_2O$ , 1 % (v/v) Triton-X, 1 % (w/v) Natriumdesoxycholate, 0.1 % (w/v) SDS, 1/2 Tablette Complete Protease Inhibitor auf 25 ml RIPA-Puffer, zwei Monate bei  $-20^\circ C$  lagerbar.
- 5x SDS-Ladepuffer  
0.5 M Tris/HCl pH 6.8, 10 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptopropandiol, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau.
- TBST  
50 mM Tris/HCl pH 7.3, 50 mM NaCl, 0.05 % Tween 20.
- Transferpuffer  
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol.

### 3.1.6 Präparation von Imaginalscheiben

- PBX

1x PBS, 0.1 % (v/v) Triton-X-100.

- Fixativ

4 g Paraformaldehyd bei circa 55°C (darf 60°C nicht überschreiten!) in 60 ml Aqua bidest. und 200 µl 1 M NaOH lösen und filtrieren, dann 10 ml 10x PBS hinzugeben und mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen; pH mit 1 M NaOH oder HCl auf 7.4 einstellen, aliquotieren und Lagerung bei -20°C.

- Blockierungspuffer

1x PBS, 0.4 % (v/v) Pferdeserum.

- Mowiol-Gebrauchslösung

6 g Glycerin, 2.4 g Mowiol 4-88, 12 ml 0.2 M Tris/HCl (pH 8.5), 25 mg DABCO pro ml Lösung.

### 3.1.7 Zellbiologie

- DMEM Komplettmedium für HEK293

10 % hitzeinaktiviertes FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin in DMEM

- HeBS (10x)

1.36 M NaCl, 0.05 M KCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 M HEPES, 1 % Glucose, pH mit 1 M NaOH auf 7.1 einstellen.

- HeBS (1x)

aus 10x HeBS herstellen, pH mit 1 M NaOH auf 7.12 einstellen. Im Anschluss steril filtrieren.

## 3.2 Arbeitsmaterialien und Konstrukte

### 3.2.1 Verwendete Konstrukte

Klonierungsvektoren

- pCS2myc (Rupp, München)
- pGEM® -T (Promega, Mannheim)
- pUAST (Boutros, Heidelberg)

Injektion in *Xenopus laevis*

- XTcf-1 in pCS2myc (Gradl, Karlsruhe)

- XLef-1 in pCS2myc (Gradl, Karlsruhe)
- XTcf-3 in pCS2myc (Gradl, Karlsruhe)
- XTcf-4 in pCS2myc (Gradl, Karlsruhe)
- HyTcf in pCS2myc (vorliegende Arbeit)
- Pan in pCS2myc (vorliegende Arbeit)
- Pop in pK-Myc-C3 (Masako, Budweis, CZ)
- XTcf-1 $\Delta$ C in pCS2myc (Hamdi, Karlsruhe)
- XTcf1/3 in pCS2myc (Strietz, Karlsruhe)
- XTcf3/1 in pCS2myc (Strietz, Karlsruhe)
- 111H in pCS2myc (Morath, Karlsruhe)
- 11HH in pCS2myc (Morath, Karlsruhe)
- H111 in pCS2myc (Morath, Karlsruhe)
- HH11 in pCS2myc (Morath, Karlsruhe)
- HHH1 in pCS2myc (Morath, Karlsruhe)

#### GST-Pulldown Assay

- $\beta$ -Catenin-GST (Menke, Ulm)
- GFP-GST in pGEX-5 (Marg et al., 2004)
- DCOH-GST in pETM-30 (Ghogmu et al., 2006)

#### Injektion in *Drosophila melanogaster*

Alle Injektionen in *Drosophila melanogaster* wurden von BestGene Inc. (Chino Hills, USA) durchgeführt.

- XLef-1 in pUAST (vorliegende Arbeit)
- XTcf-1 in pUAST (vorliegende Arbeit)
- XTcf-3 in pUAST (vorliegende Arbeit)
- XTcf-4 in pUAST (vorliegende Arbeit)

#### Plasmide zur *in situ* Sondenherstellung

- |                   | Linearisierung | Transkription |                            |
|-------------------|----------------|---------------|----------------------------|
| • XCirp in pGEM-T | EcoRI          | Sp6           | (van Venrooy et al., 2008) |
| • XEn2 in pBSK    | NotI           | T3            | (Hemmati-Brivanlou,        |



- Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim)
- Pure Yield™ Plasmid Midiprep (Promega, Mannheim)
- QuickChange™ Site directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
- mMMESSAGE mMACHINE™ High Yield Capped RNA Transcription Kit (Ambion Ltd, Warrington, UK)
- ECL+Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, München)
- pGEM®-T Easy Vector System (Promega, Mannheim)

### 3.2.5 Antikörper

Tabelle 3. 1: Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

Primäre Antikörper	Wirt	Verdünnung	Referenz
$\alpha$ -c-Myc 9E10	Maus	unverdünnt	Hybridoma-Zellkulturüberstand
$\alpha$ -dll	Ziege	1/50	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
$\alpha$ -Digoxigenin-AP AP konjugiert	Schaf	1/3000	Roche Diagnostics, Mannheim
Sekundäre Antikörper	Wirt	Verdünnung	Referenz
D $\alpha$ G-Cy3 Cy-3 konjugiert gerichtet gegen Ziege IgG	Esel	1/100	Dianova GmbH, Hamburg
G $\alpha$ M-POD POD konjugiert gerichtet gegen Maus IgG	Ziege	1/5000	Dianova GmbH, Hamburg
G $\alpha$ Rat-POD POD konjugiert gerichtet gegen Ratte IgG	Ziege	1/5000	Dianova GmbH, Hamburg

### 3.2.6 Bakterien

*E. coli* Stamm JM109 (Promega, Mannheim)

Genotyp: endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (rk-mk+) relA1 supE44  $\Delta$ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZ $\Delta$ M15]

*E. coli* Stamm BL21-AI (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Genotyp: *F-ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-) gal dcm araB::T7RNAP-tetA*

### 3.2.7 Zelllinien

HEK293 (human embryonic kidney cells) Humane Nierenepithelzellen

### 3.2.8 Enzyme

- Alkalische Phosphatase (AP) (Promega, Mannheim)
- DNase I (Ambion Ltd, Warrington, UK)
- Go-*Taq* DNA-Polymerase (Promega, Mannheim)
- Restriktionsendonukleasen (Promega, Mannheim)
- T4 DNA-Ligase (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan)
- Turbo *Pfu*-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

### 3.2.9 Chemikalien

Alle nicht explizit aufgeführten Reagenzien wurden über folgende Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), Fluka Chemie GmbH (Taufkirchen), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

- Agarose (Biozym, Rockland, USA)
- Select Agar (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Ammoniumpersulfat (APS) (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Bactotrypton (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- BM Purple AP Substrat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
  
- Complete, EDTA-freie Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Desoxyribonukleotide (Promega GmbH, Mannheim)
- Dextran, Oregon Green® 488 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Cambrex, Belgien)
- 2-log DNA Marker (New England Biolabs, Frankfurt)
- Fetal Calf Serum (FCS) (Invitrogen GmbH, München)
- Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell)
- Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva, Heidelberg)
- NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- PageRuler™ Plus (Prestained Protein Ladder) (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot)
- Penicillin-Streptomycin-Lösung (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Pferdeserum (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Protein G Sepharose (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Tween20 (Serva, Heidelberg)
- Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

### 3.2.10 Geräte

- Begasungsbrutschrank für Zellkultur (Thermo Fisher Scientific Inc., Steri. Cycle CO<sub>2</sub> Incubator, Waltheim, USA)
- Binokular
  - o LeicaL2 (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
  - o LeicaS6E (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
- Brutschrank, APT Line Serie BD/ED/FD (Binder, Tuttlingen)
- Dokumentation
  - o Firecam DFC 420C (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
  - o Digitalkamera Retiga Color 12 bit (QImaging, Burnaby, Kanada)
- Feinwaage (Sartorius, Göttingen)
- Flachbettgelelektrophoresekammern (Amersham, Freiburg)
- Fliegenanlage
  - o Kaltlichtquelle, KL1500LCB (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
  - o Inject+Matic Sleeper (INJECT+MATIC, Genf, Schweiz)
  - o Binokular Leica MST (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
- Fluoreszenzbinokular
  - o Leica S8AP0 (Leica Mikrosysteme, Bensheim)

- 
- o Kaltlichtquelle KL 1500 LDD (Schott Glas, Wiesbaden)
  - o Elektrische Vorschaltquelle für Quecksilber-Kurzbogenlampe (Leistungselektronik Jena, Jena)
  - Fluoreszenzmikroskop DM IRE2 (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
    - o Elektronikbox Leica CTR MIC (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
    - o Digitalkamera C4742-95-12 ERG (Hamamatsu, Hamburg)
  - Folienschweißgerät SEVERIN Folio (SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern)
  
  - Geldokumentationsanlage
    - o Dianall (Raytest, Straubenhardt)
    - o Kühlbrutschrank BK-600 Heraeus (Kendro, Langenselbold)
  - Micropipette Puller Model P-97 (Sutter Instruments, Novato, USA)
  - Mikroinjektionsanlage
    - o Kaltlichtquelle, FiberOpticLightSource (Euromex, Arnheim, ND)
    - o EK-1 Membranpumpe MZ2 (Vacuubrand, Wertheim)
    - o Mikromanipulator M1 (H.Saur Laborbedarf, Reutlingen)
    - o Pneumatische Picopumpe PV820 (H.Saur Laborbedarf, Reutlingen)
    - o Stereomikroskop MIC1630ZS (Euromex, Arnheim, ND)
  - Mikrowelle R-2J28 (Sharp Electronics, Hamburg)
  - PAGE-Apparatur Mini Protean II™, Blotapparatur Mini Trans Blot (Bio-Rad, München)
  - PCR Cycler, iCycler (Bio-Rad, München)
  - pH-Meter (WTW, Weilheim)
  - Photometer, Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg)
  - Plattformschüttler Unimax 2010 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
  
  - Schüttelinkubator, Orbital Shaker (Thermo Forma, Marietta, USA)
  - Sicherheitsschrank (Düperthal Sicherheitstechnik GmbH & Co. KG, Karlstein)
  
  - Software
    - o Software, Firecam (Freeware v.M.W.Davis, USA)
    - o Software, Openlab 3.1.1 (Openlab, Heidelberg)

- o Software, ApE 1.12 (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
- Sterilbank Microflow2 (NUNC, Roskilde, Dänemark)
- Thermoschüttler (Thermo Forma, Dreieich)
- Ultra-Low Temperature Gefrierschrank (New Brunswick Scientific Inc., Waltham, USA)
- Vakuumpumpe Laboport N811KT.18 (KNF Neuberger GmbH, Freiburg)
- Waagen
  - o Analysenwaage BP 221S (Sartorius AG, Göttingen)
  - o Präzisionswaage PT 310 (Sartorius AG, Göttingen)
- Wasserbad (Memmert, Schwabach)
- Zentrifugen
  - o Biofuge fresco (Kendro, Langenselbold)
  - o Multifuge®3S-R (Thermo Scientific, Karlsruhe)

### 3.2.11 Fliegenfutter

Das Fliegenfutter wurde von Chaudhary, Heidelberg (Arbeitsgruppe Boutros, DKFZ) bezogen.

### 3.2.12 Fliegenstämme

**Tabelle 3.2: Verwendete Fliegenstämme.** <sup>†</sup>M/F: Geschlecht der G1 Generation. \*Ch3: alle über dem Balancer Tm3Sb. <sup>1</sup>: Bloomington *Drosophila* stock center.

Gal4-Linien	Insertionsort	Information	Referenz
EnGFPGal4	II. Chromosom	-	Neufeld und Edgar, 1998
GmrGal4	II. Chromosom	homozygot	Hay et al., 1997
MS1096Gal4	X Chromosom	homozygot	Basler, Zürich, Schweiz
Vestigial <sup>QE</sup> Gal4	II. Chromosom	QE: Quadrant Enhancer	BDSC <sup>1</sup> ; Stock-Nr.: 8230
UAS XTcf-Linien	Insertionsort	Name	Referenz
UAS XLef-1	III. Chromosom	8033-1-M1 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA

UAS XTcf-Linien	Insertionsort	Name	Referenz
UAS XLeF-1	III. Chromosom	8033-1-M2 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XLeF-1	III. Chromosom	8033-1-M5 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-1	III. Chromosom	8590-1-M2 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-1	III. Chromosom	8590-1-M2 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-1	III. Chromosom	8590-1-M5 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-1	III. Chromosom	8590-1-F7 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-1	III. Chromosom	8590-1-F9 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-3	III. Chromosom	8033-2-M1 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-3	III. Chromosom	8033-2-M4 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-3	III. Chromosom	8033-2-M5 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-3	III. Chromosom	8033-2-M7 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-4	III. Chromosom	8033-3-M1 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-4	III. Chromosom	8033-3-M2 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-4	III. Chromosom	8033-3-M4 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA
UAS XTcf-4	III. Chromosom	8033-3-M6 <sup>+</sup> -Ch3*	BestGene Inc., Chino Hills, USA

---

UAS-Linien	Insertionsort	Information	Referenz
UAS LacZ	III. Chromosom		BDSC <sup>1</sup> ; Stock-Nr.: 8530
UAS Pan	III. Chromosom		BDSC <sup>1</sup> ; Stock-Nr.: 4838

## 4. Methoden

### 4.1 Entwicklungsbiologische Methoden

#### 4.1.1 Haltung von *Xenopus laevis*

Die ungefähr 400 Frösche des zoologischen Instituts werden getrennt nach Geschlechtern in Gruppen von maximal zehn Tieren gehalten. Die Becken enthalten circa 100 Liter zirkulierendes Wasser, welche mittels UV-Bestrahlung und eines Bakterienfilters entkeimt werden. Eine optimale Haltung der Tiere wird bei einer Wassertemperatur von 18°C bis 20°C ermöglicht. Über eine Zeitschaltuhr wird die tägliche Lichtdauer von 12 Stunden geregelt. Als Futter dient einmal in der Woche ein spezielles Trockenfutter und zusätzlich einmal pro Woche klein geschnittenes Rinderherz.

Zur Vermeidung von Hautreizungen und Infektionen werden die Weibchen über Nacht in ein separates Becken gesetzt, welches eine Salzkonzentration von 3 g/l enthält, dann werden sie wieder in die Anlage zurückgesetzt. Die Weibchen werden erst nach einer dreimonatigen Schonfrist erneut zur Eiablage stimuliert.

#### 4.1.2 Eiablage

Um die Eiablage zu stimulieren wird den Weibchen mittels subkutaner Injektion in den dorsalen Lymphsack das humane Hormon Choriongonatropin (hCG) verabreicht. In Abhängigkeit des gewünschten Ablegezeitraums wird die Zeit und die injizierte Menge des Hormons gewählt. Soll die Eiablage am nächsten Vormittag erfolgen, müssen am Vorabend (circa 14-16 Stunden vor Eiablage) 600 Einheiten hCG verabreicht werden. Um die Eiablage für den nächstfolgenden Nachmittag zu induzieren, müssen am Vorabend 50 Einheiten hCG und am nächsten Morgen 600 Einheiten hCG gespritzt werden. Zur Eiablage selbst werden die Weibchen im Froschgriff gehalten und die Lendenregion in Richtung Kloake massiert. Die aus der Kloake austretenden Eier werden in einer Petrischale aufgefangen. Die Eier sollten nur viermal im stündlichen Rhythmus vom selben Weibchen gewonnen werden. Im Anschluss folgt eine dreimonatige Ruhephase dieser Tiere. Es werden nur gesunde Eier mit normal entwickelter Gallerthülle verwendet.

#### **4.1.3 Testisextraktion**

Zur Betäubung wird eiskalte 0.25 % (v/v) Aminobenzoessäure-Ethylester-Lösung verwendet, in diese werden die Männchen umgesetzt. Nach 20-25 Minuten kann durch schnelles Durchtrennen der Halswirbelsäule das narkotisierte Männchen getötet werden. Mit einer Kanüle wird zusätzlich der Rückenmarkskanal durchbohrt. Die Gewinnung der Hoden erfolgt durch einen medianen Schnitt entlang der Bauchdecke. Die hellgelben ovalen Hoden befinden sich im dorsalen Fettgewebe ventral der Nieren.

Nach Präparation und Entfernung der Blut- und Fettreste können sie in 1x MBSH bei 4°C gelagert werden. So können aus ihnen für maximal sieben Tage Spermien guter Qualität gewonnen werden.

#### **4.1.4 *In vitro* Fertilisation**

Um eine gleichmäßige und synchrone Entwicklung möglichst vieler Eier zu erreichen, erfolgt die Befruchtung per *in vitro* Fertilisation. Zur Befruchtung der Eier wird ein Drittel des Hodens in 1x MBSH mazeriert. Von dieser Lösung werden 100 µl auf das Gelege gegeben. Um eine bestmögliche Mobilität der Spermien zu erreichen, wird diese Lösung mit 900 µl sterilem Aqua bidest. verdünnt. Nach ungefähr 20 Minuten zeigt sich eine erfolgreiche Befruchtung darin, dass die Eier ihre animale pigmentierte Seite nach oben drehen.

#### **4.1.5 Entfernen der Gallerthülle**

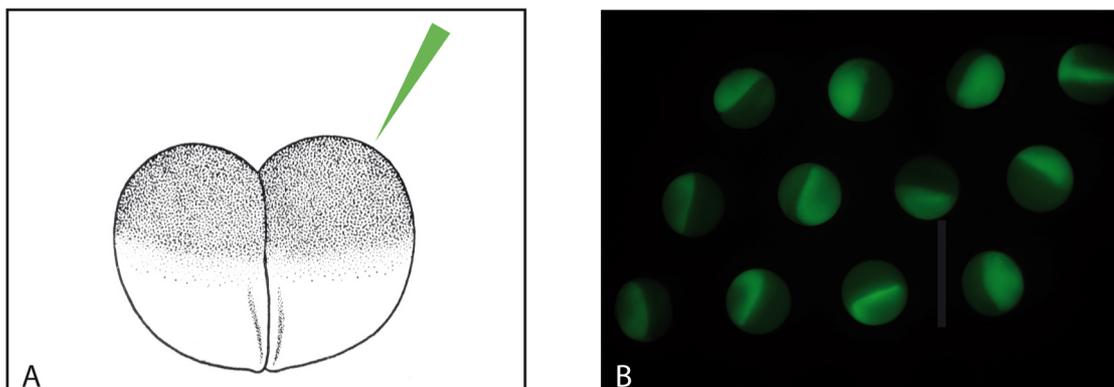
Nach frühestens einer Stunde aber vor der ersten Zellteilung wird die Gallerthülle der Embryonen entfernt. Dies erfolgt mittels Zugabe von 2 % Cysteinhydrochlorid (pH 8.2). Das Vereinzeln kann mechanisch durch Rühren mit einer Pipettenspitze unterstützt werden. Liegen die Eier vereinzelt vor werden sie dreimal mit 0.1x MBSH gewaschen. Das Gelege wird mit 0.1x MBSH überschichtet um Austrocknung zu vermeiden.

#### **4.1.6 Anfärben von unpigmentierten Eiern**

Im Falle von unpigmentierten Eiern ermöglicht eine 10-minütige Färbung mit Nilblau-Färbelösung die Beobachtung der Entwicklung. Nach dem Färben wird das Gelege mehrfach mit 0.1x MBSH gewaschen.

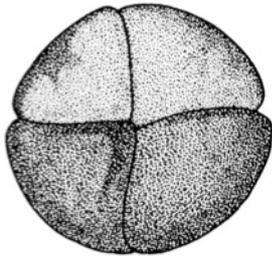
#### 4.1.7 Mikroinjektion

Die extrakorporale Entwicklung von *Xenopus laevis* ermöglicht eine gute Zugänglichkeit der Eier für die Mikromanipulation. Abhängig vom jeweiligen Experiment können in die Eier *antisense* Morpholino Oligonukleotide (MO), DNA oder mRNA injiziert werden und somit Funktionsgewinn- und Funktionsverlustexperimente durchgeführt werden. Zunächst wird die injizierte Menge auf ein Volumen von 4 nl geeicht. Dies erfolgt mittels eines genormten Platingitters. Dabei hängt das injizierte Flüssigkeitsvolumen vom Durchmesser der Kapillarenöffnung und der Injektionsdauer ab. Die Menge an Molekülen der Einzelkomponenten wird entsprechend dem durchzuführenden Versuch angepasst. Auch das Entwicklungsstadium und die Blastomere in die injiziert wird, hängen vom jeweiligen Experiment ab. Für Depletions- und Überexpressionsstudien mit anschließender Ganzkeimfärbung wird auf der Seite des animalen Pols in eine Blastomere im Zweizell-Stadium injiziert. Da sich die beiden Blastomeren zu den zukünftigen Körperhälften entwickeln, ist ein direkter Vergleich von uninjektierter und injizierter Seite möglich. Zur Kontrolle des Injektionsortes wird ein fluoreszierender Farbstoff, FITC-Dextran (Endkonzentration 1/25 entspricht 4 pg) koinjiziert (Abb. 4.1) So wird eine Sortierung von einseitig im Zweizell-Stadium injizierten Embryonen nach rechts/links injizierten Embryonen ab dem frühen Neurulastadium möglich. Dabei werden für die nachfolgenden Experimente nur eindeutig fluoreszierende Embryonen weiterverwendet. Diese werden in 0.1x MBSH bis zum gewünschten Entwicklungsstadium kultiviert. Die Einteilung der Entwicklungsstadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967).



**Abbildung 4.1: Mikroinjektion** A: Die Injektion für Markergenexpressionsanalysen erfolgt in eine Blastomere auf Seite des animalen Pols im Zweizell-Stadium. B: Im Neurulastadium kann nach rechts/links injizierten Embryonen sortiert werden.

Soll eine Analyse mittels Western Blot erfolgen, wird in beide Blastomeren des Zweizell-Stadiums injiziert. Im Vierzell-Stadium können bereits ventrale und dorsale Bereiche des Embryos unterschieden werden. Bei den beiden kleineren und weniger stark pigmentierten Blastomere handelt es sich um die dorsalen, die dunkleren größeren Blastomere sind die ventralen Blastomere (Abb. 4.2).



**Abbildung 4.2: *Xenopus laevis* Embryo im Vierzell-Stadium.** Die dorsalen Blastomeren unterscheiden sich durch ihre schwächere Pigmentierung und ihre Größe von den ventralen Blastomeren. Gezeigt ist die animale Ansicht.

Daher kann zur Phänotypenanalyse von konvergenten Extensionsbewegungen oder Achsenbildung dorsal bzw. ventral in die Marginalzone injiziert werden.

#### 4.1.8 Gen-Suppression durch *antisense* Morpholino Oligonukleotide

Zur Beantwortung vieler Fragestellungen ist ein spezifisches Herunterregulieren der Genexpression notwendig. Bei *Xenopus laevis* ist ein vollständiger knockout eines Genes, aufgrund des pseudo tetraploiden Genoms, nahezu unmöglich. Daher kommen oft sogenannte *antisense* Methoden zur Anwendung. In der vorliegenden Arbeit wurden für einen spezifischen knockdown *antisense* Morpholino Oligonukleotide (Morpholino) verwendet. Bei Morpholinos handelt es sich um chemisch modifizierte Nukleinsäure-Analoga mit einem heterozyklischen Morpholinring. Nukleinsäuren dagegen besitzen ein Ribose- oder Desoxyribose-Rückgrat. Außerdem zeichnen sich die Phosphatbrücken durch eine Amidatgruppe aus. Dies führt dazu, dass Morpholinos im Gegensatz zu Nukleinsäuren ungeladen sind und daher kaum mit intrazellulären Proteinen reagieren. Sie weisen außerdem eine hohe Stabilität auf, da sie von endogenen Nukleasen nicht erkannt werden können. Morpholinos werden in der Regel so konzipiert, dass sie im Bereich des Startcodons an die endogene Ziel-RNA hybridisieren. So entsteht ein RNA-Doppelstrang, welcher nicht mehr an Ribosomen binden kann. Die Translation wird nicht initiiert. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sich die Morpholinokonzentration mit jeder Zellteilung im sich entwickelnden Embryo verdünnt.

#### 4.1.9 Embryonenpflege und Fixierung

Die Entwicklungszeit der Embryonen ist temperaturabhängig. Somit kann die Geschwindigkeit der Entwicklung durch Wahl einer Inkubationstemperatur zwischen 14°C und 25°C beeinflusst werden. Bei niedrigen Temperaturen verläuft die Entwicklung langsamer, bei höheren Temperaturen entsprechend schneller ab. Die Einteilung der Entwicklungsstadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967). Abgestorbene und unbefruchtete Eier müssen entfernt werden, außerdem wird das Kulturmedium 0.1x MBSH regelmäßig gewechselt. Haben die Embryonen das gewünschte Stadium erreicht, werden sie mit MEMFA für eine Stunde fixiert und im Anschluss in einer aufsteigenden Reihe entwässert und in 100 % (v/v) Methanol überführt. Sie können bei -20°C gelagert werden.

#### 4.1.10 Ganzkeimfärbung oder *in situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung ermöglicht die Analyse des zeitlichen und räumlichen Expressionsprofils eines bestimmten Gens. Hierbei hybridisieren spezifische Antigen-markierte *antisense* RNA-Sonden an die endogene RNA von Interesse. Diese komplementären RNA-Sonden werden ausgehend von der linearisierten Plasmid-DNA mittels RNA-Polymerasen durch *in vitro* Transkription hergestellt. Da es sich um Digoxigenin markierte Sonden handelt, lässt sich die Expression mittels einer Farbreaktion nachweisen. Bei Digoxigenin handelt es sich um ein aus *Digitalis purpurea* isoliertes Steroid, das nur in den Blüten und Blättern dieser Pflanzen vorkommt. Da sich das Digoxigenin am C<sub>5</sub> der Uridinbase befindet, wird es bei der *in vitro* Transkription in die RNA eingebaut. Der Digoxigenin-spezifische Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase verbunden, die das Substrat NBT/BCIP (4-Nitroblau-Tetrazolium/5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) zu einem blauen Präzipitat umsetzt.

Durch die Lagerung der fixierten Embryonen in 100 % (v/v) Methanol wird eine ausreichende Zugänglichkeit für die Sonde und den Antikörper ermöglicht. Der erste Schritt ist eine Rehydratisierung mittels einer absteigenden Methanolreihe (75 %, 50 %, 25 %). Im Anschluss wird dreimal für 5 Minuten mit PTW gewaschen. Nun wird der Hybridisierungspuffer dazugegeben. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wird nun für 4 Stunden bei 62°C bis 65°C prähybridisiert. Im Anschluss erfolgt die Zugabe der RNA-Sonde (1 µg/ml). Die Inkubation mit RNA-Sonde wird über Nacht durchgeführt. Auch hier werden hohe Temperaturen von 62°C bis 65°C

gewählt, um unspezifische Bindungen der RNA-Sonde zu vermeiden. Am darauf folgenden Tag wird die verwendete RNA-Sonde abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Mehrmaliges Verwenden ist problemlos möglich. Nun folgen fünf Waschschriffe bei  $62^{\circ}\text{C}$  bis  $65^{\circ}\text{C}$  mit SSC-, Formamid-, und Tween-haltigen Waschlösungen in unterschiedlichen Volumina. Nach jeweils zwei 5-minütigen Waschschriffen mit PTW und MAB wird für zwei Stunden mit MAB-BMB 2 % blockiert, um ein unspezifisches Binden des Antikörpers im folgenden Schritt zu vermeiden. Der Anti-Digoxigenin-Antikörper wird im Verhältnis 1/3000 in MAB-BMB 2 % eingesetzt, die Inkubation erfolgt für vier Stunden bei Raumtemperatur. Es folgt ein Waschschriff mit MAB in 50 ml Reaktionsgefäßen. Dieser wird über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  und unter ständigem Schütteln durchgeführt. Im Anschluss werden die Embryonen für zweimal fünf Minuten mit Alkalischem Phosphatase-Puffer gewaschen. Nun wird die Färbereaktion mit NBT/BCIP durchgeführt. Ist die gewünschte Blaufärbung erreicht, wird die Reaktion mit sterilem Wasser gestoppt. Waschen in 100 % (v/v) Methanol entfernt ungewollte Hintergrundfärbungen. Es folgt eine Rehydratisierung über eine absteigende Methanolreihe (75 %, 50 %, 25 %, Millipore-Wasser). Danach wird für eine Stunde mit MEMFA nachfixiert. Die Lagerung der Embryonen erfolgt in 1x MEM bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

## **4.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden**

### **4.2.1 Fällung und Reinigung von DNA/RNA**

Zur Fällung von Nukleinsäuren wird zur Lösung das doppelte Volumen absoluten Ethanols sowie ein Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) gegeben. Nach dem Durchmischen wird für mindestens eine Stunde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefällt. Um die Nukleinsäuren zu sedimentieren, wird im Anschluss bei 17 900 X g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, der Niederschlag wird mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Es folgt ein weiterer 30-minütiger Zentrifugationsschriff, in dessen Anschluss der Überstand wiederum verworfen wird. Der Niederschlag wird bei Raumtemperatur getrocknet und danach in einem möglichst kleinen Volumen sterilem Aqua bidest. bzw. DEPC-Wasser resuspendiert.

Alternativ kann auch mit Isopropanol gefällt werden, dabei wird das 0,7-fache Volumen zugegeben, der Waschschriff erfolgt ebenfalls mit 70 % (v/v) Ethanol.

Eine Reinigung von Nukleinsäuren kann auch mittels „Probe Quant G50 Micro Columns“ (Amersham) erfolgen, dabei wird die Nukleinsäure über eine Säule mittels Größenausschlusschromatografie aufgereinigt. Dies erfolgt gemäß den Herstellerangaben. Durch Abtrennung störender Nukleotide kann hierbei ein hoher Reinheitsgrad erzielt werden.

#### **4.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

Eine ungefähre Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen kann durch Abschätzung im Agarosegel erfolgen. Dabei wird ein Intensitätsvergleich der Bandenstärke der Nukleinsäure zu den Banden des Größenstandards herangezogen.

Zur genauen Bestimmung der Quantität von Nukleinsäuren wird eine photometrische Messung der Absorption durchgeführt. Hierbei macht man sich zunutze, dass Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 260$  nm aufweisen. Das Ausmaß der Absorption wird als Extinktion (E) bezeichnet und ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz proportional zur Schichtdicke und zur Konzentration der absorbierenden Substanz. Eine Extinktion von  $E = 1$  bei  $\lambda = 260$  nm entspricht  $50 \mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA bzw.  $40 \mu\text{g/ml}$  RNA. Da Proteine ihr Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 280$  nm aufweisen, lassen sich durch die Berechnung des Quotienten aus  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$  ergebnisverfälschende Verunreinigungen zuverlässig abschätzen. Für nicht verunreinigte Nukleinsäurelösungen ergibt sich daher aus dem Quotienten von  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$  ein Wert zwischen 1.8 und 2.

#### **4.2.3 DNA-Restriktionsanalyse**

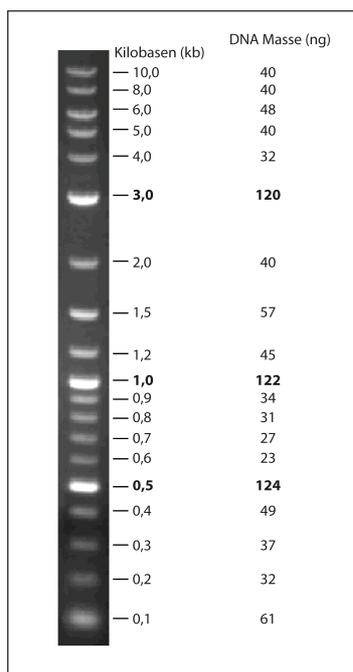
Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche DNA an spezifischen Positionen spalten können. Sie kommen natürlich in Bakterien vor und werden dort zur Phagenabwehr genutzt. Die Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen sind häufig palindromische Sequenzen von vier, sechs oder acht Basenpaaren. Dabei entstehen, je nach Enzym, entweder glatte Enden (blunt ends) oder Enden mit Überhängen, sogenannte klebrige Enden (sticky ends).

Zur Restriktionsanalyse wird häufig ein Ansatz mit  $20 \mu\text{l}$  Gesamtvolumen gewählt. Dabei wird  $1 \mu\text{g}$  DNA, zwei bis drei Einheiten des Restriktionsenzym, sowie ein Zehntel Volumen des zehnfach konzentrierten Puffers verwendet. Der Ansatz wird

nun für mindestens zwei Stunden oder über Nacht bei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubiert.

#### 4.2.4 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese

Aufgrund des Phosphatrückgrates weisen Nukleinsäuren eine negative Ladung auf. Dies ermöglicht ihre Auftrennung entsprechend der Größe im elektrischen Feld. Durch Anlegen einer Gleichspannung von 60-120 Volt wandern die DNA- oder RNA-Fragmente zur Anode. Je größer diese Fragmente sind, desto langsamer bewegen sie sich durch die Gelmatrix. Ein 2%-iges Agarosegel sollte für Fragmente bis zu einer Größe von 500 bp verwendet werden, für größere Fragmente wird ein 1%-iges Gel gegossen. Die Agarose wird entsprechend abgewogen und in TAE-Puffer gegeben, um sie zu lösen wird sie kurz aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf circa 50°C wird Ethidiumbromid im Verhältnis 1/10 000 zugegeben. Nun kann die Suspension in die Form gegossen werden. Durch Einstecken eines Kamms werden Taschen ausgespart, die zum Beladen des Gels vorgesehen sind. Ist das Gel ausgehärtet, wird es mit den mit 6x Ladepuffer versetzten Proben sowie dem Größenstandard beladen. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA-Fragmente, durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlängen  $\lambda=312$  nm oder  $\lambda=254$  nm fluoreszieren diese Fragmente. Das Bandenmuster kann nun mit dem gleichzeitig aufgetrennten Größenstandard verglichen und über eine Kamera dokumentiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der 2-log DNA Marker der Firma New England Biolabs verwendet (Abb. 4.3).



**Abbildung 4.3: DNA- Größenstandard zur Abschätzung der Größe und Masse.** Gezeigt ist der 2-log DNA-Marker der Firma New England Biolabs

#### 4.2.5 Präparative Flachbett-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die Auftrennung im Gel wird das zu isolierende DNA-Fragment mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion erfolgt mittels „Wizard SV® Gel and PCR Clean-Up System“ der Firma Promega (Mannheim) entsprechend den Herstellerangaben. Dabei werden pro 10 mg Gelstück 10 µl Membranbindelösung zugegeben. Das Lösen des Gelstücks erfolgt bei 50°C bis 65°C. Die Lösung wird nun auf eine Silikamembran gegeben und eine Minute bei 17 900 X g zentrifugiert. Die DNA bindet an diese Säule, wohingegen Gelreste und Verunreinigungen abgetrennt werden. Es folgen zwei Waschschriffe mit ethanolhaltiger Waschlösung. Um Ethanolrückstände vollständig zu entfernen, folgt ein einminütiger Zentrifugationsschritt. Die Säule wird nun in ein sauberes 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 50 µl sterilem Aqua bidest. oder DEPC-Wasser mittels Zentrifugation eluiert. Die DNA kann nun bei 4°C oder -20°C gelagert werden.

#### 4.2.6 Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende

Um die Religation linearisierter Vektormoleküle zu vermeiden, wird die Phosphatgruppe am 5'-Ende abgespalten. Dies erfolgt mittels alkalischer Phosphatase (AP). Es werden circa 3 µg der linearisierten Plasmid-DNA mit 1 µl (entspricht 1 unit) alkalischer Phosphatase verdaut. Dies erfolgt in einem Zehntel des 10x Reaktionspuffers und dem entsprechenden Volumen Aqua bidest.. Dieser Dephosphorylierungsansatz wird für 15 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgt eine erneute Zugabe der alkalischen Phosphatase (1 unit) und erneute Inkubation bei 37°C für 15-30 Minuten. Um die alkalische Phosphatase zu inaktivieren, wird der Ansatz 15 Minuten bei 65 °C inkubiert.

#### 4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei dem Vorgang der Ligation werden zwei DNA-Segmente an ihren 3'-Hydroxy- bzw. 5'-Phosphat-Enden durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verknüpft. Diese Bindung wird durch eine DNA-Ligase katalysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Vektoren pCS2myc sowie pUAST verwendet. Ein Ligationsansatz besteht aus einem Zehntel Volumen 10x Reaktionspuffer, 0.5 µl Ligase (entspricht circa 175 units) und dem linearisierten Vektor sowie dem DNA-Fragment, welches in den Vektor insertiert werden soll. Vektor sowie DNA-Fragment werden in unter-

schiedlichen molaren Verhältnissen zueinander eingesetzt. Um die geeignete Menge des DNA-Fragments abzuschätzen kann folgende Formel angewendet werden:

$$X \text{ ng Insert} = \frac{(Y_1 \text{ bp des Inserts}) \cdot (100 \text{ ng Vektor})}{(Y_v \text{ bp des Vektors})} \cdot \text{molares Verhältnis von Insert zu Vektor}$$

Die Reaktion erfolgt bei 16°C für vier Stunden oder bei 4°C über Nacht.

#### 4.2.8 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Zunächst werden Bakterien des *E.coli*-Stamms JM109 auf eine LB-Agar-Platte (ohne Antibiotika-Zusatz) ausgestrichen, diese wird bei 37°C für eine Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird eine Einzelkolonie dieser Platte in 5 ml Antibiotika-freiem 1x LB-Flüssigmedium angeimpft und bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Diese Übernachtskultur wird dann in 250 ml steriles 1x LB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> überführt und wiederum im Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. Während dieser Inkubation wird in regelmäßigen Abständen die optische Dichte gemessen. Erreicht diese einen Wert von 0.4 bis 0.6, werden die Zellen für fünf Minuten bei 4500 X g und 4°C zentrifugiert, nach Abnahme des Überstandes in 100 ml gekühltem TFB1 resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Im Anschluss wird erneut für fünf Minuten bei 4500 x g sowie 4°C zentrifugiert. Nun wird das entstandene Bakterienpellet in 10 ml kaltem TFB2 aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Jeweils 100 µl der Bakteriensuspension werden nun in ein Reaktionsgefäß aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80°C gelagert.

#### 4.2.9 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

Als Transformation bezeichnet man den Vorgang der Aufnahme von genetischem Material einer Zelle. Um diese zu induzieren erfolgt bei chemisch-kompetenten Bakterien ein Hitzeschock.

Es werden jeweils 50 µl Bakteriensuspension des chemisch-kompetenten *E.coli*-Stamms JM109 zu 1 µl Plasmid-DNA bzw. 2-10 µl Ligationsansatz gegeben. Es folgt ein 15-minütiger Inkubationsschritt, welcher auf Eis durchgeführt wird. Anschließend erfolgt dann der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad. Nun wird für fünf Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss 450 µl SOC-Medium zugegeben. Darauf folgt eine einstündige Ruhephase bei 37°C und 225 rpm. Die Bakterien

können nun auf selektiven LB-Agar-Platten ausgestrichen werden. Dabei verwendet man je nach zu erwartender Kolonienzahl 50-500  $\mu\text{l}$  der Suspension. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 4.2.10 Blau-Weiß-Selektion

Da nur Bakterienkolonien weiterverwendet werden, welche das rekombinante DNA-Molekül enthalten, müssen diese selektiert werden. Eine Möglichkeit diese Selektion durchzuführen ist die so genannte Blau-Weiß-Selektion.

Die multiplen Klonierungsstellen (multiple cloning site, MCS) vieler Klonierungsvektoren liegen innerhalb des kodierenden Bereichs des *lacZ* Gens. Dieses Gen kodiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase. Wurde nun kein Fragment in die MCS des Klonierungsvektors eingebaut, kann das *lacZ* Gen vom 5' liegenden *lac* Promoter ausgehend abgelesen werden und das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase wird exprimiert. Dieses Enzym nutzt das farblose X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid) als Substrat. Dieses wird in das entsprechende Indoxylderivat überführt, das an der Luft zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert. Zusätzlich wird der Agarplatte als Induktor das Lactose-Analogon IPTG (Isopropylthiogalaktosid) zugegeben. IPTG dient zur Reprimierung des LacZ Repressors und induziert somit die  $\beta$ -Galaktosidase Expression. Somit können Bakterien, die Plasmide ohne das gewünschte DNA-Fragment enthalten an der blauen Farbe erkannt werden. Ist das DNA-Fragment insertiert wird das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase nicht exprimiert, da der kodierende Bereich des *lacZ* Gens durch diese Insertion unterbrochen wurde. Diese Kolonien bleiben demnach weiß. Bevor also die Bakteriensuspension auf die Agarplatte gegeben wird, werden 50  $\mu\text{l}$  X-Gal-Lösung sowie 100  $\mu\text{l}$  IPTG ausplattiert und bei 37°C für eine Stunde getrocknet.

#### 4.2.11 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Kleinmaßstab nach Birnboim und Doly

Im Anschluss an die Transformation in den *E.coli* Stamm JM109 soll die Plasmid-DNA isoliert werden. Jeweils eine Bakterienkolonie wird in 3 ml LBAMP/KANA-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Das Verfahren der Isolation wurde von Birnboim und Doly (1979) etabliert. Zunächst wird dabei die Bakteriensuspension in Reaktionsgefäße überführt und fünf Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Zellniederschlag in 400  $\mu\text{l}$

RNase-haltigem Resuspensionspuffer gelöst. Das in diesem Puffer enthaltene EDTA bewirkt die Destabilisierung der Zellwände. Nun werden 400 µl alkalischer Lysis-puffer zugegeben. Da dieser Puffer NaOH sowie SDS enthält, werden Phospholipide und Membranproteine gelöst und DNA sowie Proteine denaturiert. Es wird nun dreimal invertiert, darauf folgt eine Inkubation für 30 Sekunden. Danach werden 400 µl hochsalziger Neutralisationspuffer hinzugefügt. Nach mehrmaligem Schwenken entsteht ein weißes Präzipitat. Dies resultiert aus der Komplexbildung von Zelltrümmern, Proteinen und chromosomaler DNA mit dem im Neutralisationspuffer enthaltenem Kaliumacetat. Die kleine rekombinante Plasmid-DNA bleibt jedoch gelöst. Um die Auftrennung noch weiter zu verbessern, folgt ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13 000 rpm. Nun werden vom klaren Überstand 800 µl abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wird mit 600 µl Isopropanol gefällt. Nach einer einminütigen Inkubation folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für 20 Minuten bei 13 000 rpm und 4°C. Der Überstand wird verworfen. Die Nukleinsäuren im Niederschlag werden mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Erneut wird bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert, nun für 10 Minuten. Der Überstand wird wieder verworfen. Nach kurzer Trocknungszeit werden die Nukleinsäuren in 50 µl Aqua bidest. resuspendiert und können bei -20°C gelagert werden.

#### **4.2.12 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab**

Eine Isolierung der Plasmid-DNA im Klein- aber auch im Mittelmaßstab kann auch mittels Kit erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurden dabei die Kits der Firma Promega (Mannheim) verwendet und die Präparation nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass ein höherer Reinheitsgrad der Plasmid-DNA erreicht wird, im Vergleich zur Isolation nach Birnboim und Doly (1979), da hier die Plasmid-DNA nach selektiver Fällung der chromosomalen DNA an eine Affinitätsmatrix adsorbiert.

Bei einem Ansatz im Kleinmaßstab werden mit rekombinanten Plasmiden transformierte JM109 *E.coli* Bakterien in 3 ml LBAMP/KANA-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert. Diese Zellen werden durch 5-minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm sedimentiert. Die im Kit enthaltenen Puffer haben die gleiche Wirkung wie unter 4.2.11 beschrieben. Die nach der Behandlung mit Neutralisationspuffer entstandenen Präzipitate werden durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13 000 rpm

abgetrennt. Der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA wird auf eine Säule gegeben, wobei die Plasmid-DNA an die Silikamembran adsorbiert. Der Durchfluss wird nach kurzer Zentrifugation verworfen und die Membran mit 750 µl Ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen. Dieser Schritt wird mit 250 µl wiederholt. Die Plasmid-DNA wird mit 100 µl sterilem Aqua bidest. eluiert und bei -20°C gelagert.

Für eine Präparation im Mittelmaßstab werden rekombinante *E.coli* Bakterien in 100 ml LBAMP-Medium bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Bakterien werden bei 5 000 rpm sedimentiert. Auch hier folgen die Puffer den in 4.2.11 genannten Prinzipien. Hier wird das durch die Zugabe des Neutralisationspuffers entstandene Präzipitat im Ansatz zusätzlich durch einen Faltenfilter filtriert. Der so entstandene Durchfluss, welcher die gelöste Plasmid-DNA enthält, wird mithilfe einer Vakuumpumpe zunächst durch einen Filter aufgereinigt. Danach wird die Plasmid-DNA auf der darunter liegenden Silikamembran gebunden. Nun folgen zwei Waschschrte mit Endotoxinhaltigem Puffer sowie einem Waschpuffer. Beide Puffer enthalten Ethanol und bewirken die Entfernung der Kontamination mit bakteriellen Endotoxinen, RNA oder Proteinen, dies erfolgt über die Auswaschung der chaotropen Salze. Die Silikamembran muss nun getrocknet werden, um ein vollständige Entfernung des Ethanols sicherzustellen. Die Plasmid-DNA wird nun mit 600 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert, dies erfolgt über kurze Inkubation sowie anschließende Zentrifugation.

#### **4.2.13 *In vitro* Transkription von sense und antisense RNA**

Für die *in vitro* Transkription von sense oder antisense RNA werden die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen Sp6, T3 und T7 aus Bakteriophagen verwendet. Diese Synthese verläuft unter Verwendung linearisierter DNA-Plasmide als jeweilige Matrize. Die Synthese von sense mRNA, welche für die Mikroinjektion in *Xenopus laevis* Embryonen verwendet werden kann, erfolgt mit Hilfe des „mMESSAGE mMACHINE™ High Yield Capped RNA Transcription Kit“ (Ambion). Dabei enthält ein Ansatz von 20 µl Endvolumen 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 2 µl Enzymmix, 10 µl 2x NTP/CAP-Puffer und 2 µl 10x Reaktionspuffer. Im Enzymmix sind neben der Polymerase auch Capping-Enzyme enthalten, welche die RNA mit einer 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Terminus versehen und damit der synthetisierten RNA eine höhere Stabilität verleihen. Der Ansatz wird für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, dann werden 2 µl DNase I zugegeben um die DNA-Matrize abzubauen. Im Anschluss wird für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die RNA wird nun mittels

„Probe Quant G50 Micro Columns“ der Firma GE Healthcare gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. *Antisense* RNA wird als Sonde in der Ganzkeimfärbung eingesetzt. Zur Herstellung wurde das „Digoxigenin/Fluorescin RNA Labelling Kit“ (Roche Diagnostics GmbH) verwendet. Dazu werden für einen 20 µl Ansatz je 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 2 µl des 10x Transkriptionspuffers, 2 µl 10x NTP-Labelling-Mix sowie 2 µl der jeweiligen RNA-Polymerase verwendet. Die zugegebenen Ribonukleotide sind am C<sub>5</sub> der Uridinbase mit Digoxigenin bzw. Fluorescin markiert. Die weiteren Schritte entsprechen der oben geschilderten Vorgehensweise.

#### 4.2.14 PCR zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde von Mullis entwickelt (Saiki et al. 1985; Mullis et al. 1986). Dabei handelt es sich um eine Methode um spezifische Abschnitte der DNA *in vitro* zu vervielfältigen. Eine PCR folgt prinzipiell drei Schritten, der Denaturierung der DNA-Matrize, Anlagerung von synthetischen DNA-Oligonukleotiden (Primer) und der Elongation. Diese erfolgen bei unterschiedlichen Temperaturen. Die DNA wird bei 94°C denaturiert, dabei sollte die Zeit möglichst kurz gehalten werden, da außer der gewünschten Denaturierung auch alle anderen Komponenten in Mitleidenschaft gezogen werden können. Die optimale Temperatur für die Hybridisierung der Primer hängt vom CG/AT Verhältnis ab. Um diese Schmelztemperatur ( $T_m$ ) zu errechnen gilt folgende Regel, vorausgesetzt wird eine Primerlänge von 18 bis 24 Nukleotiden:

$$T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T).$$

Es wird jeweils ein *forward* Primer, welcher an den *sense* Strang der Matrize bindet und ein *reverse* Primer, der den *antisense* Strang bindet, verwendet. Somit wird der zwischen den Primern liegende Bereich exponentiell vervielfältigt. Die Elongation wird bei 72°C mittels einer DNA-Polymerase durchgeführt. Diese thermostabile Polymerase synthetisiert, ausgehend von den freien 3'OH-Enden der eingesetzten Primer, einen neuen komplementären DNA-Strang. In der vorliegenden Arbeit wurde die thermostabile *Taq*-Polymerase verwendet, diese stammt aus dem thermophilen Gram-positiven Bakterium *Thermus aquaticus*.

Für einen Ansatz mit 25 µl Endvolumen werden 1 µl DNA-Matrize (20-40 ng) 1 µl Primer *forward* (10 nM), 1 µl Primer *reverse* (10 nM), 5 µl 5x GoTaq Flexi Reaktions-

puffer, 0.5 µl dNTPs (10 mM), 0.25 µl GoTaq-Polymerase (1.25 u), 16.25 µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O eingesetzt.

### Ortsspezifische Mutagenese

Mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese per PCR können Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in eine DNA-Matrize eingebracht werden. Dabei macht man sich zunutze, dass Primer bei niederen Hybridisierungstemperaturen auch an nicht zu 100 Prozent komplementären DNA-Matrizen binden können. Die Primer sollten eine Länge von 25 bis 45 Basenpaaren aufweisen. Bei der Konzipierung der Primer sollte außerdem darauf geachtet werden, dass die einzuführende Veränderung mittig in der Primersequenz liegt. Dieser Bereich sollte von 10 bis 15 Nukleotiden flankiert werden. Sie sollten einen minimalen GC-Gehalt von 40% aufweisen. Zudem sollten die Primer zueinander komplementär sein, dadurch wird das ringförmige Plasmid vollständig abgelesen. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) sollte über 78°C liegen und dabei nach folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = 81.5 + 0.41 * (\%GC) - 675 / (N - \%Fehlpaarungen)$$

N = Anzahl der Basen.

In der vorliegenden Arbeit wurde für ortsspezifische Mutagenesen die Turbo *Pfu*-Polymerase aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* verwendet. Bei dieser Polymerase handelt es sich um ein Proofreading-Enzym (auch High-Fidelity-Enzym genannt). Diese besitzen im Gegensatz zur Taq-Polymerase neben ihrer DNA-Polymerase Aktivität auch eine 3'-5'-Exonuklease Aktivität. Dadurch sind sie in der Lage, fehlerhaft eingebaute Nukleotide zu entfernen und durch die korrekten, zum Template-Strang komplementären Nukleotide, zu ersetzen. Pro Reaktionsansatz sollten 25-50 ng DNA-Matrize eingesetzt werden. Die Elongationstemperatur ist abhängig von der Länge der Plasmid-DNA, in welche die Mutation eingeführt werden soll. Dabei sind zwei Minuten pro Kilobase optimal. Sollen Punktmutationen eingefügt werden, sind zwölf Zyklen ausreichend, für Mutationen mehrerer Basen sollten 18 Zyklen gewählt werden. Im Anschluss an die Elongation wird auf 4°C heruntergekühlt und in den 50 µl Ansatz wird 1 µl DpnI zugegeben. Diese Restriktionsendonuklease baut die parentale DNA-Matrize ab, da diese im Gegensatz zur neusynthetisierten DNA methyliert ist. Sie folgt dabei dem Erkennungsmotiv 5'-G<sup>m6</sup>ATC-3'. Die mit DpnI versetzten Proben werden für eine

Stunde bei 37°C inkubiert. Davon werden 2 µl in kompetente *E.coli* JM109 Bakterien transformiert. Zur Kontrolle der eingefügten Mutation wird eine DNA-Sequenzanalyse durchgeführt, wie unter 4.2.15 beschrieben.

### **Kolonien-PCR**

Eine Möglichkeit zur Überprüfung eines klonierten Konstrukts ist die Kolonien-PCR. Dabei kann der Einbau selbst, und wurde für die Klonierung nur eine Restriktionsendonuklease benutzt, die Orientierung des Inserts überprüft werden. Dazu wird mit einer Pipettenspitze ein Teil der zu testenden Bakterienkolonie in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend in 50 µl Aqua bidest. gelöst. Von dieser Bakteriensuspension werden 5 µl in eine PCR-Reaktion eingesetzt, diese verläuft wie unter 4.2.14 beschrieben. Für die Amplifikation wird ein Plasmid-spezifischer und ein Gen-spezifischer Primer genutzt. Dadurch erfolgt eine Amplifikation nur dann, wenn das DNA-Fragment vorhanden ist und dieses die gewünschte Orientierung aufweist.

### **4.2.15 DNA-Sequenzanalyse**

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgt mittels der Kettenabbruchmethode, auch Didesoxymethode genannt, diese wurde von Sanger et al. (1977) entwickelt. Dabei werden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) verwendet. Diese Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Die Interpretation und Analyse der Sequenzen wurde in vorliegender Arbeit mit Hilfe der Software ApE 1.12 (Freeware v. M.W. Davis, USA) durchgeführt.

## **4.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **4.3.1 Proteinextraktion aus *Xenopus laevis* Embryonen**

Je 10 Embryonen werden in 100 µl RIPA-Puffer durch Auf- und Abziehen in einer Kanüle (Durchmesser 0.4 mm) homogenisiert. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit werden mit einem Volumen Freon (1,1,2-Trichlortrifluorethan von Merck) die Dotterlipide abgetrennt. Nun wird für 20 Minuten bei 4°C und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt. Der Ansatz wird nun für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei -20°C eingefroren.

### 4.3.2 Immobilisierung von GST-Fusionsproteinen an Sepharosekugeln

Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysieren die Bindung von Glutathion (GSH) an organische Verbindungen. Werden Proteine an GST-Affinitätsmarkierungen fusioniert, können diese aufgrund der hohen Affinität von Glutathion-S-Transferasen für Glutathion mittels immobilisiertem Glutathion aufgereinigt werden. Dazu werden 150 µl Bakterienlysat mit 150 µl gewaschenen GSH-Sepharosekugeln für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Es folgen drei 10-minütige Waschschrte mit PBS. Die so vorbereiteten GSH-Sepharosekugeln können nun für einen GST-Pulldown Assay verwendet werden.

### 4.3.3 GST-Pulldown Assay

Der GST-Pulldown Assay ist eine Methode um *in vitro* Interaktionen zwischen Proteinen nachzuweisen. Dabei wird ein mit GST versehenes *bait*-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Es folgt die Zugabe möglicher Interaktionspartner, den *prey*-Proteinen. Diese liegen im Zelllysat von transfizierten HEK293 Zellen vor. Die Komplexe können dann eluiert werden und in SDS-PAGE und Western Blot Analysen untersucht werden. Die Zellen werden in 1.5 ml PBS aufgenommen und im Anschluss für fünf Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Zur Lyse der Zellen wird zum Niederschlag 150 µl RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren zugegeben. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C wird der Überstand, welcher die *bait*-Fusionsproteine enthält, zu den GSH-Sepharosekugeln gegeben. Die zweistündige Inkubation bei 4°C ermöglicht die Bindung der Proteine. Im Anschluss werden unspezifisch gebundene Proteine durch drei Waschschrte mit PBS entfernt. In vorliegender Arbeit wurde  $\beta$ -Catenin-GST und als Kontrolle GFP-GST oder DCOH-GST verwendet. Die an das *bait*-Fusionsprotein gebundenen Proteine werden durch Erhitzen auf 95°C mit 4x SDS-PAGE Probenpuffer eluiert. Die Proben können im Anschluss in einer SDS-PAGE oder im Western Blot analysiert werden.

### 4.3.4 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe. Die Zugabe von SDS (sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat) bewirkt zum einen die Denaturierung der Proteine, somit liegen sie dann als monomere Proteinuntereinheiten vor. Zum anderen bildet

es mit ihnen einen Komplex aus, wodurch sie von einer negativ geladenen Hülle umgeben sind. Diese negative Ladung bewirkt, dass die Proteine im elektrischen Feld in Richtung der Kathode laufen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Protein-SDS-Komplexe im Gel ist linear vom Logarithmus des Molekulargewichts abhängig. Somit erfolgt die Auftrennung im Gel aufgrund der Proteingröße. Dabei wandern kleine Proteine schneller, große entsprechend langsamer durch die Gelmatrix.

Weitere Komponenten sind Dithiothreitol (DTT) bzw. Mercaptoethanol, welche Disulfidbrücken reduzieren. Bei der SDS-PAGE wird ein Polyacrylamidgel verwendet. Die Zugabe von N,N-Methylen-bisacrylamid führt zu einer dreidimensionalen Vernetzung. Die Porengröße im Gel kann, je nach Fragestellung und Proteingröße, über unterschiedliche Mengenverhältnisse von Polyacrylamid und Bisacrylamid beeinflusst werden. Des Weiteren wird als Katalysator und Stabilisator der Radikale TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylen-diamin), als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat (APS) eingesetzt. Es wird jeweils ein Trenngel und ein Sammelgel verwendet. Die Proteine passieren zunächst das Sammelgel, welches eine große Porenweite aufweist. Im Sammelpuffer sind Chlorid-Ionen enthalten. Diese zeigen eine höhere Mobilität als die Proteine. Die im Elektrophoresepuffer enthaltenen Glycin-Ionen dagegen sind langsamer. Entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ordnen sich die Proteine zwischen den langsamen Glycin-Ionen und den schnellen Chlorid-Ionen an. Mittels dieser Vortrennung der Proteine wird eine Aufkonzentrierung und später eine scharfe Proteinbande im Gel erzeugt.

Im Vergleich zum Sammelgel weist das Trenngel eine geringere Porengröße, eine höhere Salzkonzentration sowie einen höheren pH-Wert auf. Die Glycin-Ionen werden beim Eintritt in das Trenngel ionisiert und wandern an den Proteinproben vorbei. Im Trenngel werden die Proteine dann entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Als Größenstandard werden Proteine mit bekannter Größe verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde für ein 8 % Trenngel 2.3 ml Aqua bidest., 1.3 ml 30 % (w/v) Acryl- Bisacrylamid Mix, 1.3 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 und 50 µl 10 % (w/v) SDS benötigt. Durch die Zugabe von 3 µl TEMED und 50 µl 10 % (w/v) APS beginnt die Polymerisation. Das Trenngel wird zunächst zwischen zwei Glasplatten, bis circa 1 cm unter den oberen Rand des Gelgießstandes, gegossen und dann mit Aqua bidest. überschichtet. Dies ermöglicht die Bildung eines sauberen Abschlusses des

Gels. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das Wasser abgegossen und das Sammelgel zugegeben. Dieses besteht aus 2.1 ml Aqua bidest., 500 µl 29.22 % (w/v) Acrylamid, 0.79 % (w/v) Bisacrylamid, 380 µl 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 30 µl 10 % (w/v) SDS, 3 µl TEMED und 30 µl 10 % (w/v) APS. In das noch flüssige Gel wird ein Kamm gesteckt, welcher Taschen zum Beladen des Gels ausspart. Sobald dieses ebenfalls ausgehärtet ist wird das Gel, welches zwischen den Glasplatten eingespannt ist, in eine Gelelektrophoresekammer eingesetzt, diese wird zuvor mit 1x Elektrophoresepuffer mit 0.1 % SDS gefüllt. Nun kann der Kamm entfernt und die Proteinproben können auf das Gel geladen werden. Es wird eine Spannung von zunächst 80 Volt angelegt bis die Proben das Sammelgel passiert haben. Nun kann die Spannung auf 100 Volt erhöht werden. Die Gelelektrophorese wird gestoppt, sobald die Probenpufferbande den unteren Rand des Gels erreicht hat. Das zwischen den Glasplatten eingespannte Gel kann nun aus der Gelelektrophoresekammer entnommen werden, die obere kleinere Glasplatte wird vom Gel abgehoben und das Sammelgel wird abgetrennt. Das Trenngel mit den Proteinbanden wird für die Analyse im Western Blot oder für eine Coomassie Brilliant Blue Färbung weiterverwendet.

#### **4.3.5 Coomassie Blau Färbung von Polyacrylamidgelen**

Die Färbung des Polyacrylamidgels mit Coomassie Brilliant Blue (CBB) ermöglicht die Visualisierung der aufgetrennten Proteine, sofern sie in einer Menge von 300 bis 1000 ng vorliegen. Das Gel wird für 30 Minuten in CBB-Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert. Zum Entfärben des Hintergrunds wird dreimal für 10 Minuten mit CBB-Entfärbelösung inkubiert. Bei hoher Intensität der Hintergrundfärbung kann das Entfärben verlängert werden. Zur Aufbewahrung wird das Gel mit Hilfe des „Gel Drying Film“ (Promega, Mannheim) getrocknet.

#### **4.3.6 Proteinanalyse mittels Western Blot**

Der Transfer der Proteine im Gel auf eine Nitrocellulose- oder eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran wird als Western Blot bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, welche eine Detektion der spezifischen Proteine im picomolaren Bereich ermöglicht. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben die Proteine auf der Membran haften, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Die Proteine sind so fest an die

Membran gebunden und zugänglich für den Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurde für den Proteintransfer die „Semidry-Blot“-Methode angewandt. Dazu werden sechs 3 mm dicke Filterpapiere, eine Nitrocellulosemembran und das Polyacrylamidgel benötigt. Die Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran werden kurz mit Blot-Puffer angefeuchtet und im Sandwich-Aufbau luftblasenfrei übereinandergelegt (Abb. 4.4).



**Abbildung 4.4: Aufbau des Sandwichs für den Proteintransfer.** Zwischen die positiv geladene Anode und die negativ geladene Kathode werden die Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran sowie das Polyacrylamidgel angeordnet.

Der Transfer erfolgt für zwei Stunden bei 20 Volt. Dann wird die Nitrocellulosemembran aus dem Sandwich-Aufbau herausgenommen. Es folgt ein Blockierungsschritt der unspezifischen Bindestellen. Dabei wird für eine Stunde mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST unter ständigem Kippen inkubiert. Der Blot wird nach der Blockierung für dreimal zehn Minuten mit TBST gewaschen. Nun wird mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C unter ständigem Kippen inkubiert. Es folgt ein weiterer Waschschrift mit TBST, erneut dreimal für zehn Minuten. Der Blot wird nun für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Danach wird wieder dreimal zehn Minuten mit TBST gewaschen.

Zur Entwicklung des Blots wird die Peroxidase-Methode angewandt. Die Detektion erfolgt mittels Chemilumineszenz. Die Peroxidase, welche die Reaktion des Chemilumineszenzfarbstoffs katalysiert, ist am sekundären Antikörper gebunden. Die Chemilumineszenz beruht auf der Oxidation des Diacylhydrazids Luminol. Für diese Reaktion werden die beiden Komponenten des „ECL Plus™ Western Blotting Detection System-Kit“ im Verhältnis 1/40 gemischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Die Chemilumineszenz kann nun mit einer CCD (Charge-coupled device) Kamera visualisiert werden.

## 4.4 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

### 4.4.1 Fliegenfutter und -haltung

#### Futter

Im Futter sind Agar, Zucker, Maismehl sowie Aqua bidest. enthalten. Diese Komponenten werden erhitzt, wobei kurz vor dem Kochen zusätzlich Frischhefe zugegeben wird. Der Futterbrei wird nun 20 Minuten aufgekocht um die Hefe zu inaktivieren. Nach dem Abkühlen auf circa 70°C wird Nipagin und Propionsäure zugesetzt, da sich vor allem Nipagin bei höheren Temperaturen zersetzt. Bei Nipagin handelt es sich um das Paraben 4-Hydroxybenzoesäuremethylester, ein Fungizid. Zur Konservierung dient außerdem die Propionsäure, welche Schimmel und Bakterienwachstum hemmt. Der Futterbrei wird nun in die Zuchtbehälter abgefüllt, die nach vollständigem Abkühlen mit Wattestopfen abgedichtet werden. Das Futter wurde von Chaudhary Heidelberg (Arbeitsgruppe Boutros, DKFZ) bezogen.

#### Haltung

Die Entwicklungszeit von *Drosophila melanogaster* ist von verschiedenen Parametern abhängig, wie Populationsdichte, Feuchtigkeit und Genotyp. Auch die Temperatur spielt dabei eine große Rolle. Die Zuchttemperatur liegt meist bei 18°C oder 25°C. Bei Haltung der Fliegen bei 18°C schlüpfen die adulten Tiere nach 18 Tagen, bei Haltung auf 25°C nach 10 Tagen. Außerdem verläuft die Entwicklung abhängig vom Geschlecht unterschiedlich schnell ab, so zeigen Weibchen eine schnellere Entwicklung als Männchen. Die Fliegen sollten bei Haltung auf 25°C alle zwei Wochen auf neues Futter gesetzt werden, werden die Tiere bei 18°C gehalten ist ein Umsetzen alle drei bis vier Wochen ausreichend. Beim Umsetzen der Fliegen sollte darauf geachtet werden, dass keine Fliegen von außen oder Kontaminationen, wie Schimmelpilze oder Milben in die neuen Zuchtbehälter gelangen.

### 4.4.2 Geschlechtsbestimmung

Die Geschlechtsbestimmung von *Drosophila melanogaster* ist zum einen zur Selektion der virginellen Weibchen, zum anderen auch für das Ansetzen von Kreuzungen entscheidend. Adulte Männchen sind kleiner als Weibchen. Der Geschlechtskamm der Männchen befindet sich auf dem Basitarsus des ersten Beines. Die äußeren männlichen Genitalien sind stark chitinisiert. Außerdem ist die starke Pigmentierung der letzten Abdominaltergiten sehr leicht erkennbar. Die

Analplatten der Männchen sind rechts und links angelegt, Hoden schimmern ventral gelb durch. Bei Weibchen sind die Genitalien wenig sichtbar, allerdings weisen sie stark vorragende Analplatten auf, welche den Anus umrahmen, sie sind ventral-dorsal angelegt.

Eine Geschlechtsbestimmung ist bereits im Larvenstadium möglich, da bei männlichen Larven im hinteren Drittel seitwärts der Haupttracheen große, ovale, durchsichtige in Fettkörper eingebettete Hoden zu erkennen sind. Die Ovarien der Weibchen sind hingegen kaum sichtbar.

#### **4.4.3 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster***

##### **Narkose**

Arbeiten, wie Kreuzungen ansetzen oder virginelle Weibchen selektieren, werden durch Narkotisieren der Tiere möglich. Der Betäubung mit CO<sub>2</sub> ist einer Betäubung durch Äther vorzuziehen. Bei Äther besteht die Gefahr, dass zu wenig narkotisiert wurde und die Tiere nicht ausreichend betäubt wurden. Bei nochmaliger Betäubung mit Äther kommt es dann häufig zu einer Überdosierung, an der die Tiere sterben. Die CO<sub>2</sub>- Betäubung dagegen ist besser dosierbar und weniger intrusiv. Die Fliegen erwachen schneller und sind sofort paarungsbereit. Allerdings besteht die Gefahr des Austrocknens während der Betäubung. In vorliegender Arbeit wurde ausschließlich mit CO<sub>2</sub> betäubt.

##### **Entsorgung**

Fliegen die nicht mehr benötigt werden, können in einem sogenannten Fliegengrab entsorgt werden. Dabei handelt es sich um einen zur Hälfte mit 70 % Ethanol, gefüllten Kolben in dem sich ein Plastiktrichter befindet. Dieser Trichter ermöglicht ein leichteres Befüllen des Kolbens.

#### **4.4.4 Allgemeine Nomenklatur**

In vorliegender Arbeit wurden entsprechend der allgemein gültigen Nomenklatur homologe Chromosom durch einen Bruchstrich (/) getrennt. Unterschiedliche Chromosomen sind durch Trennung mit einem Strichpunkt (;) gekennzeichnet. Generell werden in Kreuzungsschemata wildtypische Allele bzw. Gene als Plus (+) dargestellt. Somit ergibt sich für eine Fliege, die ein wildtypisches und ein mutantes Allel  $xyz^c$  des Gens  $xyz$ , also heterozygot ist, auf dem ersten Chromosom trägt und

auf dem zweiten Chromosom homozygot für das mutante Allel 1 des Gens *a* und heterozygot für *b<sup>d</sup>* ein mutantes Allel des Gens *b* ist, folgende Schreibweise:

$$xyz^+ / xyz^c; a^1 b^+ / a^1 b^d$$

Wildtyp-Allele werden oftmals nur mit einem Plus (+) gekennzeichnet, wobei durch die Position das entsprechende Gen festgelegt ist. Mutante Allele werden nur dann eigens gekennzeichnet, wenn es sich nicht um das Allel 1 handelt. Somit ergibt sich für dieselbe Fliege folgende Schreibweise:

$$+ / xyz^c; a + / a b^d$$

#### 4.4.5 Auslesen virgineller Weibchen

Zum Ansetzen einer gewünschten Kreuzung werden virginelle Weibchen benötigt, da einmal begattete Weibchen noch tagelang einen Spermiovorrat im Receptaculum und in den Spermatheken halten können. Kennzeichen der virginellen Weibchen sind die bleiche Körperfarbe, die noch nicht aufgefalteten Flügel und das Meconium (verdautes Larvengewebe), welches auf der ventralen Körperseite als dunkler Fleck sichtbar ist. Außerdem weist das längliche Abdomen Längsrinnen auf. Die Weibchen bleiben bei Haltung bei 25°C circa 6 bis 8 Stunden nach dem Schlüpfen virginell. Diese Zeitspanne kann durch Haltung bei 18°C auf circa 22 Stunden erhöht werden.

#### 4.4.6 Ansetzen von Kreuzungen

Es werden pro Kreuzung eine bis fünf Jungfrauen und zwei Männchen zusammengesetzt. Wobei die Anzahl der eingesetzten Männchen nicht entscheidend ist, ein Überschuss ist hierbei unproblematisch. Beim Ansetzen der Kreuzung ist zu beachten, dass bei Betäubung mit Äther die Weibchen mehrere Stunden nach der Narkose keine Eier legen, bei Betäubung mit CO<sub>2</sub> stellt sich die Legetätigkeit kurz nach dem Erwachen wieder ein. Beim Überführen der betäubten Tiere in die Futterröhrchen sollten diese bis zum Erwachen der Fliegen gelegt werden. Anderenfalls besteht die Gefahr, dass die Tiere in den Nahrungsbrei fallen und sterben. Nach drei bis fünf Tagen, abhängig von der Temperatur, können die Fliegen auf neues Futter umgesetzt werden.

#### 4.4.7 Balancer- Chromosom

Der Einsatz von Balancer-Chromosomen ist in der *Drosophila* Genetik ein wichtiges Werkzeug und ein entscheidender Vorteil bei dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster*. Balancer-Chromosomen verhindern die Rekombination bei den Fliegen, so dass rezessiv letale Mutationen als stabile Stämme gehalten werden können. Grundlage hierfür ist der balancierte Polymorphismus. Die Balancer-Chromosomen tragen verschiedene Inversionen, die dazu führen, dass die homologe Rekombination des zum Balancer-Chromosom homologen Chromosoms nicht mehr möglich ist. Zusätzlich tragen Balancer-Chromosomen einen oder mehrere dominante Marker. Dies ermöglicht ihr Vorhandensein eindeutig nachzuweisen, auch im Falle von Heterozygose. Für Autosomen sind diese dominanten Marker meist homozygot letal. Für Heterosomen ist eine derartige Letalmarkierung nicht möglich, da sonst die Balancer-Chromosomen nicht über die hemizygoten Männchen weitergegeben werden könnten. Man verwendet in diesem Falle die *Bar* (B) Mutation, dies ermöglicht auch eine Unterscheidung zwischen hetero- und homozygoten Weibchen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Balancer-Chromosomen sind in Tabelle 4.1 angegeben, eine Übersicht über alle verfügbaren Balancer-Chromosomen ist unter <http://kyotofly.kit.jp/stocks/documents/Balancers.html#h6391178> zu finden.

**Tabelle 4.1: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Balancer, ihre Lokalisation sowie ihre genotypische Beschreibung und die verwendeten dominanten Balancer Marker.** \*In dieser Tabelle sind nur die phänotypischen Merkmale angegeben nach denen in vorliegender Arbeit selektiert wurde.

Balancer	Chromosom Name	Mutation	Marker und Merkmal*
CyO	2 <i>Curley of Oster</i>	$In(2LR)O$ , $Cy1 dp^{lv1} pr1 cn2$	<i>Cy</i> <i>Curly</i> nach oben gebogene Flügel
IF	2 <i>irregular facette</i>	$In(2R)vg^U$ , $wg^{Sp-1} vg^U mam^U$ $Kr^{lf-1}/SM5$	<i>If</i> <i>irregular facetes</i> kleine Augen mit fusionierten Ommatidien
Tm3, Sb	3 <i>Third multiple 3</i>	$In(3LR)TM3$ , $kni^{fl-1} p^D vvl^{sep}$ $l(3)89Aa^1 Ubx^{bx-34e e1}$ zusätzlich mit <i>Sb</i> markiert	<i>Sb</i> <i>Stubble</i> kurze, dicke Borsten

Balancer	Chromosom Name	Mutation	Marker und Merkmal*
Tm3, Ser	3 <i>Third</i> <i>multiple 3</i>	<i>In(3LR)TM3, kni<sup>ri-1</sup> p<sup>o</sup> vvl<sup>sep</sup></i> <i>I(3)89Aa<sup>1</sup> Ubx<sup>bx-34e e1</sup></i> zusätzlich mit <i>Ser</i> markiert	<i>Ser Serrate</i> Flügel an den Enden eingekerbt
MKRSb	3	<i>Tp(3;3)MRS, M(3)76A<sup>1</sup> kar<sup>1</sup></i> <i>ry<sup>2</sup> Sb<sup>1</sup></i>	<i>Sb Stubble</i> kurze, dicke Borsten

#### 4.4.8 Erzeugung transgener Tiere

Grundlage zur Erzeugung transgener Fliegen bilden DNA-Transposons, die P-Elemente. DNA-Abschnitte, die von P-Element Wiederholungen flankiert werden, können mit Hilfe des Enzyms Transposase in das Genom integriert werden (Rubin und Spradling, 1982).

Der Transformationsvektor pUAST enthält die zu integrierenden DNA-Abschnitte, flankiert von den P-Element Wiederholungen sowie als Selektionsmarker das *white*-Gen. Dieser wird zusammen mit einer Transposasequelle, meist im pUC-Vektor, in Embryonen des *Drosophila melanogaster* Stammes *yw* injiziert. Diese Fliegen tragen eine Mutation für das *white*-Gen und sind somit weißäugig. So wird eine erfolgreiche Intergration des Transgens durch die Ausbildung einer roten Augenfarbe sichtbar. Da das Transgen in der Keimbahn eingebracht wurde, zeigt sich die veränderte Augenfarbe erst nach einer Generation. Die nach der Injektion überlebenden Fliegen müssen somit zunächst mit Fliegen des Stammes *yw* rückgekreuzt werden. In der F1-Generation können die Tiere selektiert werden, welche den Selektionsmarker ausprägen, also rotäugig sind. Die Injektionen sowie die unter 4.4.9 beschriebene Etablierung der transgenen Linien wurden von der Firma BestGene Inc. (Chino Hills, USA) durchgeführt.

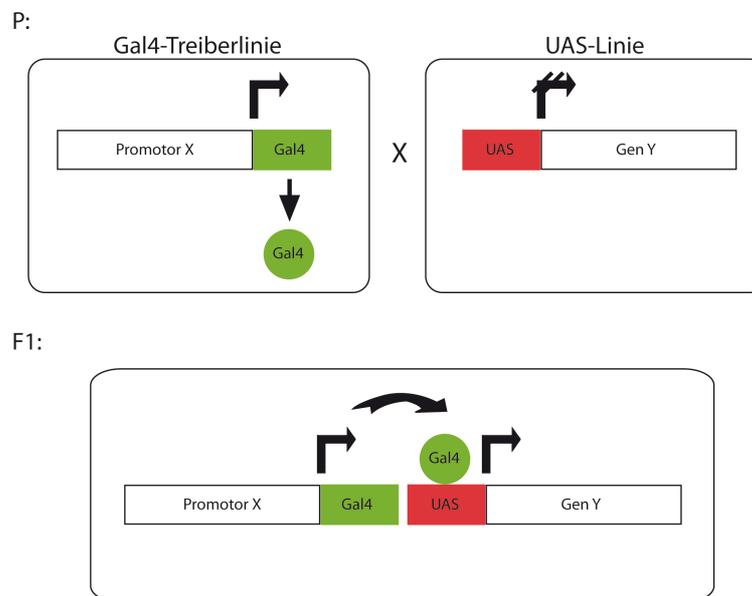
#### 4.4.9 Etablierung transgener Stämme

Zur genetischen Lokalisierung des Integrationsortes werden Kreuzungen der einzeln selektierten transgenen Fliegen mit Balancer-Chromosomen für das zweite und dritte Chromosom durchgeführt. In der nachfolgenden Generation können anhand des Segregationsverhalten der Selektionsmarker relativ zum Balancer-Chromosom Rückschlüsse auf den Integrationsort des Transgens gezogen werden. Die so

erhaltenen transgenen Tiere vorliegender Arbeit sind in Tabelle 3.2 (S. 34f.) aufgeführt.

#### 4.4.10 Gewebespezifische Überexpression

Eine Antwort auf vielerlei Fragestellungen ermöglicht häufig eine zeitlich und räumlich regulierte Überexpression von Genen. In *Drosophila melanogaster* ermöglicht dies das von Brand und Perrimon (1993) entwickelte Gal4-UAS-System. Basis dieses Systems sind zwei entscheidende Komponenten. Zum einen der Gal4-Genaktivator aus *Saccharomyces cerevisiae*, welcher unter die Kontrolle spezifischer regulatorischer Elemente der Fliege kloniert wird.



**Abbildung 4.5: Das Gal4-UAS-System in *Drosophila*.** Ein Tier der Gal4-Treiberlinie, in der Gal4 unter der Kontrolle des Promotors X steht, wird mit einem Tier der UAS-Effektor- bzw. Detektorlinie gekreuzt. Das Gen Y kann so über die UAS-Sequenz durch Kreuzung aktiviert werden (P=Elterngeneration). In den Nachkommen der F1-Generation wird das Gen Y im Muster des Promotor X spezifisch exprimiert.

Dadurch wird die Gal4-Expression in einem bestimmten Zeit/Raum-spezifischen Muster angetrieben. Diese so genannten Treiberlinien sind in großer Vielfalt für nahezu jedes Gewebe in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien erhältlich (Bloomington *Drosophila* Stock center, unter: <http://flystocks.bio.indiana.edu>). Das Gal4 Protein beinhaltet eine DNA-Bindedomäne sowie eine Aktivierungsdomäne. Zum anderen benötigt man Fliegenlinien, welche UAS- (upstream activation sequence) Abschnitte enthalten, unter deren Kontrolle das Gen von Interesse steht. Die UAS ist ein kurzer Abschnitt der Promotorregion und stellt die Zielsequenz des Gal4 Proteins dar. Das Gal4 Protein bindet an CGG-N11-CCG des UAS-Abschnitts.

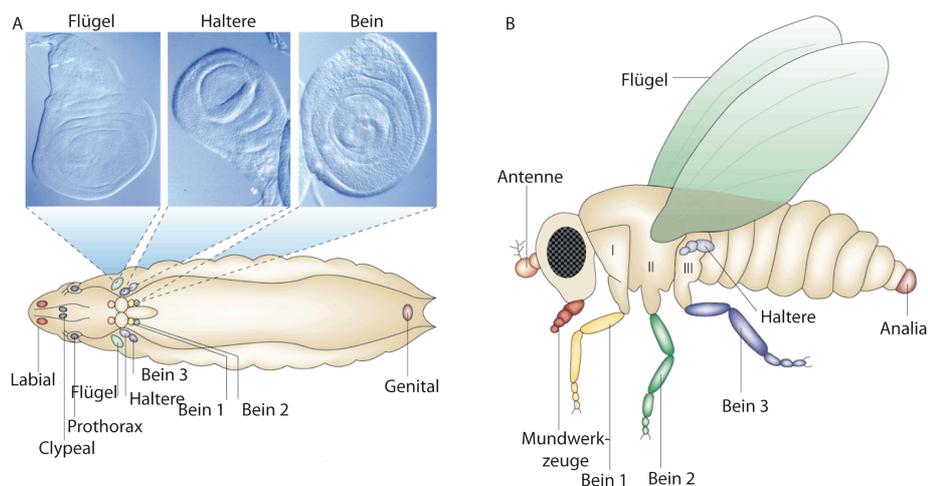
Bei diesen UAS-Linien handelt es sich um Detektorlinien, falls sie ein Reporter-gen, wie GFP (green fluorescent protein) enthalten oder um Effektorlinien, wenn von der Überexpression des Gens Effekte zu erwarten sind. Zur Aktivierung dieses Systems muss ein Tier der Treiberlinie mit einem der Effektor- bzw. Detektorlinie gekreuzt werden. In den Nachkommen wird dann das Gen von Interesse im Muster von Gal4 exprimiert (Abb. 4.5).

#### 4.4.11 Präparation von Flügeln

Die Präparation adulter Flügel wird in 100 % Ethanol in Glasschälchen durchgeführt. Dort werden die Flügel mit einer Pinzette vom Thorax abgetrennt und auf einen Objektträger überführt. Die überschüssige Flüssigkeit wird vor dem Einbetten in Euparal (Roth, Karlsruhe) abgesogen.

#### 4.4.12 Immunfärbung an Imaginalscheiben

Die Vorläuferstrukturen der Körperanhänge der adulten Fliege, wie Beine, Flügel und Halteren werden in *Drosophila* bereits im Embryo als Imaginalscheiben angelegt (Abb. 4.6). Die circa 20 Zellen der Flügelanlage werden bereits im Stadium 11 (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985) spezifiziert und aus der Epidermis ausgegliedert. Diese Zellen kommen als sackartige Einstülpung in Form der Imaginalscheibe unter der Epidermis zu liegen und proliferieren während der larvalen Entwicklung. In der pupalen Entwicklung folgt die Differenzierung dieser Zellen wodurch die vollständige Ausbildung des adulten Flügels folgen kann.



**Abbildung 4.6: Imaginalscheiben und ihre spätere Position im Imago.** A: Larve im dritten Larvenstadium von *Drosophila melanogaster*. Gezeigt sind die Positionen der Imaginalscheiben. Die obere Reihe zeigt Fotografien einer Flügel-, Halteren- sowie einer Beinscheibe. B: Adulte Fliege. Die Strukturen welche sich aus den Imaginalscheiben entwickelt haben sind in den entsprechenden Farben gekennzeichnet. Verändert nach Morata et al., 2001.

Die Imaginalscheiben werden in 1x PBS aus dritten Larven präpariert. Mit einer Pinzette greift man die Larve im hinteren Drittel, mit einer zweiten Pinzette fasst man kurz hinter den Mundhaken und zieht sie auseinander. So werden die larvalen Organe im vorderen Teil der Larve freigelegt aber nicht komplett freipräpariert. Imaginalscheiben sind in den Larven paarig angelegt, eine Ausnahme hierzu bildet nur die Genitalscheibe. Die freigelegten Imaginalscheiben werden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 1x PBS auf Eis gesammelt. Nun wird das 1x PBS abgesaugt und zur Fixierung der Imaginalscheiben durch 500 µl Fixativ ersetzt, die Imaginalscheiben werden für 20 Minuten fixiert. Es folgen drei Waschschrte mit PBX für je 15 Minuten. Unspezifische Bindungsstellen werden für eine Stunde in Blockierungspuffer blockiert. Nun wird mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C unter ständigem Kippen inkubiert. Es folgen drei 15-minütige Waschschrte mit PBX. Vor Zugabe des sekundären Antikörpers wird erneut blockiert, dazu wird wiederum für eine Stunde Blockierungspuffer zugegeben. Da die sekundären Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, müssen alle weiteren Arbeitsschritte im Dunkeln durchgeführt werden. Auch der sekundäre Antikörper sollte über Nacht bei 4°C, unter ständigem Kippen, inkubiert werden. Es folgen auch hier drei 15-minütige Waschschrte mit PBX. Die Imaginalscheiben können nun in 1x PBS freipräpariert werden. Im Anschluss werden sie in Mowiol eingebettet. Die Präparate können bei -20°C mehrere Wochen aufbewahrt werden.

## **4.5 Zellbiologische Methoden**

### **4.5.1 Kultivieren und Passagieren von HEK293 Zellen**

Die HEK293 Zellen werden bei 37°C und 7 % CO<sub>2</sub> in DMEM-Komplettmedium in 50 ml Gewebekulturflaschen kultiviert. Sind die Zellen konfluent wird das Medium mit einer Pasteurpipette mittels einer Vakuumpumpe abgesogen und durch 1.5 ml Trypsin/EDTA ersetzt. Dies führt zur Vereinzelnung der Zellen. Durch Zugabe des Komplettmediums wird dieser Vorgang aufgrund des im Medium enthaltenen Serums gestoppt. Die Zellen werden nun in geeigneter Verdünnung in neue Gewebekulturflaschen ausgesät.

### **4.5.2 Transfektion unter Verwendung der Calciumphosphatmethode**

Bei einer transienten Transfektion handelt es sich um die Aufnahme von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Im Gegensatz hierzu steht die stabile Transfektion, hierbei

wird Fremd-DNA in das Genom der Wirtszelle inseriert. Die transiente Transfektion von HEK293 Zellen wurde mit einer modifizierten Version der Calciumphosphatmethode nach Gorman (1985) durchgeführt. Bei dieser Methode bindet die zu transfizierende DNA an ausgefallenes Calciumphosphat und bildet so Präzipitate. Dieser Vorgang findet in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat statt. Diese Kristalle werden nun von den Zellen aufgenommen. Dieser Vorgang ist von verschiedenen Parametern abhängig. Ein Faktor ist der optimale pH Wert von 6.9-7.5, da dieser Einfluss auf die Größe der gebildeten Präzipitate hat. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wird in 1 ml 1x HeBs, pH 7.12, verdünnt. Durch die Zugabe von 50 µl 2.5 M CaCl<sub>2</sub> werden dann die Präzipitate gebildet. Diese Zugabe erfolgt langsam und unter ständigem Rühren. Nach 20-minütiger Inkubation wird die Lösung vollständig zu den Zellen gegeben. Vier Stunden nach Transfektion wird das Medium durch 5 ml neues Medium ersetzt, dies entfernt überschüssige Präzipitate. Zwei Tage nach der Transfektion werden die nahezu konfluenten Zellen geerntet.

#### **4.5.3 Ernten von Gewebekulturzellen**

48 Stunden nach der Transfektion werden die HEK293 Zellen geerntet. Dazu wird das DMEM-Kulturmedium abgenommen und durch 750 µl PBS ersetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers werden sie mechanisch gelöst, die Suspension wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um eine hohe Zellausbeute zu erhalten wird dieser Vorgang wiederholt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Herstellung und Verifizierung der Werkzeuge zur funktionalen Analyse in Vertebraten

Zur funktionalen Analyse in *Xenopus* Embryonen wurden *hytcf* und *pangolin* in die XhoI Restriktionsstelle des eukaryotischen Expressionsvektors pCS2myc inseriert. Um den offenen Leserahmen (ORF, open reading frame) von *hytcf* mittels der Restriktionsendonuklease XhoI in den Expressionsvektor pCS2myc inserieren zu können, wurde zunächst eine interne XhoI Schnittstelle des *hytcf*, durch Einfügen einer stummen Mutation, unter Verwendung einer Mutagenese PCR, entfernt. Die Bindestelle des Mutagenese Primers HTcf\_Mutfor innerhalb der *hytcf* DNA-Sequenz ist in Abb. 5.1 dargestellt.

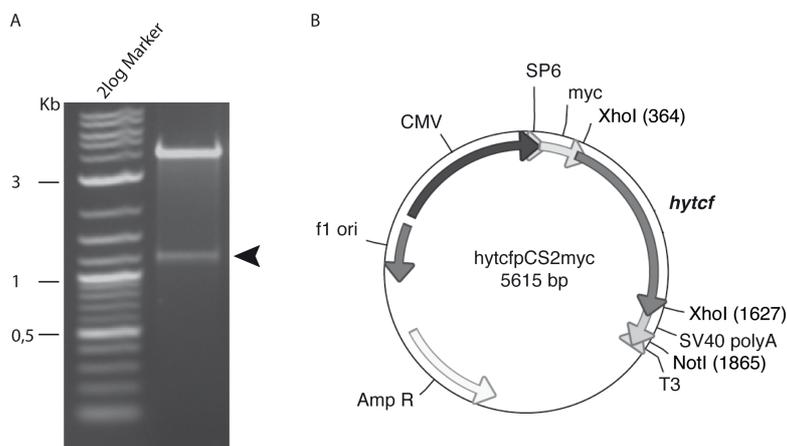
```

661 AACCAAATACTTTGGAAAGCGATGGCATGCTTTAGAGAAGACCGAGCAAGCTAAATACTAT
221 N Q I L G K R W H A L E K T E Q A K Y Y
                                     CCGGGTTGGAGTGC CGGA
721 GAAATGGCACGCAAGGAACGCGCCATTCATATGCAGTTATACCCGGGTTGGAGTGC TCGA
241 E M A R K E R A I H M Q L Y P G W S A R
GACAATTACGCTCAAATAGG
781 GACAATTACGCTCAAATAGGAAGGAAAAAAAAACGCCAAGAGATAAAAAATGAAGAAATG
261 D N Y A Q I G R K K K R P R D K N E E M

```

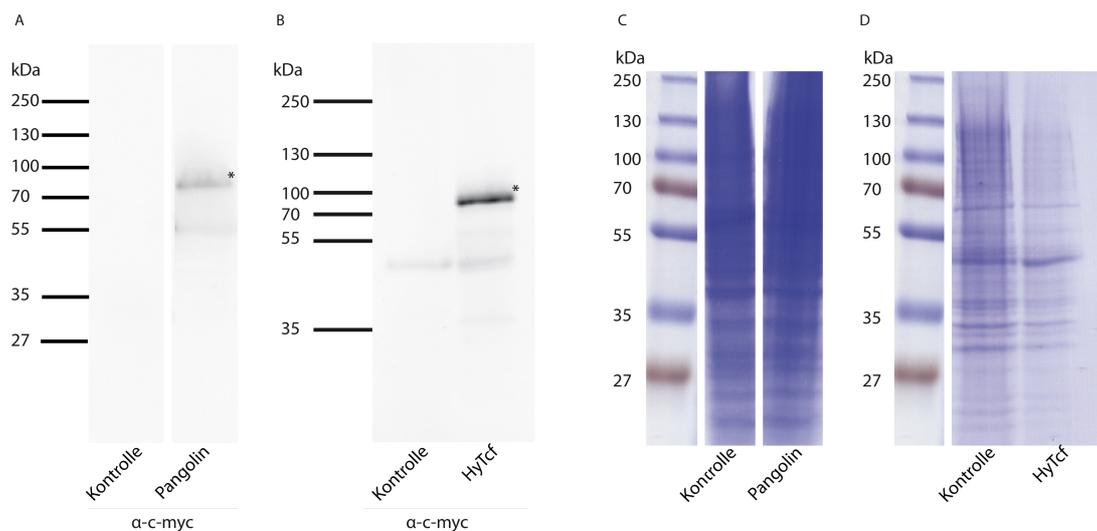
**Abbildung 5.1: Position des Mutagenese Primers HTcf\_Mutfor sowie der daraus resultierende Basenaustausch in der *hytcf* Sequenz.** Die obere Reihe zeigt einen Ausschnitt der *hytcf* DNA-Sequenz, darunter ist die Aminosäuresequenz gezeigt. Die Zahlen kennzeichnen die Position in der DNA- beziehungsweise der Aminosäuresequenz. In rot ist die Primersequenz sowie ihre Bindungsstelle in der DNA-Sequenz dargestellt. Die türkise Unterlegung zeigt die XhoI Schnittstelle und den aus der Mutagenese PCR resultierenden Basenaustausch.

In der Restriktionsanalyse konnte das erwartete *hytcf* Fragment mit einer Größe von circa 1.2 kb nachgewiesen werden (Abb. 5.2).



**Abbildung 5.2: Klonierung von *hytcf* in den Expressionsvektor pCS2myc.** A: Die Pfeilspitze markiert das mit der Restriktionsendonuklease XhoI ausgeschnittene *hytcf* Fragment in der erwarteten Größe von 1.2 kb. Die Vektorbande hat eine Größe von 4.3 kb. B: Die Vektorkarte zeigt die Orientierung von *hytcf* im Expressionsvektor pCS2myc.

Die Konstrukte wurden per Sequenzanalyse verifiziert (GATC Biotech, Konstanz). Das *C.elegans* Tcf *pop-1* lag bereits im Expressionsvektor pK-myc-C3 vor und konnte somit direkt für die *in vitro* Transkription verwendet werden (Masako, Budweis, Tschechien). Im Immunblot konnten die translatierten Proteine in den zu erwartenden Größen mit Hilfe eines gegen das fusionierte myc-Epitop gerichteten Antikörpers detektiert werden. Zur Überprüfung des Gesamtproteins wurde eine Coomassie Brilliant Blue (CBB) Färbung des SDS-Gels durchgeführt (Abb. 5.3).



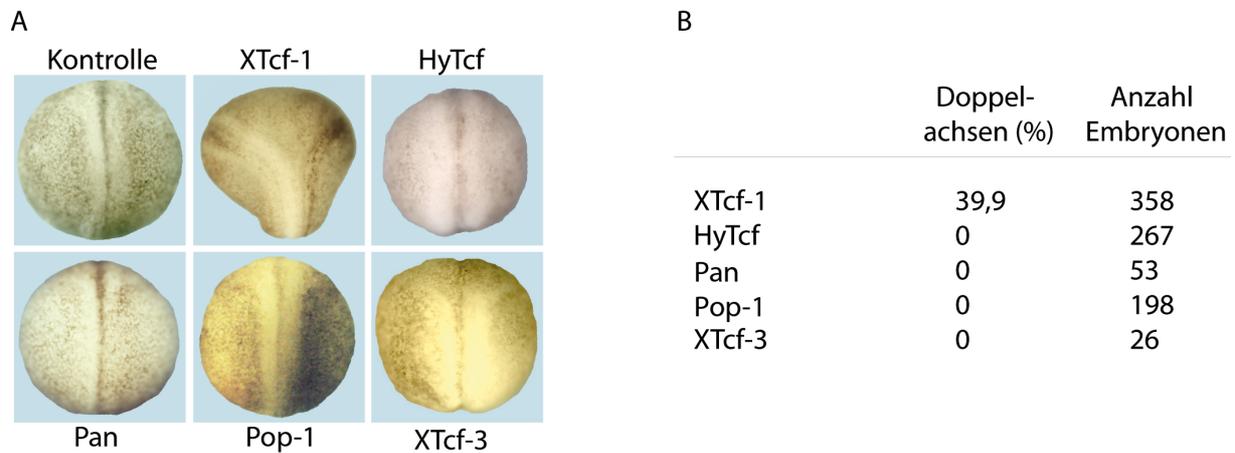
**Abbildung 5.3: Die Konstrukte Panmyc sowie HyTcfmyc werden in *Xenopus* Embryonen in Proteine translatiert.** A und B: Nach *in vitro* Transkription der Konstrukte PanpCS2myc und HyTcfCS2myc wurden je 500 pg der mRNA beidseitig animal in Zweizell-Stadien von *Xenopus* Embryonen injiziert. Diese wurden in Proteine der zu erwartenden Größen translatiert. Jede Spur enthält RIPA-Lysate, die der Proteinmenge eines halben Embryos im Stadium 13 entsprechen. Als Kontrolle wurden uninjizierte wildtypische Embryonen desselben Stadiums verwendet. Die Sterne markieren die entsprechende Proteinbande. In C und D ist die Ladekontrolle für Pangolin beziehungsweise HyTcf dargestellt. Verwendet wurde hierfür das im SDS-PAGE aufgetrennte Gesamtprotein, die Färbung erfolgte mittels Coomassie Brilliant Blue.

## 5.2 Aktivität der invertebraten Tcfs in Achseninduktionsexperimenten in *Xenopus* Embryonen

### 5.2.1 Die invertebraten Tcfs im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment

Das *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment dient der Untersuchung der Aktivität von Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs. Die Ausbildung einer zweiten Körperachse ist abhängig von der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs in *Xenopus* Embryonen (Smith und Harland, 1991; Sokol et al., 1991). Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs ist entscheidend für die Ausprägung des Nieuwkoop-Zentrums und legt somit die dorso-ventrale Polarität der Blastula fest. Wird der Wnt-Signalweg ventral aktiviert, führt dies zur Ausbildung eines zweiten

Nieuwkoop-Zentrums und im Anschluss zu einem zweiten Spemann Organisator und somit zu einer sekundären Körperachse (Smith und Harland, 1991; Sokol et al., 1991). Die dorsale Injektion von dominant negativem mLef-1 und XTcf-3 in *Xenopus* Embryonen dagegen führt zu ventralisierten Embryonen (Behrens et al., 1996).

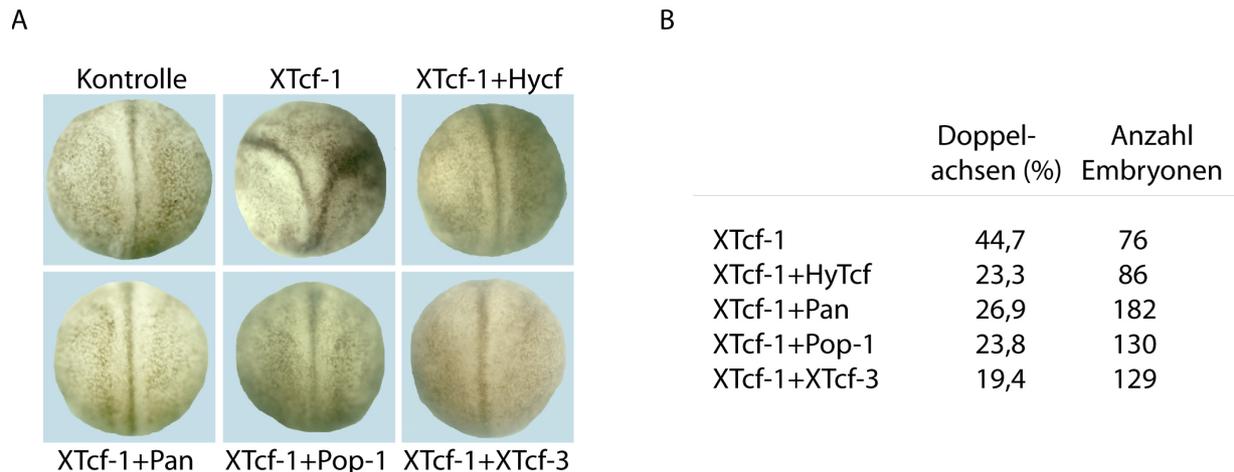


**Abbildung 5.4: Die ventrale Überexpression der invertebraten Tcfs induzierte keine sekundären Körperachsen.** A: Es wurden jeweils 500 pg mRNA in die ventralen Marginalzonen von Vierzell-Stadien injiziert und die Embryonen bis ins späte Neurulastadium (Stadium 17-19) kultiviert. Als Kontrolle wurden uninjizierte wildtypische Embryonen desselben Stadiums verwendet. In B ist die statistische Auswertung der Konstrukte gezeigt.

Zur Untersuchung der Tcfs wurden jeweils 500 pg *in vitro* transkribierte mRNA ventral in Vierzell-Stadien injiziert. Die Auswertung im späten Neurulastadium (Stadium 17-19) ergab, dass XTcf-1 hierbei als Aktivator anzusehen ist. Für XTcf-1 konnte bereits gezeigt werden, dass es nach ventraler Überexpression Doppelachsen induziert (Hamdi, Diplomarbeit, 2009). In diesem Experiment induzierte es bei 39.9 % der injizierten Embryonen eine sekundäre Körperachse (Abb. 5.4). Die mit den invertebraten Tcfs HyTcf, Pangolin und Pop-1 injizierten Embryonen bildeten dagegen keine Doppelachsen aus. Auch die wenigen XTcf-3 Embryonen zeigten, wie erwartet (Molenaar et al., 1996; Gradl et al., 2002), keine sekundären Körperachsen (Abb. 5.4).

### 5.2.2 Einfluss der invertebraten Tcfs auf den Aktivator XTcf-1 im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment

Um zu untersuchen, ob die invertebraten Tcfs, wie der Repressor XTcf-3, die Ausbildung XTcf-1 induzierter Doppelachsen unterdrücken, wurden 500 pg XTcf-1 mRNA mit 500 pg mRNA des zu testenden Konstrukts in die ventrale Marginalzone von Vierzell-Stadien koinjiziert (Abb. 5.5).

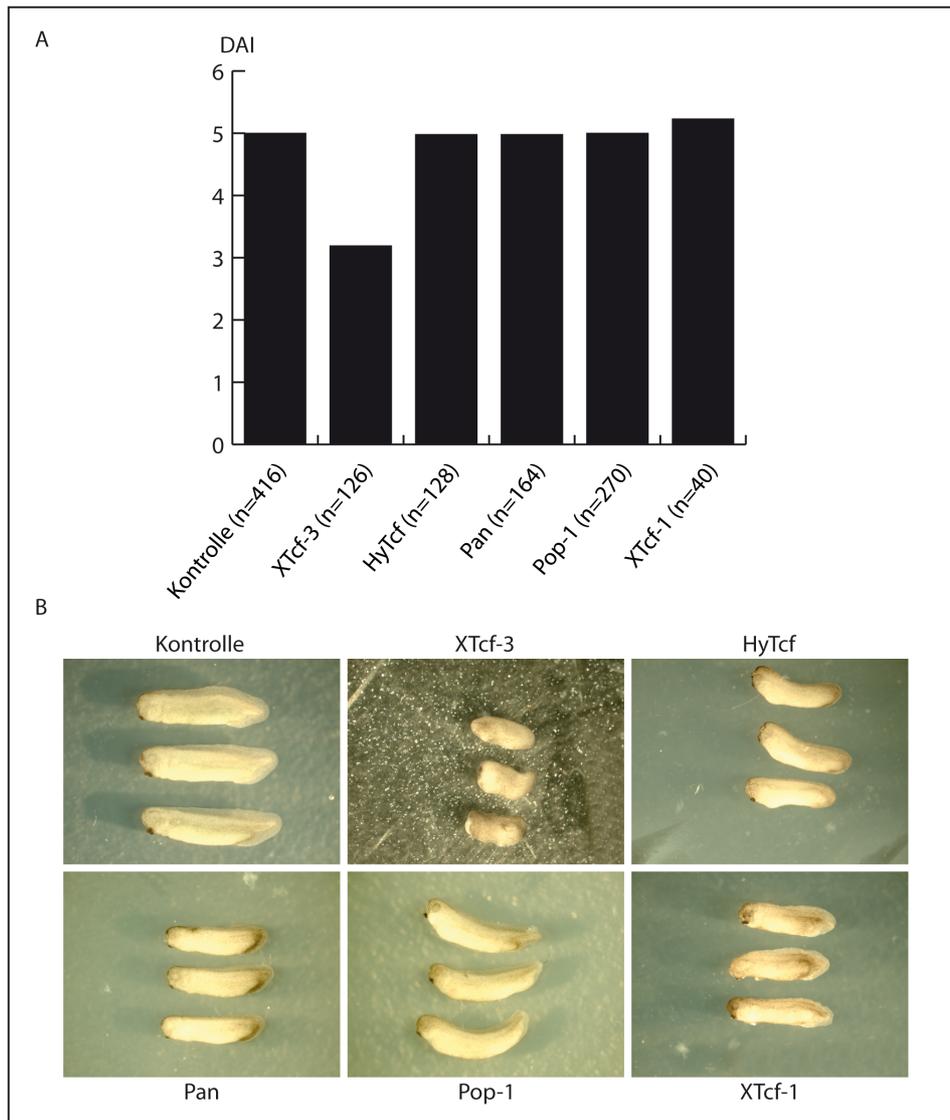


**Abbildung 5.5: Die ventrale Überexpression von XTcf-1 bei gleichzeitiger Überexpression der invertebraten Tcfs beziehungsweise von XTcf-3 führte zu einer Reduktion der Doppelachsen.** A: XTcf-1 induzierte Doppelachsen wurden durch Koinjektion von HyTcf, Pangolin, Pop-1 und XTcf-3 reprimiert. 500 pg XTcf-1 mRNA wurden mit jeweils 500 pg mRNA des angegeben Konstrukts in die ventralen Marginalzonen im Vierzell-Stadium injiziert. Die *Xenopus* Embryonen wurden bis ins späte Neurulastadium kultiviert (Stadium 17-19). Als Kontrolle dienten wildtypische uninjizierte Embryonen desselben Stadiums. B: Statistische Auswertung der induzierten Doppelachsen.

Die ventrale Injektion von XTcf-1 führte in diesem Experiment bei 44.7 % der Embryonen zu einer Doppelachseninduktion. Für XTcf-3 konnte bereits gezeigt werden, dass es die durch mLef-1 induzierten Doppelachsen unterdrückt (Gradl et al., 2002). Bei allen koinjizierten invertebraten Tcfs sank dieser Wert, ähnlich wie bei XTcf-3, auf fast die Hälfte ab (Abb. 5.5). Somit wirken im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment alle drei untersuchten invertebraten Tcfs als Repressoren.

### 5.2.3 Auswirkungen der dorsal überexprimierten invertebraten Tcfs auf die dorsale Achsenformierung

Da der kanonische Wnt-Signalweg dorsal aktiv ist, ventralisiert ein dorsal injizierter Repressor des kanonischen Wnt-Signalwegs die injizierten Embryonen. Dieser ventralisierte Phänotyp kann über die Bestimmung der Mittelwerte des dorsoanterioren Index (DAI) quantifiziert werden. Dabei entspricht nach Kao und Elinson (1988) ein DAI von 0 vollständig ventralisierten Embryonen (Bauchstücke), ein DAI von 5 entspricht wildtypischen Embryonen, der DAI von 10 steht für vollständig dorsalisiert.



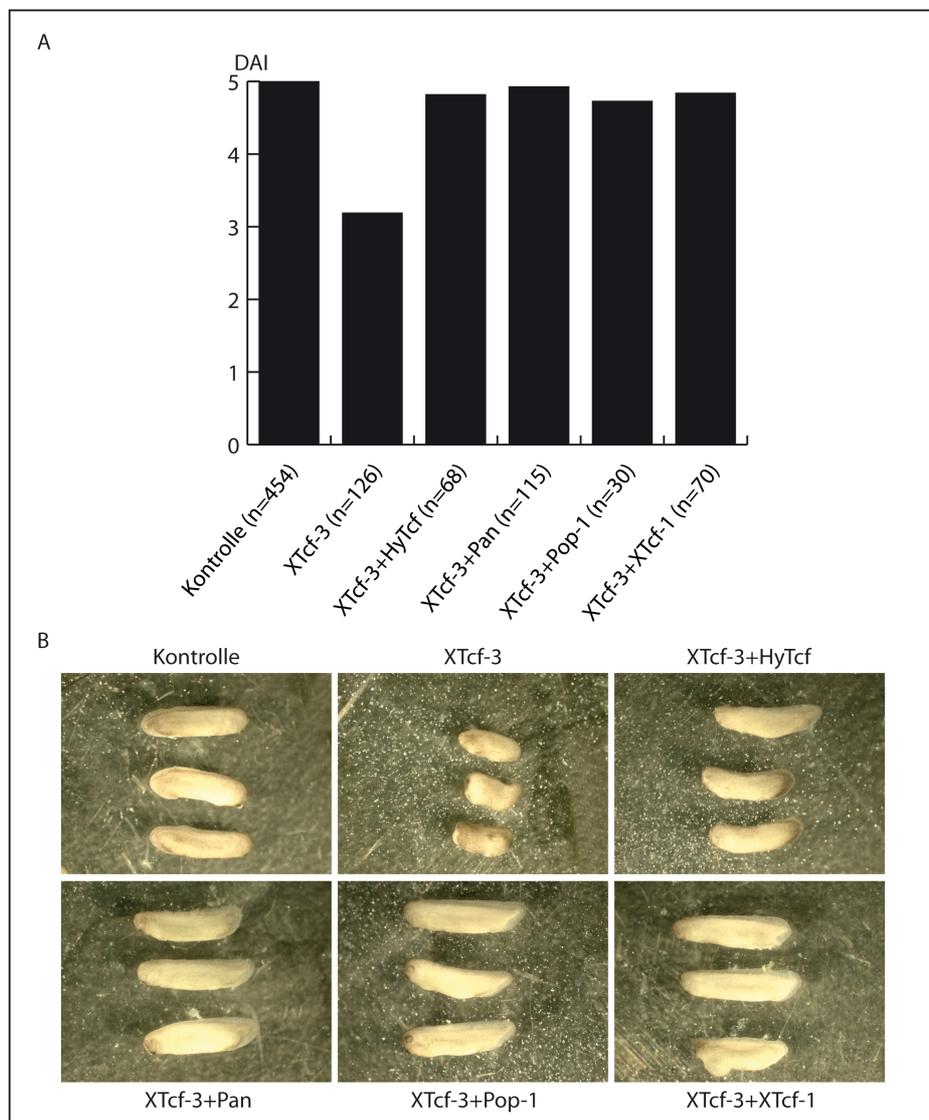
**Abbildung 5.6: Die dorsale Überexpression von XTcf-1 sowie der invertebraten Tcfs hatte keinen Einfluss auf die Formierung der endogenen Körperachse.** In A ist die statistische Auswertung der Konstrukte gezeigt. Die dorsale Injektion von XTcf-3 führte zu einem DAI von 3.2. Die invertebraten Tcfs sowie XTcf-1 zeigten nahezu wildtypische DAI Werte. B: Es wurden jeweils 700 pg mRNA in die dorsalen Marginalzonen von Vierzell-Stadien injiziert und bis ins Stadium 35-38 kultiviert. Als Kontrolle dienen uninjizierte wildtypische Embryonen desselben Stadiums.

Die dorsale Applikation von 700 pg mRNA des Repressors XTcf-3 erzeugte Embryonen, welche einen Durchschnitts-DAI von 3.2 aufwiesen (Abb. 5.6). Der Aktivator XTcf-1 dagegen ist in diesem Experiment inert. Dies zeigte sich in einem DAI Wert von 5.2. HyTcf, Pangolin und Pop-1 zeigten ebenfalls keine Repressoreigenschaften. Der Durchschnitts-DAI Wert von 5 entspricht dem DAI nicht injizierter Embryonen. Somit wirkt im *Xenopus* Achsenrepressionsexperiment keines der drei untersuchten invertebraten Tcfs als Repressor.

### 5.2.4 Einfluss der invertebraten Tcfs auf den Repressor XTcf-3 im Hinblick auf den dorso-anterioren Index (DAI)

Nachdem die invertebraten Tcfs auf der ventralen Seite, nicht aber auf der dorsalen Seite, als Repressoren wirkten, sollte nun geklärt werden, ob sie stattdessen auf der dorsalen Seite als Aktivatoren wirken können. Dies würde bedeuten, dass sie den ventralisierenden Effekt des Repressors XTcf-3 wieder aufheben können.

Tatsächlich führte die Koapplikation von 500 pg mRNA der invertebraten Tcfs zusammen mit 700 pg XTcf-3 mRNA zu einem DAI nahe 5 und damit zu annähernd wildtypischen Embryonen (Abb. 5.7). Pangolin, Pop-1 und HyTcf wirken demnach auf der dorsalen Seite, wie XTcf-1, dem Repressor XTcf-3 entgegen und damit als Aktivatoren der endogenen Körperachse. Somit verhalten sich die invertebraten Tcfs in diesem Experiment wie der Aktivator XTcf-1.



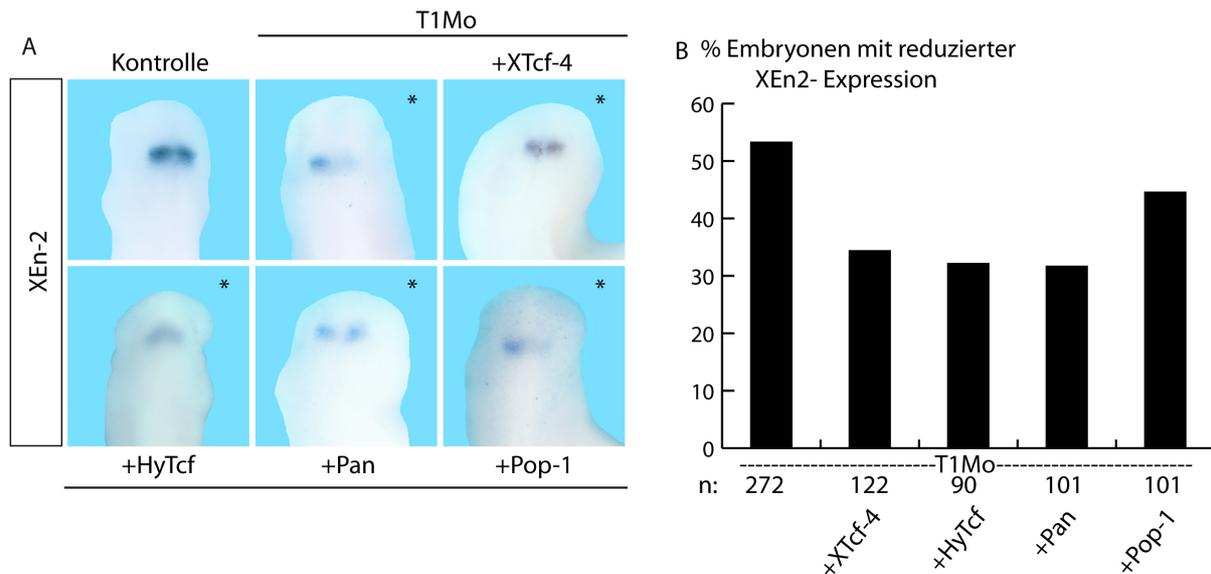
**Abbildung 5.7: Die Applikation von XTcf-1 sowie der invertebraten Tcfs führte zu einer Abschwächung des ventralisierten XTcf-3 Phänotyps.** In A ist die statistische Auswertung der Konstrukte gezeigt. Die dorsale Injektion von XTcf-3 führte zu einem DAI von 3.2. Die invertebraten Tcfs HyTcf (4,8), Pangolin (4,9) und Pop-1 (4,7) sowie XTcf-1 (4,8) zeigten nahezu wildtypische DAI Werte. B: Es wurden jeweils 700 pg XTcf-3 mRNA injiziert, für die jeweils koinjizierten Konstrukte wurden 500 pg mRNA eingesetzt. Auch hier wurde in die dorsalen Marginalzonen von Vierzell-Stadien injiziert und die Embryonen bis ins Stadium 35-38 kultiviert. Als Kontrollen wurden uninjizierte wildtypische Embryonen desselben Stadiums verwendet.

### 5.3 Überprüfung der Spezifität im Wiederherstellungsexperiment

Als nukleäre Mediatoren der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalkaskade haben die Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren individuelle Eigenschaften und spezifische nicht-redundante Funktionen. Die nicht-redundanten Funktionen von XTcf-3, XTcf-1 und XTcf-4 in der Neuralentwicklung von *Xenopus laevis* (van Venrooy et al., 2008; Koenig et al., 2010), stellen die Grundlage der im Folgenden beschriebenen Wiederherstellungsexperimente dar. Dabei spielen sowohl XTcf-1 als auch XTcf-4 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Mittelhirns sowie der Mittel-Hinterhirn-Region, wobei XTcf-1 das im Mittelhirn exprimierte XTcf-4 aktiviert. Dies führt wiederum zur Aktivierung des Isthmus spezifischen Markergens *Xen-2* (Koenig et al., 2010).

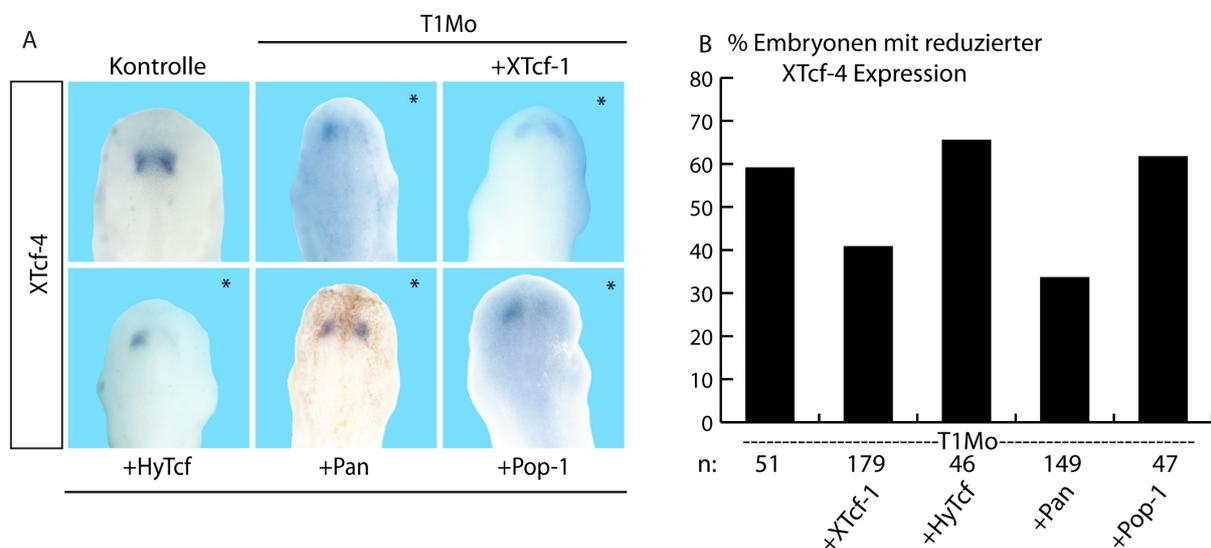
#### 5.3.1 Das *Drosophila* Tcf Pangolin kann die XTcf-4 Expression in XTcf-1-depletierten Embryonen wiederherstellen

Das Herunterregulieren von XTcf-1 mittels Injektion des spezifischen *antisense* Morpholinos, resultierte in einer Reduktion der XEn-2 Expression in 53 % der Embryonen (Abb. 5.8). Dabei wurden 4 pMol des Morpholinos in eine Blastomere des Zweizell-Stadiums injiziert. Die gleichzeitige Applikation von 500 pg XTcf-4 cDNA führte nur noch bei 34 % der Embryonen zu einer Reduktion der XEn-2 Expression. Somit war die Expression partiell wieder hergestellt. Auch die Koinjektion der invertebraten Tcfs aus *Hydra* (HyTcf) und *Drosophila* (Pangolin) hatten eine partielle Rekonstitution der XEn-2 Expression zur Folge. Bei HyTcf und Pangolin war in 32 % der Embryonen noch eine Reduktion der XEn-2 Expression erkennbar. Dagegen hatte das koinjizierte *C.elegans* Tcf Pop-1 keinen Einfluss, die XEn-2 Expression war bei 45 % der Embryonen reduziert.



**Abbildung 5.8: Die Applikation von XTcf-4, sowie der invertebraten Tcfs HyTcf und Pangolin führte zu einer partiellen Wiederherstellung der XEn-2 Expression in XTcf-1 depletierten Embryonen** A: Für die Wiederherstellungsexperimente wurden jeweils 4 pMol XTcf-1 Morpholino (T1Mo) sowie 500 pg cDNA in eine Blastomere animal im Zweizell-Stadium injiziert. Die XEn-2 Expression der injizierten Seite wurde mittels *in situ* Hybridisierung im Stadium 26 mit der Expression der nicht-injizierten Seite verglichen. Der Stern markiert die injizierte Seite. B: Statistische Auswertung der in der *in situ* Hybridisierung gezeigten Embryonen. Gezeigt ist die jeweilige Reduktion der XEn-2 Expression nach Applikation der verschiedenen Konstrukte. n= Anzahl der in der *in situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen.

Die verminderte Reduktion der XEn-2 Expression kann zum einen auf der Tatsache beruhen, dass HyTcf und Pangolin die Depletion von XTcf-1 retten können. Zum anderen wäre aber auch möglich, dass diese invertebraten Tcfs die Funktion des XTcf-1 Zielgens XTcf-4 ersetzen und aufgrund dessen die XEn-2 Expression wiederhergestellt wird. Daher wurde zunächst die Expression von XTcf-4 in XTcf-1 depletierten Embryonen untersucht (Abb. 5.9).



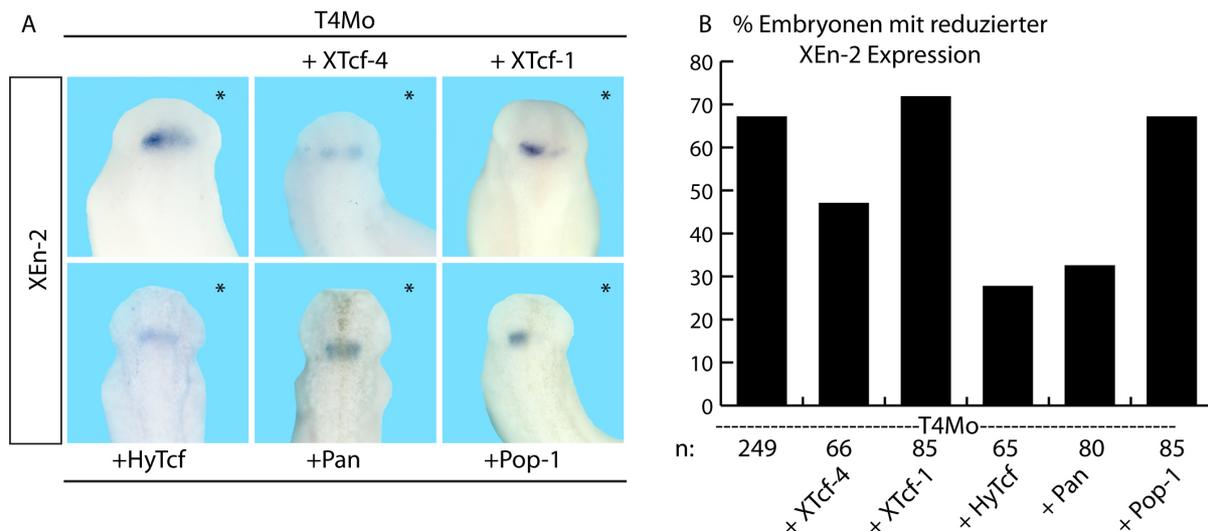
**Abbildung 5.9: XTcf-1 sowie das invertebraten Tcf Pangolin führten zu einer partiellen Wiederherstellung der XTcf-4 Expression in XTcf-1 depletierten Embryonen** A: Für die Wiederherstellungsexperimente wurden jeweils 4 pMol XTcf-1 Morpholino (T1Mo) sowie 500 pg cDNA in eine Blastomere animal im Zweizell-Stadium injiziert. Die XTcf-4 Expression der injizierten Seite wurde mittels *in situ* Hybridisierung im Stadium 26 mit der Expression der nicht-injizierten Seite verglichen. Der Stern markiert die injizierte Seite. B: Statistische Auswertung der in der *in situ* Hybridisierung gezeigten Embryonen. Gezeigt ist die jeweilige Reduktion der XTcf-4 Expression nach Applikation der verschiedenen Konstrukte. n= Anzahl der in der *in situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen.

In diesem Experiment war die XTcf-4 Expression nach XTcf-1 Depletion bei 59 % der Embryonen reduziert (Abb. 5.9). Tatsächlich konnte neben XTcf-1 (41 %) nur Pangolin die XTcf-4 Expression partiell wiederherstellen (34 %). Im Gegensatz hierzu führte die Koinjektion von HyTcf bei 66 % und Pop-1 bei 62 % der Embryonen zu einer Reduktion der XTcf-4 Expression. Somit waren beide nicht zur Rekonstitution der XTcf-4 Expression in der Lage.

Aufgrund dieser Resultate kann von einer unterschiedlichen Regulation der Wnt-Zielgene XTcf-4 (Koenig et al., 2010) und XEn-2 (McGrew et al., 1999) ausgegangen werden. Während die Kontrolle der XEn-2 Expression sowohl von Pangolin als auch von HyTcf übernommen werden kann, ist nur Pangolin in der Lage die XTcf-4 Expression zu kontrollieren. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, dass HyTcf das XTcf-1 Zielgen XTcf-4 ersetzen kann, Pangolin dagegen XTcf-1. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde im Folgenden versucht, XTcf-4 durch die invertebraten Tcfs zu ersetzen.

### 5.3.2 Die invertebraten Tcfs Pangolin und HyTcf können XTcf-4 ersetzen

10 pMol XTcf-4 spezifisches *antisense* Morpholino wurden zusammen mit 500 pg cDNA der unterschiedlichen Tcfs in eine Blastomere im Zweizell-Stadium appliziert. Die Depletion von XTcf-4 führte bei 67 % der Embryonen zu einer reduzierten XEn-2 Expression (Abb. 5.10). Durch koinjiziertes XTcf-4 konnte dies auf 47 % angehoben werden. Hingegen hatte die Applikation von XTcf-1 keinen Einfluss auf die Expression. So zeigten 72 % der Embryonen eine Reduktion. Ein ähnliches Ergebnis wurde für Pop-1 erzielt, hier resultierte die Applikation in einer Reduktion von 67 % der Embryonen. Somit waren XTcf-1 und Pop-1 nicht in der Lage, den Verlust von XTcf-4 zu kompensieren. Einen Effekt hatten jedoch die Koinjektionen von HyTcf und Pangolin, die Reduktion der XEn-2 Expression wurde im Falle von HyTcf auf 28 %, bei Pangolin auf 33 % der Embryonen gesenkt (Abb. 5.10). Somit konnte eine partielle Wiederherstellung der XEn-2 Expression nach Applikation der cDNA von XTcf-4 sowie HyTcf und Pangolin erzielt werden.



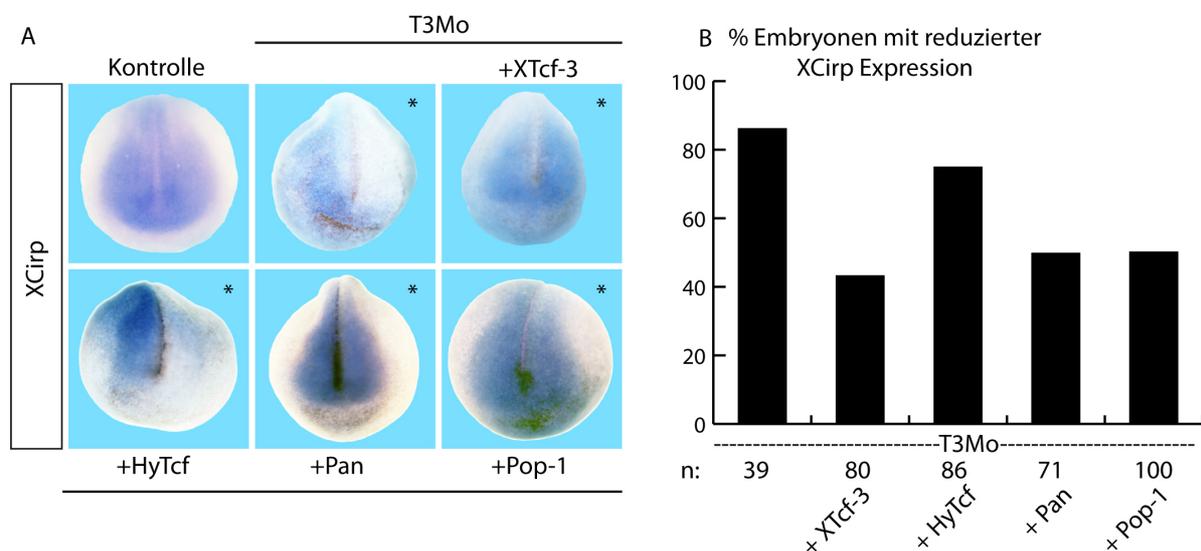
**Abbildung 5.10: XTcf-4 sowie die invertebraten Tcfs HyTcf und Pangolin führten zu einer partiellen Wiederherstellung der XEn-2 Expression in XTcf-4 depletierten Embryonen** A: Für die Wiederherstellungsexperimente wurden jeweils 10 pMol XTcf-4 Morpholino (T4Mo) sowie 500 pg cDNA in eine Blastomere animal im Zweizell-Stadium injiziert. Die XEn-2 Expression der injizierten Seite wurde mittels *in situ* Hybridisierung im Stadium 26 mit der Expression der nicht-injizierten Seite verglichen. Der Stern markiert die injizierte Seite. B: Statistische Auswertung der in der *in situ* Hybridisierung gezeigten Embryonen. Gezeigt ist die jeweilige Reduktion der XEn-2 Expression nach Applikation der verschiedenen Konstrukte. n= Anzahl der in der *in situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen.

Die Wiederherstellungsexperimente in XTcf-1 und XTcf-4 depletierten Embryonen zeigten, dass die invertebraten Tcfs spezifisch die zwei getesteten XTcfs ersetzen können. So kann Pangolin die XTcf-4 Expression in XTcf-1 depletierten Embryonen wiederherstellen und damit die Funktion von XTcf-1 übernehmen. Des Weiteren ist es in der Lage, wie auch das getestete HyTcf, in XTcf-4 depletierten Embryonen die XEn-2 Expression partiell wiederherzustellen und damit die Funktion von XTcf-4 zu übernehmen.

### 5.3.3 Die invertebraten Tcfs Pangolin und Pop-1 können XTcf-3 im Wiederherstellungsexperiment ersetzen

Das *Xenopus cold-inducible RNA binding protein* (Xcirp) konnte als XTcf-3 spezifisches Zielgen identifiziert werden, also ein Zielgen, das von XTcf-3, nicht aber von XTcf-1, XTcf-4 oder XLef-1, reguliert wird (van Venrooy et al., 2008). Somit konnten die invertebraten Tcfs, HyTcf, Pangolin und Pop-1 auf ihre Fähigkeit hin getestet werden die XCirp Expression im XTcf-3 depletierten Hintergrund wiederherzustellen. Im Rahmen ihrer Bachelorarbeit und unter meiner Anleitung, injizierte Juliane Strietz (2010) 2 pMol des XTcf-3 spezifischen *antisense* Morpholinos animal in eine Blastomere in Zweizell-Stadien. Dies führte zu einer Reduktion der XCirp Expression in 86 % der Embryonen. Wurden zusätzlich 1000 pg

XTcf-3 mRNA in die *Xenopus* Embryonen appliziert, zeigten noch 43 % der Embryonen eine reduzierte XCirp Expression. Die Koinjektion von HyTcf mRNA hatte keine Auswirkung auf die XCirp Expression, diese war bei 75 % der Embryonen reduziert. Im Gegensatz hierzu, zeigte applizierte Pangolin und Pop-1 mRNA deutliche Effekte. So war die XCirp Expression in nur noch 50 % der Pangolin injizierten Embryonen reduziert. Ein entsprechendes Resultat konnte für die Applikation der Pop-1 mRNA erzielt werden, hier lag die Reduktion der XCirp Expression ebenfalls bei 50 % der Embryonen (Abb. 5.11). XTcf-3 kann also durch Pangolin und Pop-1, nicht aber durch HyTcf ersetzt werden.



**Abbildung 5.11: Die Applikation von XTcf-3, sowie der invertebraten Tcfs Pangolin und Pop-1 führte zu einer partiellen Wiederherstellung der XCirp Expression in XTcf-3 depletierten Embryonen** A: Für die Wiederherstellungsexperimente wurden jeweils 2 pMol XTcf-3 Morpholino (T3Mo) sowie 1000 pg mRNA in eine Blastomere animal im Zweizell-Stadium injiziert. Die XCirp Expression der injizierten Seite wurde mittels *in situ* Hybridisierung im Stadium 16 mit der Expression der nicht-injizierten Seite verglichen. Der Stern markiert die injizierte Seite. B: Statistische Auswertung der in der *in situ* Hybridisierung gezeigten Embryonen. Gezeigt ist die jeweilige Reduktion der XCirp Expression nach Applikation der verschiedenen Konstrukte. n= Anzahl der in der *in situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen.

Insgesamt lieferten die Rekonstitutionsexperimente überraschend spezifische Ergebnisse. So ist Pangolin in der Lage XTcf-1, XTcf-4 und XTcf-3 zu ersetzen. HyTcf sowie Pop-1 können jeweils ein XTcf ersetzen. HyTcf kann die Expression von XEn-2 in XTcf-4 depletierten Embryonen wiederherstellen. Pop-1 dagegen die XCirp Expression im XTcf-3 depletierten Hintergrund. Die Ergebnisse dieser Wiederherstellungsexperimente sind in Tab. 5.1 (Kapitel 5. 6, S. 86) zusammengefasst.

## 5.4 Einfluss des C-Terminus von XTcf-1

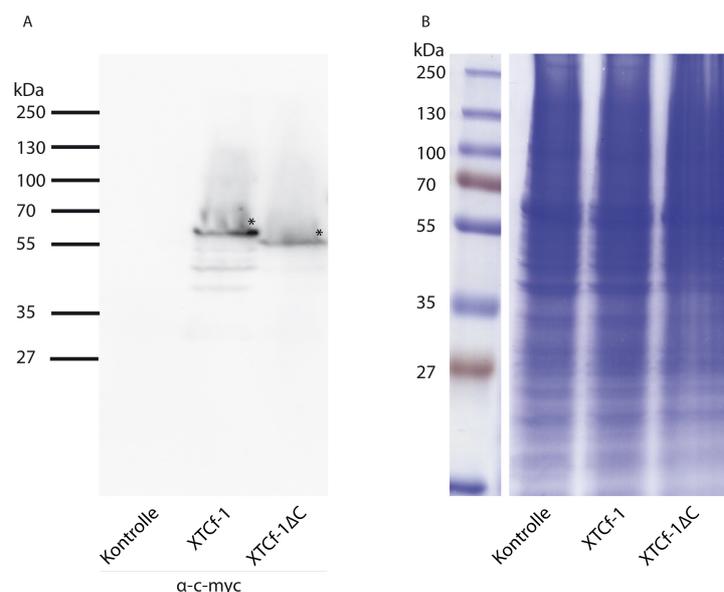
Zur Untersuchung, welchen Einfluss die im C-Terminus von XTcf-1 enthaltene CRARF Domäne auf die Fähigkeit der Doppelachseninduktion ausübt, wurde das Deletionskonstrukt XTcf-1 $\Delta$ C konzipiert. Bei diesem Konstrukt wurden die 28 C-terminalen Aminosäuren deletiert (Abb. 5.12). Die Herstellung dieses Konstrukts wurde von Kamar Hamdi im Rahmen ihrer Diplomarbeit (2009) durchgeführt.

```

303 ARKERQLHMQLYPGWSARDNYGKRKRRTREKHQDSSSDPGSPKKCRARFGLNQQTDCGPCR 364
      |||||
303 ARKERQLHMQLYPGWSARDNYGKRKRRTREKHQD                               336
  
```

**Abbildung 5.12: Anlagerung des Deletionskonstruktes XTcf-1 $\Delta$ C an die wildtypische XTcf-1 Sequenz.** Die obere Aminosäuresequenz zeigt den C-terminalen Abschnitt des wildtypischen XTcf-1 Proteins. In rot ist die Position des CRARF Motivs markiert. Bei der unteren Sequenz ist der deletierte C-Terminus des XTcf-1 $\Delta$ C Konstrukts dargestellt. Die Zahlen markieren die Position in der Aminosäuresequenz.

Im Immunblot konnte nachgewiesen werden, dass die in *Xenopus* Embryonen injizierten Konstrukte Proteine in den erwarteten Größen aufwiesen (Abb. 5.13).



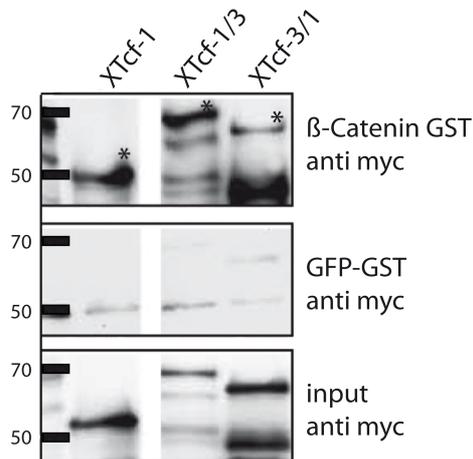
**Abbildung 5.13: Expressionsnachweis des Deletionskonstruktes XTcf-1 $\Delta$ CpCS2myc.** A: Die synthetisierte mRNA wird in ein Protein der zu erwartenden Größen translatiert. Jede Spur enthält RIPA-Lysate, die der Proteinmenge eines halben Embryos im Stadium 13 entsprechen. Als Kontrolle wurden uninjizierte wildtypische Embryonen desselben Stadiums verwendet. Die Sterne markieren die entsprechende Bande. In B ist die Ladekontrolle für XTcf-1 $\Delta$ C und XTcf-1 dargestellt. Verwendet wurde hierfür das im SDS-PAGE aufgetrennte Gesamtprotein, die Färbung erfolgte mittels Coomassie Brilliant Blue.

Zur funktionalen Analyse wurde dieses Deletionskonstrukt im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment untersucht. Überraschenderweise war das C-terminal deletierte XTcf-1 deutlich inaktiver als wildtypisches XTcf-1 (Abb. 5.14).

Nur noch 7.8 % der injizierten Embryonen zeigten nach ventraler Applikation von 500 pg mRNA des XTcf-1 $\Delta$ C eine sekundären Körperachse. Das als Positivkontrolle verwendete XTcf-1 induzierte hingegen in 39.9 % der Embryonen eine Achsenduplikation.

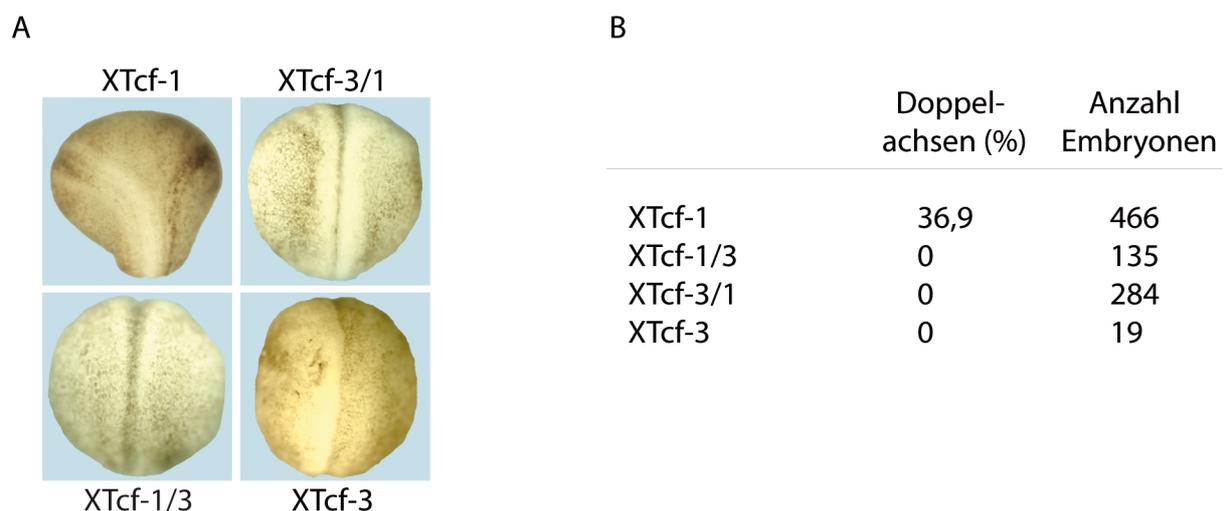


Zunächst wurde in einem GST-Pulldown Experiment (Glutathion-S-Transferase) die Bindung der chimären Konstrukte XTcf-1/3 und XTcf3/1 an vertebraten  $\beta$ -Catenin überprüft. Hierbei zeigte sich, dass beide Chimären in der Lage sind an  $\beta$ -Catenin zu binden. Als Kontrolle wurde in diesem Experiment ein GFP-GST (green fluorescent protein, grün fluoreszierendes Protein) Konstrukt verwendet (Abb. 5.16).



**Abbildung 5.16: Die chimären Konstrukte aus XTcf-1 und XTcf-3 binden an  $\beta$ -Catenin.** Die RIPA-Lysate transfizierter HEK293 Zellen wurden mit immobilisiertem  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Catenin-GST) und GFP (GFP-GST) inkubiert. Nach Elution wurden die Proteine in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Ein Antikörper gegen das fusionierte myc Epitop erkennt die transfizierten Konstrukte (Sterne).

Um die Aktivatoreigenschaft zu überprüfen wurden die beiden Chimären XTcf-1/3 und XTcf-3/1 im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment getestet. Hierzu wurden jeweils 500 pg mRNA in die ventrale Marginalzone von Vierzell-Stadien appliziert (Abb. 5.17).

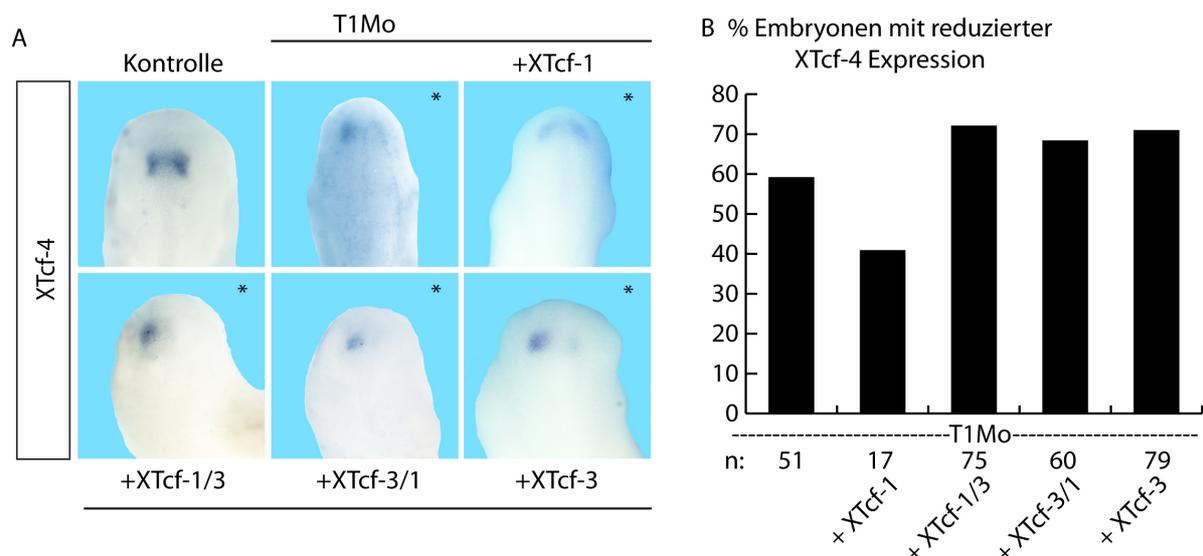


**Abbildung 5.17: Die chimären Konstrukte XTcf-1/3 und XTcf-3/1 verhielten sich im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment wie der Repressor XTcf-3.** A: Es wurden jeweils 500 pg mRNA in die ventrale Marginalzone von Vierzell-Stadien in *Xenopus* Embryonen injiziert. Diese wurden bis ins Neurulastadium (Stadium 17-19) kultiviert. Als Kontrolle dienten wildtypische uninjizierte Embryonen, die ebenfalls bis ins Neurulastadium kultiviert wurden. B: Statistische Auswertung der im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment getesteten chimären Konstrukte.

Die ventrale Überexpression von XTcf-1 führte bei 36.9 % der Embryonen zu einer sekundären Körperachse. Die Chimären XTcf-3/1 und XTcf-1/3 sowie XTcf-3 induzierten hingegen keine Doppelachsen. Im *Xenopus* Achsenduplikations-experiment verhalten sich die beiden Chimären demnach wie der Repressor XTcf-3.

Um die Funktionalität der Chimären im Wiederherstellungsexperiment zu untersuchen, wurde zunächst eine XTcf-1 Depletion und im nächsten Schritt eine XTcf-3 Depletion durchgeführt. Durch anschließende *in situ* Hybridisierung wurden die Auswirkungen der koinjizierten Chimären auf die spezifische Zielgenexpression untersucht.

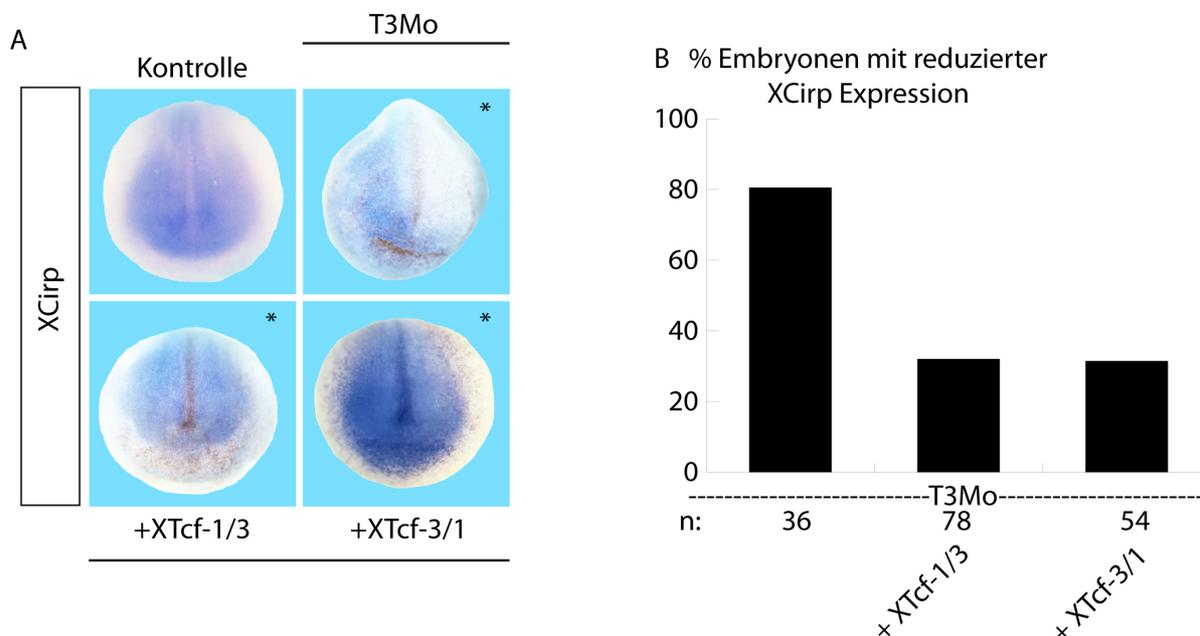
Für die Untersuchung im XTcf-1 depletierten Hintergrund wurden 4 pMol spezifisches *antisense* Morpholino einseitig animal in Zweizell-Stadien appliziert. Die XTcf-1 Depletion führte bei 59 % der Embryonen zu einer Reduktion der XTcf-4 Expression. Eine Rekonstitution wurde durch zusätzliche Applikation von XTcf-1 cDNA erreicht, hier zeigte sich bei 41 % der Embryonen eine Reduktion der XTcf-4 Expression. Die Applikation von 500 pg cDNA der Chimäre XTcf-1/3 resultierte in 72 % und bei XTcf-3/1 in 68 % der untersuchten Embryonen in einer Reduktion. Auch die Applikation von XTcf-3 führte zu keiner Rekonstitution, die XTcf-4 Expression war bei 71 % der Embryonen reduziert (Abb. 5.18).



**Abbildung 5.18: Die Chimären XTcf-1/3 und XTcf3/1 konnten XTcf-1 im Wiederherstellungsexperiment nicht ersetzen.** A: Für die Wiederherstellungsexperimente wurden jeweils 4 pMol XTcf-1 Morpholino (T1Mo) sowie 500 pg cDNA in eine Blastomere animal im Zweizell-Stadium injiziert. Die XTcf-4 Expression der injizierten Seite wurde mittels *in situ* Hybridisierung im Stadium 26 mit der Expression der nicht-injizierten Seite verglichen. Der Stern markiert die injizierte Seite. B: Statistische Auswertung der in der *in situ* Hybridisierung gezeigten

Embryonen. Gezeigt ist die jeweilige Reduktion der XTcf-4 Expression nach Applikation der verschiedenen Konstrukte. n= Anzahl der in der *in situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen.

Die beiden chimären Konstrukte wurden ebenfalls im XTcf-3 depletierten Hintergrund untersucht. Dazu wurden 2 pMol des XTcf-3 spezifischen *antisense* Morpholinos in Zweizell-Stadien einseitig animal appliziert. Die im Anschluss durchgeführte *in situ* Hybridisierung zeigte für diese Embryonen eine Reduktion der XCirp Expression bei 81 % der Embryonen. Die zusätzliche Applikation von 1000 pg mRNA der Chimäre XTcf-1/3 jedoch bewirkte, dass nur noch 32 % der Embryonen eine reduzierte XCirp Expression aufwiesen. Ein ähnliches Ergebnis ergab die Koinjektion von XTcf-3/1, die Reduktion lag bei 31 % der ausgewerteten Embryonen (Abb. 5.19).



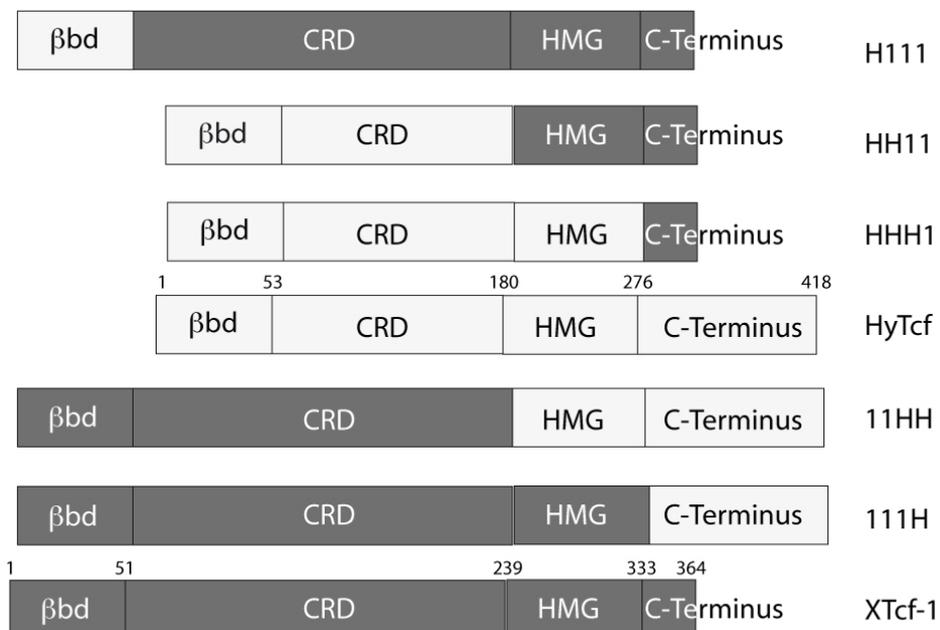
**Abbildung 5.19: Die Chimären XTcf-1/3 und XTcf3/1 konnten XTcf-3 im Wiederherstellungsexperiment ersetzen.** A: Für die Wiederherstellungsexperimente wurden jeweils 2 pMol XTcf-3 Morpholino (T3Mo) sowie 1000 pg mRNA in eine Blastomere animal im Zweizell-Stadium injiziert. Die XCirp Expression der injizierten Seite wurde mittels *in situ* Hybridisierung im Stadium 16 mit der Expression der nicht-injizierten Seite verglichen. Der Stern markiert die injizierte Seite. B: Statistische Auswertung der in der *in situ* Hybridisierung gezeigten Embryonen. Gezeigt ist die jeweilige Reduktion der XCirp Expression nach Applikation der verschiedenen Konstrukte. n= Anzahl der in der *in situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen.

So zeigte sich auch in den Wiederherstellungsexperimenten, dass die chimären Konstrukte XTcf-1/3 und XTcf-3/1 sich wie XTcf-3 verhalten. Dieses, bereits von Juliane Strietz im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (2010) erhaltene Ergebnis, wurde demnach in der vorliegenden Arbeit verifiziert. Das Vorhandensein des C-Terminus, beziehungsweise der Kontext-abhängigen regulatorischen Domäne (CRD, context

dependent regulatory domain) von XTcf-3, ist somit ausreichend für die spezifische XTcf-3 Funktion der XCirp Regulation.

## 5.6 Austausch der Domänen von XTcf-1 und HyTcf

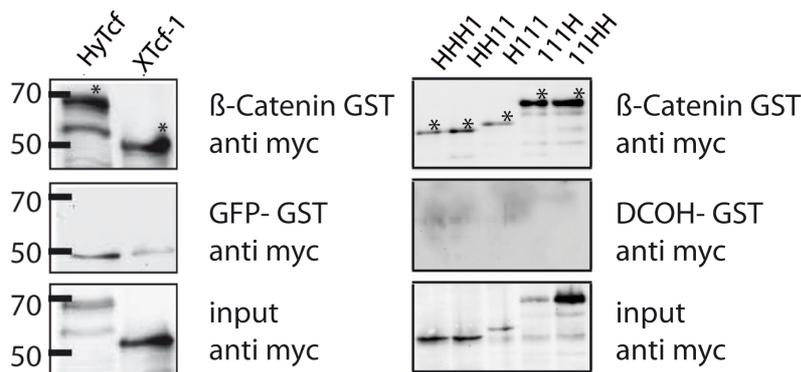
Die Ergebnisse im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment sowie in den funktionalen Analysen der Wiederherstellungsexperimente zeigten klare funktionale Unterschiede zwischen HyTcf und XTcf-1. Um Erkenntnisse zu gewinnen, inwiefern diese Unterschiede auf die verschiedenen Domänen der Proteine zurückzuführen sind, wurden chimäre Proteine untersucht. Dabei wurden die vier Domänen der Proteine miteinander getauscht und diese Chimären sowohl im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment, als auch in Wiederherstellungsexperimenten untersucht. Die verwendete Nomenklatur der Chimären beruht auf folgendem Prinzip: Die Herkunft der jeweiligen Domänen im chimären Protein sind durch 1 für XTcf-1 beziehungsweise durch H für HyTcf abgekürzt. Somit ergibt sich für ein Konstrukt, bei welchem die  $\beta$ -Catenin Bindedomäne ( $\beta$ bd) von HyTcf, die CRD von XTcf-1, die High Mobility Group (HMG) sowie der C-Terminus ebenfalls von XTcf-1 stammen, die Bezeichnung H111. Dieses Prinzip gilt entsprechend für alle chimären Konstrukte bestehend aus XTcf-1 und HyTcf (Abb. 5.20).



**Abbildung 5.20: Schematische Darstellung der chimären Konstrukte bestehend aus XTcf-1 und HyTcf.** Die vier Domänen  $\beta$ -Catenin Bindedomäne ( $\beta$ bd), Kontext abhängige regulatorische Domäne (context dependent regulatory domain, CRD), High Mobility Group (HMG) sowie der C-Terminus wurden ausgetauscht. Dabei sind die Domänen von HyTcf in hellgrau die von XTcf-1 in dunkelgrau dargestellt. Durch Austausch der  $\beta$ bd und der CRD von XTcf-1 und HyTcf entstanden die Chimären HH11 und 11HH. Der Austausch der  $\beta$ bd von XTcf-1 mit

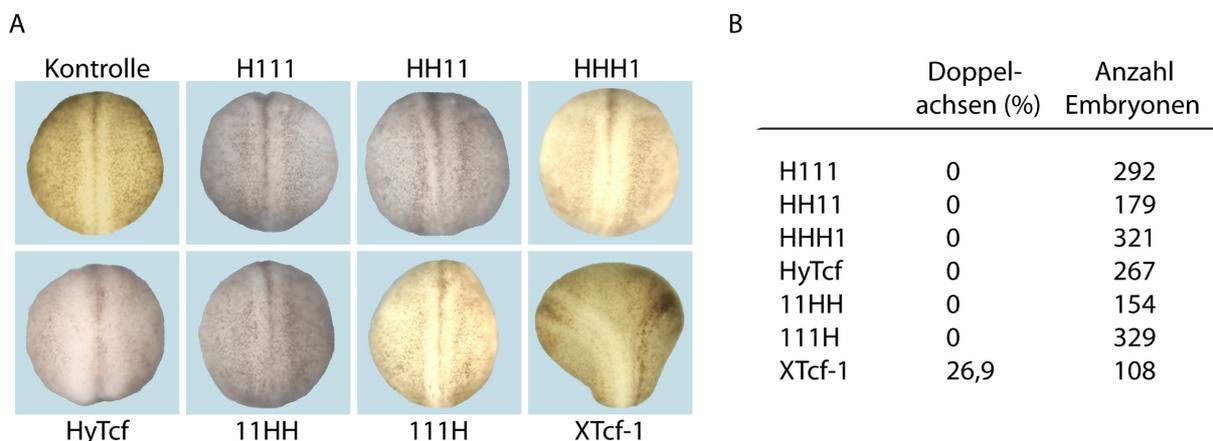
der  $\beta$ bd von HyTcf resultierte in der Chimäre H1111. Durch Anlagerung des C-Terminus an die HMG-Box entstanden die Chimären HHH1 und 111H. Die Zahlen kennzeichnen die Aminosäuren in der Sequenz des XTcf-1 beziehungsweise des HyTcf Proteins.

Die Konstrukte wurden im GST-Pulldown Experiment auf ihre  $\beta$ -Catenin Bindung hin untersucht. HyTcf, XTcf-1 sowie alle chimären Konstrukte waren in der Lage vertebraten  $\beta$ -Catenin zu binden. In diesem Experiment fungierte ein GFP-GST und ein DCOH-GST Konstrukt als Kontrolle (Abb. 5.21).



**Abbildung 5.21: Die chimären Konstrukte bestehend aus HyTcf und XTcf-1 binden an vertebrales  $\beta$ -Catenin.** Die RIPA-Lysate transfizierter HEK293 Zellen wurden mit immobilisiertem  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Catenin-GST), GFP (GFP-GST) und DCOH (DCOH-GST) inkubiert. Nach Elution wurden die Proteine in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Ein Antikörper gegen das fusionierte myc Epitop erkennt die transfizierten Konstrukte (Sterne).

Im Anschluss wurde die Aktivatorfunktion der chimären Konstrukte im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment getestet (Abb. 5.22). Hierbei wurden jeweils 500 pg mRNA ventral in Vierzell-Stadien von *Xenopus* Embryonen appliziert. Als Positivkontrolle diente XTcf-1, als Negativkontrolle wurde HyTcf verwendet (Abb. 5.22).



**Abbildung 5.22: Die chimären Konstrukte induzierten keine sekundäre Körperachse.** A: Es wurden jeweils 500 pg mRNA ventral in Vierzell-Stadien von *Xenopus* Embryonen injiziert. Diese wurden bis ins späte Neurulastadium (Stadium 17-19) kultiviert. Als Kontrolle dienten wildtypische uninjizierte Embryonen, die ebenfalls bis ins späte Neurulastadium kultiviert wurden. Keine der Chimären aus XTcf-1 und HyTcf induzierte eine sekundäre Körperachse. B: Statistische Auswertung der im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment getesteten chimären Konstrukte.

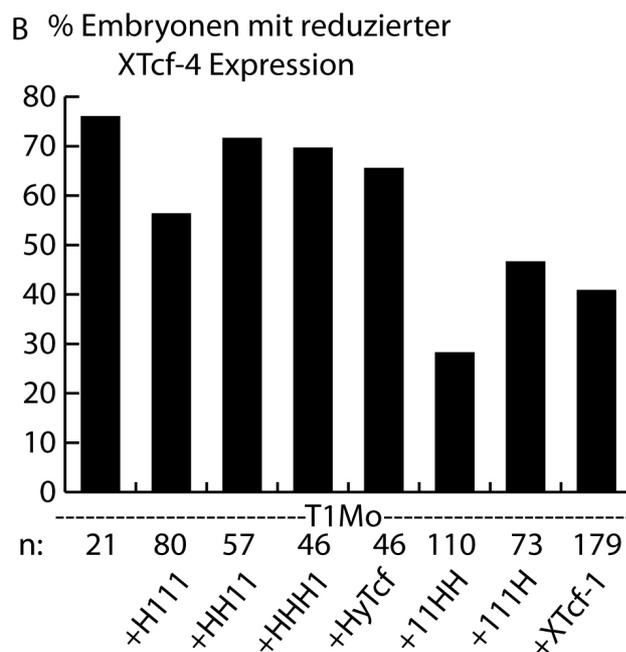
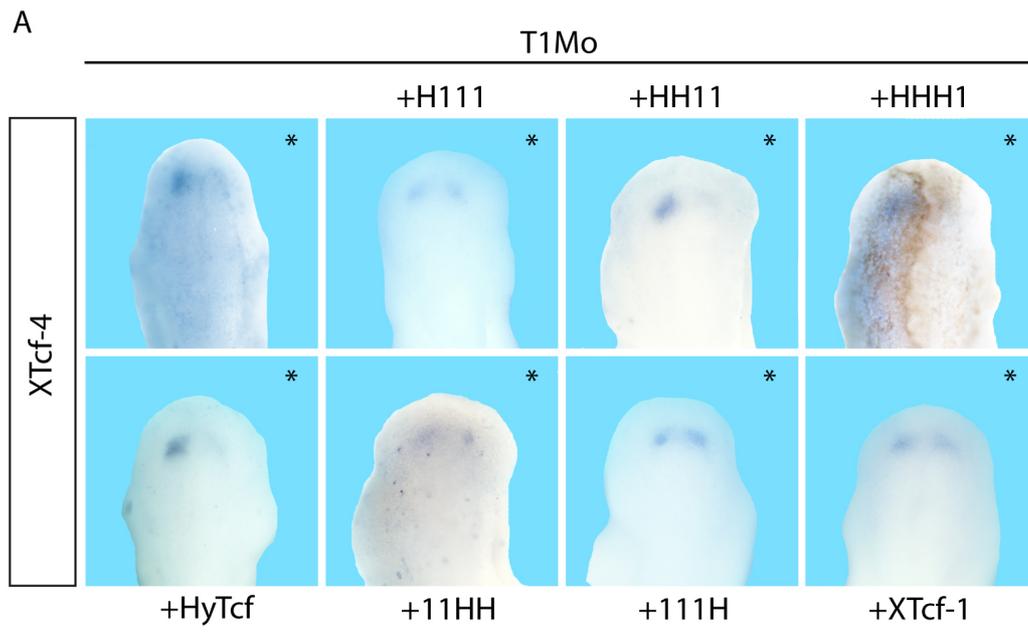
Die ventrale XTcf-1 Applikation induzierte hier nur bei 26.9 % der Embryonen eine sekundäre Körperachse. Die Injektion keiner der Chimären führte insgesamt bei weit über 1000 injizierten Embryonen je zu Achsenduplikationen. Somit scheint jeder der vier Bereiche in XTcf-1 für die Induktion sekundärer Körperachsen wichtig zu sein. Dies ist insofern überraschend, als zumindest die N-Termini austauschbar sein sollten, denn beide, HyTcf und XTcf-1 können vertebreten  $\beta$ -Catenin binden. Auch alle Chimären waren in der Lage  $\beta$ -Catenin im GST-Pulldown Experiment zu binden.

In Rekonstitutionsexperimenten wurde die XTcf-4 Expression in XTcf-1 depletierten Embryonen nach Koapplikation der Chimären überprüft (Abb. 5.23). Hierzu wurden jeweils 4 pMol spezifisches *antisense* Morpholino animal in Zweizell-Stadien von *Xenopus* Embryonen injiziert. Die XTcf-4 Expression war in 76 % der XTcf-1 depletierten Embryonen reduziert. Eine partielle Wiederherstellung der XTcf-4 Expression konnte durch Applikation von 500 pg cDNA der Chimären H111 mit 56 %, sowie von 11HH mit 28 % und 111H mit 47 % der Embryonen beobachtet werden. Ein ähnlicher Effekt auf die Wiederherstellung der Expression zeigte sich nach XTcf-1 Applikation. Hier trat noch bei 41 % der Embryonen eine Reduktion der XTcf-4 Expression auf. Kein Effekt hingegen konnte bei Applikation von HyTcf sowie bei HH11 und HHH1 beobachtet werden.

Alle Konstrukte, welche die CRD von XTcf-1 beinhalten waren somit in der Lage, die XTcf-4 Expression partiell wiederherzustellen. Dieser Domäne kommt demnach eine entscheidende Rolle in der XTcf-1 abhängigen XTcf-4 Regulation zu.

---

**Abbildung 5.23: Die CRD ist entscheidend für die XTcf-1 spezifische Funktion in Bezug auf die XTcf-4 Regulation.** A: Für die Wiederherstellungsexperimente wurden jeweils 4 pMol XTcf-1 Morpholino (T1Mo) sowie 500 pg cDNA in eine Blastomere animal im Zweizell-Stadium injiziert. Die XTcf-4 Expression der injizierten Seite wurde mittels *in situ* Hybridisierung im Stadium 26 mit der Expression der nicht-injizierten Seite verglichen. Der Stern markiert die injizierte Seite. B: Statistische Auswertung der in der *in situ* Hybridisierung gezeigten Embryonen. Gezeigt ist die jeweilige Reduktion der XTcf-4 Expression nach Applikation der verschiedenen Konstrukte. n= Anzahl der in der *in situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen.



So konnte aufgrund der Wiederherstellungsexperimente der Chimären bestehend aus XTcf-1 und XTcf-3 gezeigt werden, dass der C-Terminus beziehungsweise die CRD von XTcf-3 für dessen spezifische Funktion der XCirp Regulation ausreichend ist. Die Experimente mit den Chimären bestehend aus HyTcf und XTcf-1 ergaben, dass die CRD die entscheidende Domäne des XTcf-1 in Bezug auf die XTcf-4 Regulation ist (Tab. 5.1).

**Tabelle 5.1: Übersicht der Wiederherstellungsexperimente in *Xenopus laevis*.** Die Daten der Chimären sind dabei nicht separat aufgeführt, die neu gewonnenen Aussagen sind jedoch vermerkt.

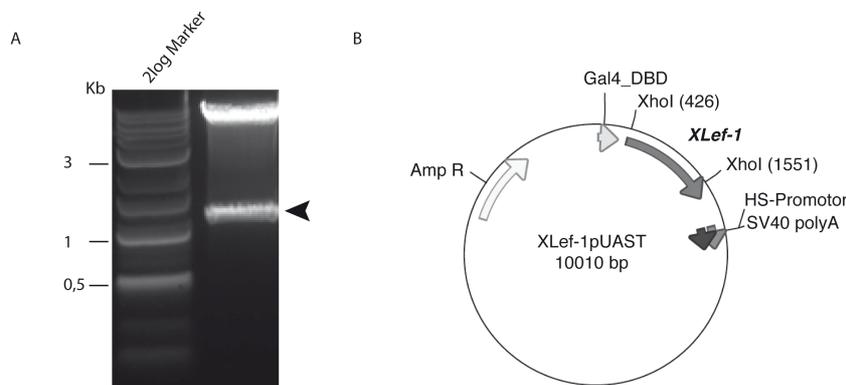
Konstrukt	Ersetzt XTcf-1	Ersetzt XTcf-4	Ersetzt XTcf-3
Pangolin	ja	ja	ja
Pop-1	nein	nein	ja
HyTcf	nein	ja	nein
XTcf-1	ja (CRD)	nein	nein
XTcf-3	nein	nein	ja (CRD/C-Terminus)
XTcf-4	ja	ja	nein*

\*Experiment in van Venrooy et al. (2008)

## 5.7 Herstellung der Werkzeuge zur funktionalen Analyse der XTcfs in *Drosophila*

Die Analyse der *Xenopus* Tcfs in *Drosophila melanogaster* setzte die Erzeugung transgener Tiere voraus. Diese transgenen Linien tragen das inserierte *Xenopus* Tcf stabil in ihrem Genom. Für eine erfolgreiche Integration der *Xenopus* Tcfs wurden diese in den Transformationsvektor pUAST kloniert, diese Konstrukte wurden dann mit einem Helferplasmid in *Drosophila* injiziert (Best Gene Inc., Chino Hills, USA).

XLef-1 wurde aus pCS2myc mit Hilfe der Restriktionsendonuklease XhoI ausgeschnitten und in den ebenfalls mit XhoI präparierten Transformationsvektor pUAST ligiert. Zur Überprüfung wurde eine Restriktionsanalyse mit XhoI durchgeführt. Die analytische Gelelektrophorese zeigt den Vektor mit einer Größe von circa 8.9 kb und das XLef-1 Fragment mit circa 1.1 kb (Abb. 5.24).

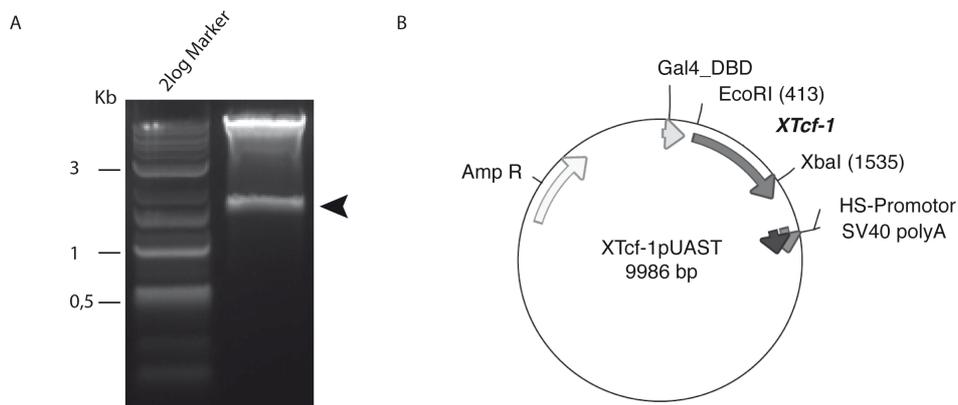


**Abbildung 5.24: Klonierung von XLef-1 in den Transformationsvektor pUAST.** A: Die schwarze Pfeilspitze markiert das mit der Restriktionsendonuklease XhoI ausgeschnittene XLef-1 Fragment in der erwarteten Größe von 1.1 kb. B: Die Vektorkarte zeigt die Orientierung von XLef-1 im Transformationsvektor pUAST.

Die Klonierung von XTcf-4 wurde entsprechend der Vorgehensweise von XLef-1 durchgeführt. Hier entsteht nach XhoI Verdau ebenfalls die Vektorbande mit circa 8.9 kb und das XTcf-4 Fragment mit einer Größe von circa 1.8 kb (nicht gezeigt). Zur Überprüfung der Orientierung des XLef-1 beziehungsweise des XTcf-4 Fragments wurde ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XbaI durchgeführt (nicht gezeigt).

XTcf-1 wurde aus pCS2myc über EcoRI und XbaI ausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Transformationsvektor pUAST ligiert. Zur Überprüfung diente ein Restriktionsverdau mit den beiden verwendeten Restriktionsendonukleasen. Die analytische Gelelektrophorese zeigte den Vektor mit einer Größe von circa 8.9 kb und das XTcf-1 Fragment mit einer Größe von circa 1.1 kb (Abb. 5.25). Die Klonierung von XTcf-3 erfolgte entsprechend. Die analytische Gelelektrophorese zeigt hier den Vektor mit einer Größe von circa 8.9 kb und das XTcf-3 Fragment mit einer Größe von circa 1.6 kb (nicht gezeigt).

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzanalyse verifiziert (GATC Biotech, Konstanz).



**Abbildung 5.25: Klonierung von XTcf-1 in den Transformationsvektor pUAST.** A: Die schwarze Pfeilspitze markiert das mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XbaI ausgeschnittene XTcf-1 Fragment in der erwarteten Größe von 1.1 kb. B: Die Vektorkarte zeigt die Orientierung von XTcf-1 im Transformationsvektor.

Die vier Konstrukte wurden in *Drosophila* Embryonen injiziert (Best Gene Inc., Chino Hills, USA). Die erhaltenen transgenen Linien sind in der Tabelle 3.2 (Kapitel 3.2.12; S. 34f.) gelistet. Für die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden ausschließlich die transgenen Linien verwendet, welche die Insertion der XTcfs auf dem dritten Chromosom tragen. Dies ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit der Resultate. Daher wird bei der Bezeichnung der Linien im Folgenden die letzte Ziffer, welche das Chromosom mit der Insertion anzeigt, nicht mehr aufgeführt. Mit einer spitzen Klammer (>) ist die jeweilige Überexpressionssituation gekennzeichnet. Für

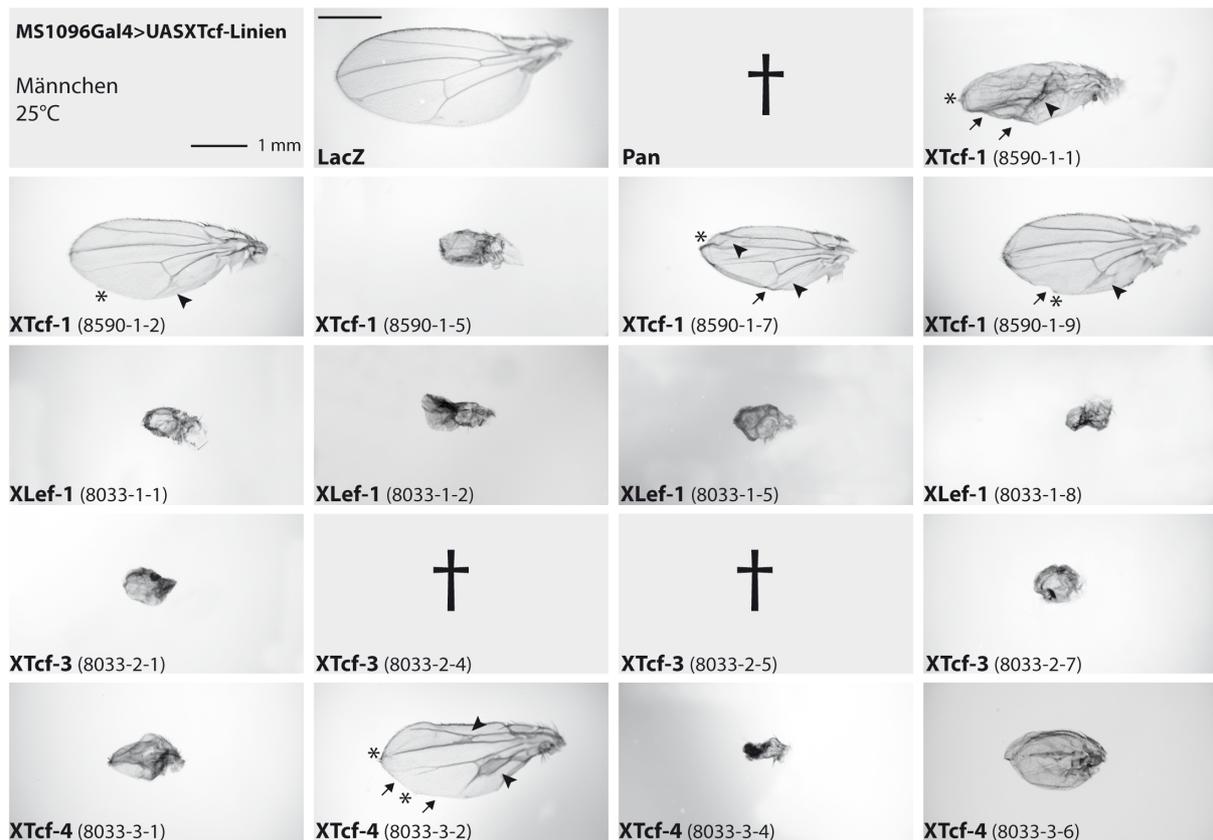
alle Ansätze wurden Jungfrauen der Gal4- Treiberlinien mit Männchen der verschiedenen UAS-Linien gekreuzt.

## 5.8 Analyse der *Xenopus* Tcfs in Überexpressionsexperimenten

Der erste Schritt in der funktionalen Analyse der *Xenopus* Tcfs in *Drosophila melanogaster* waren Überexpressionsstudien. Dabei wurde untersucht, ob und inwiefern die Überexpression der XTcfs einen mit Pangolin vergleichbaren Phänotyp hervorruft. Des Weiteren sollte untersucht werden, welche der transgenen XTcf-Linien für nachfolgende Kreuzungsexperimente am geeignetsten erscheinen. Bei der Wahl der Treiberlinie wurde als Anhaltspunkt der publizierte Pangolin Überexpressionsphänotyp mit der Treiberlinie MS1096-Gal4 genutzt (Lawrence et al., 2000). Unter Kontrolle der Treiberlinie MS1096-Gal4 werden die UAS-Linien im gesamten Flügel überexprimiert (Capdevila und Guerrero, 1994; Klein et al., 1997). Als Negativkontrolle wurde eine UAS-LacZ Linie verwendet, deren Überexpression keinen Phänotyp hervorruft. Als Positivkontrolle diente eine UAS-Pangolin Linie. Sowohl diese UAS-Pangolin Linie als auch die MS1096-Gal4 Treiberlinie sind jedoch nicht identisch mit den in Lawrence et al. (2002) publizierten Linien.

Männchen der Negativkontrolle MS1096>UAS-LacZ zeigten nach Überexpression bei einer Kultivierungstemperatur von 25°C wie erwartet keinen Phänotyp (Abb. 5.26; Tab. 5.2). Die Überexpression von Pangolin sowie die Überexpression von XTcf-3 in den Linien 8033-2-4 und 8033-2-5 waren letal (Kreuze).

Überexprimiertes XTcf-1 und XTcf-4 dagegen führte bei den Linien 8590-1-1, 8590-1-2, 8590-1-7, 8590-1-9 und 8033-3-2 zu einem vergleichsweise schwachen Phänotyp. Die Flügel wiesen Einkerbungen der Flügelkanten (Pfeile) sowie eine Reduktion der Flügelgröße auf. Außerdem konnte die Induktion ektopischen Venengewebes (Pfeilköpfe) und ektopischer Borsten (Sterne) beobachtet werden. Die Überexpression der Linie 8590-1-5 (XTcf-1) hingegen führte zu einer vollständigen Deformation des Flügels. Aufgrund dieser starken phänotypischen Ausprägung konnte hier keine genaue Analyse erfolgen. Ähnlich stark war der Phänotyp bei allen XLeF-1 überexprimierenden Linien, sowie bei den XTcf-3 Linien 8033-2-1 und 8033-2-7 und den drei XTcf-4 Linien 8033-3-1, 8033-3-4 und 8033-3-6 (Abb. 5.26; Tab. 5.2).

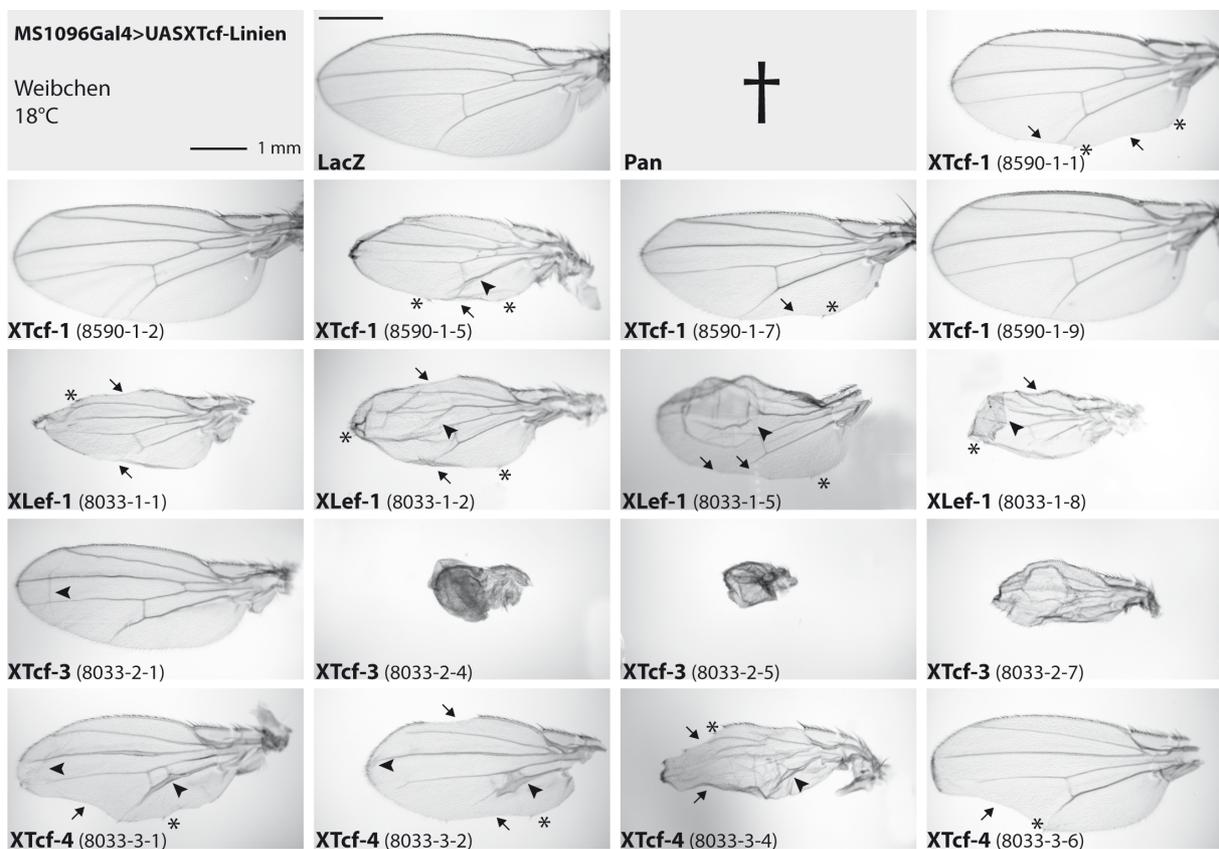


**Abbildung 5.26: Phänotypen der überexprimierten XTcfs mit der Flügeltreiberlinie MS1096-Gal4.** Gezeigt sind die Flügel von männlichen Tieren, die bei 25°C kultiviert wurden. Die Kreuze kennzeichnen die Linien, für welche diese Überexpression letal war. Die Überexpression der verschiedenen XLef/Tcfs führte zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen, wie Einkerbungen der Flügelkanten (Pfeile), ektopische Borsten (Sterne) und die Bildung ektopischen Venengewebes (Pfeilköpfe). Zusätzlich war die Überexpression der XLef/Tcfs mit einer Reduktion der Flügelgröße assoziiert.

Die Weibchen der entsprechenden Linien zeigten bei gleicher Kultivierungstemperatur ähnliche Phänotypen, doch war ihre Ausprägung insgesamt etwas schwächer (Tab. 5.2). So war beispielsweise die Überexpression von XTcf-3 bei den Linien 8033-2-4 und 8033-2-5 hier nicht letal. Insgesamt aber erlaubt die starke Ausprägung der Phänotypen bei einer Kultivierungstemperatur von 25°C keine vergleichende Analyse der *Xenopus* Lef/Tcfs in *Drosophila*.

Die oben beschriebenen Versuche wurden auch bei einer Kultivierungstemperatur von 18°C durchgeführt (Abb. 5.27; Tab. 5.2). Die Überexpression der Kontrolle LacZ induzierte auch hier keine phänotypischen Merkmale. Überexprimiertes Pangolin war wiederum letal (Kreuze). Die Flügel nach Überexpression von XTcf-1 der Linien 8590-1-1, 8590-1-5 und 8590-1-7 und der XLef-1 Linie 8033-1-1 zeigten Einkerbungen (Pfeile), ektopische Borsten (Sterne) und eine reduzierte Größe. Die Flügel der Nachkommen der XTcf-1 Linien 8590-1-2 und 8590-1-9 hingegen entsprachen dem Wildtyp. Die Überexpression von XLef-1 der Linien 8033-1-2,

8033-1-5 und 8033-1-8 wiesen Einkerbungen, ektopische Borsten, ektopisches Venengewebe (Pfeilköpfe), sowie eine reduzierte Größe auf. Überexprimiertes XTcf-3 resultierte hingegen in stark deformierten Flügeln, mit Ausnahme der Linie 8033-2-1, die nur zur Ausprägung ektopischen Venengewebes führte. Die XTcf-4 Überexpression der Linien 8033-3-1, 8033-3-2 und 8033-3-4 führte zu einer Reduktion der Flügelgröße, der Ausbildung ektopischen Gewebes und ektopischer Borsten sowie zu Einkerbungen der Flügelkante. Die XTcf-4 Linie 8033-3-6 erzeugte nur Einkerbungen und ektopische Borsten. Die Phänotypen der Männchen bei 18°C waren stärker, verglichen mit denen der Weibchen (Tab. 5.2). So war die XTcf-3 Überexpression der Linie 8033-2-4 letal.



**Abbildung 5.27: Phänotypen der überexprimierten XTcfs mit der spezifischen Flügeltreiberlinie MS1096-Gal4.** Gezeigt sind die Flügel von weiblichen Tieren, die bei 18°C kultiviert wurden. Auch hier führte die Pangolin Überexpression zu Letalität (Kreuz). Die Überexpression der verschiedenen XLef/Tcfs führte zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen, wie Einkerbungen der Flügelkanten (Pfeile), ektopische Borsten (Sterne) und die Bildung ektopischen Venengewebes (Pfeilköpfe). Zusätzlich war die Überexpression der XLef/Tcfs meist mit einer Reduktion der Flügelgröße assoziiert.

Bei der Zusammenfassung der Phänotypen erfolgte die Unterteilung in drei Kategorien (Tab. 5.2). Zur Gruppe *nicht auswertbar* wurden alle letalen Phänotypen sowie Tiere mit vollständig deformierten Flügel gezählt. In die Kategorie *teilweise*

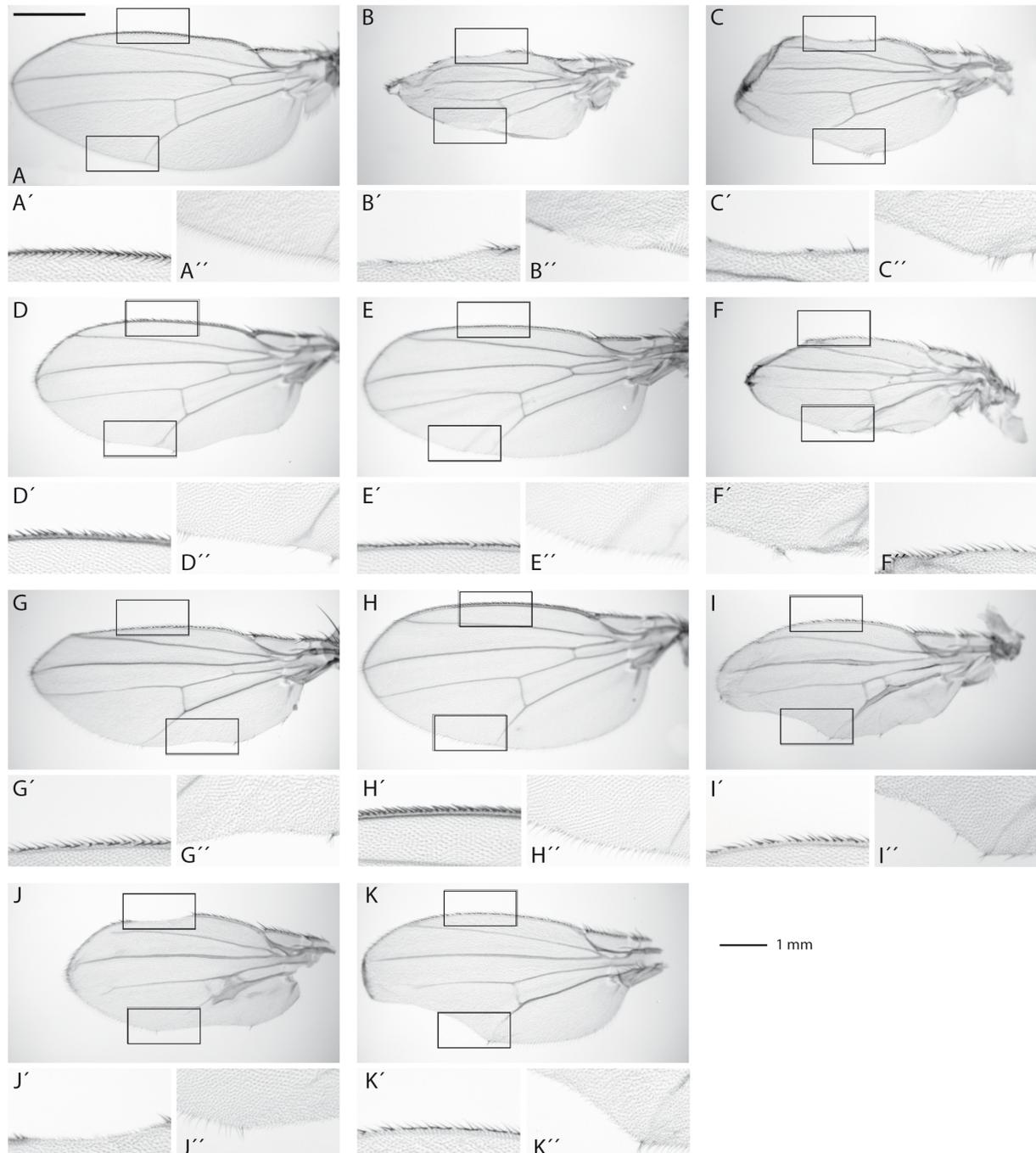
*auswertbar* wurden Flügel mit starker phänotypischer Ausprägung eingeteilt, die aber noch erkennbare Merkmale tragen. In die Gruppe *auswertbar* sind alle Flügel die schwächere phänotypische Merkmale tragen und damit eine genauere Analyse erlauben.

**Tabelle 5.2: Übersicht der phänotypischen Ausprägungen nach Überexpression der XTcfs mit MS1096-Gal4.** Männliche Tiere sind mit ♂, weibliche mit ♀ abgekürzt. Aufgrund der unterschiedlich starken phänotypischen Ausprägungen nach Überexpression wurde eine Unterteilung in *auswertbar*, *teilweise auswertbar* und *nicht auswertbar* durchgeführt.

Konstrukt	Linie	Geschlecht	Temperatur	Auswertung
LacZ		♂ ♀	25°C/18°C	auswertbar
Pan		♂ ♀	25°C/18°C	nicht auswertbar (letal)
XTcf-1	8590-1-1	♂	25°C/18°C	teilweise auswertbar
		♀	25°C/18°C	auswertbar
	8590-1-2	♂ ♀	25°C/18°C	auswertbar
	8590-1-5	♂	25°C	nicht auswertbar
		♀	25°C	teilweise auswertbar
		♂ ♀	18°C	auswertbar
8590-1-7	♂ ♀	25°C/18°C	auswertbar	
8590-1-9	♂ ♀	25°C/18°C	auswertbar	
XLef-1	8033-1-1	♂ ♀	25°C/18°C	nicht auswertbar
		♀	18°C	teilweise auswertbar
	8033-1-2	♂	25°C/18°C	nicht auswertbar
		♀	25°C/18°C	teilweise auswertbar
	8033-1-5	♂ ♀	25°C/18°C	nicht auswertbar
	♀	18°C	teilweise auswertbar	
8033-1-8	♂	25°C/18°C	nicht auswertbar	
	♀	25°C/18°C	teilweise auswertbar	
XTcf-3	8033-2-1	♂ ♀	25°C/18°C	nicht auswertbar
		♀	18°C	teilweise auswertbar
	8033-2-4	♂ ♀	25°C/18°C	nicht auswertbar ♂ (letal)
	8033-2-5	♂ ♀	25°C/18°C	nicht auswertbar ♂ (25°C letal)
	8033-2-7	♂ ♀	25°C/18°C	nicht auswertbar
♀		18°C	teilweise auswertbar	
XTcf-4	8033-3-1	♂	25°C	nicht auswertbar
		♂ ♀	25°C/18°C	teilweise auswertbar
		♀	18°C	auswertbar
	8033-3-2	♂ ♀	25°C/18°C	teilweise auswertbar
		♀	25°C	auswertbar
	8033-3-4	♂	25°C	nicht auswertbar
		♂ ♀	25°C/18°C	teilweise auswertbar
	8033-3-6	♂ ♀	25°C/18°C	teilweise auswertbar
♀		18°C	auswertbar	

Insgesamt sind also Weibchen bei einer Kultivierungstemperatur von 18°C am geeignetsten für die vergleichende Analyse.

Die Borstenmuster der Flügelkanten dieser Tiere wurden nun eingehender analysiert (Abb. 5.28; Tab. 5.3).



**Abbildung 5.28: Ausschnitte von Flügelkanten nach Überexpression der verschiedenen XTcf Linien mit MS1096-Gal4.** Gezeigt ist die Überexpression der Negativkontrolle LacZ (A-A''). Außerdem die überexprimierten XLeF-1 Linien 8033-1-1 (B-B''), 8033-1-2 (C-C''), sowie die XTcf-1 Linien 8590-1-1 (D-D''), 8590-1-2 (E-E''), 8590-1-5 (F-F''), 8590-1-7 (G-G''), 8590-1-9 (H-H'') und außerdem die XTcf-4 Linien 8033-3-1 (I-I''), 8033-3-2 (J-J''), 8033-3-6 (K-K''). A-K zeigen Übersichtsaufnahmen der gesamten Flügel. In A'-K' ist jeweils ein anteriorer

Ausschnitt, in A''-K'' ein posteriorer Ausschnitt des Flügels gezeigt. Die Kästchen in A-K markieren den vergrößerten Teilbereich.

Es wurden nur die Flügel von Linien mit moderaten und schwachen Phänotypen verwendet. Die LacZ Negativkontrolle zeigte an der anterioren und der posterioren Flügelkante das wildtypische Borstenmuster (Abb. 5.28 A'A''). Sowohl an der anterioren als auch an der posterioren Flügelkante zeigten die überexprimierten Lef-1 Linien 8033-1-1, 8033-1-2 sowie die XTcf-4 Linie 8033-3-2 ektopische Borsten und Lücken im Borstenmuster (Abb. 5.28 B'B'', C'C'', J'J''). Die XTcf-1 Überexpression der Linien 8590-1-2 und 8590-1-9 resultierte in einem wildtypischen Borstenmuster (Abb. 5.28 E'E'', H'H''). Dagegen zeigte überexprimiertes XTcf-1 der Linie 8590-1-5 Effekte an der anterioren Flügelkante. Dies zeigte sich auch hier in der Ausprägung ektopischer aber auch im Fehlen von Borsten (Abb. 5.28 F'F''). Die XTcf-1 Linien 8590-1-1, 8590-1-7 sowie die XTcf-4 Linien 8033-3-1 und 8033-3-6 dagegen zeigten Lücken im Muster und ektopische Borsten im Bereich der posterioren Flügelkante (Abb. 5.28 D'D'', G'G'', I'I'', K'K''). Nach Analyse der Borstenphänotypen lässt sich zusammenfassend sagen, dass diese sich zwar in unterschiedlicher Stärke ausprägen, sich jedoch qualitativ nicht unterscheiden (Tab. 5.3).

**Tabelle 5.3: Übersicht der Borstenphänotypen nach XTcf Überexpression mit MS1096-Gal4.** Dabei traten Phänotypen auf, die sowohl anterior als auch posterior veränderte Borsten aufwiesen (ja), bei anderen traten sie nur anterior oder ausschließlich posterior auf (teilweise) oder es ergab sich das wildtypische Borstenmuster (nein).

Konstrukt	Linie	Borstenphänotyp
XLef-1	8033-1-1	ja
	8033-1-2	ja
XTcf-1	8590-1-1	teilweise
	8590-1-2	nein
	8590-1-5	teilweise
	8590-1-7	teilweise
	8590-1-9	nein
XTcf-4	8033-3-1	teilweise
	8033-3-2	ja
	8033-3-6	teilweise

Die Experimente der überexprimierten *Xenopus* Lef/Tcfs zeigten prinzipiell, dass die Phänotypen dem publizierten Pangolin Überexpressionphänotyp (Lawrence et al., 2000) entsprechen. Diese traten auch innerhalb der verschiedenen Linien eines XTcfs in unterschiedlich starken Ausprägungen auf.

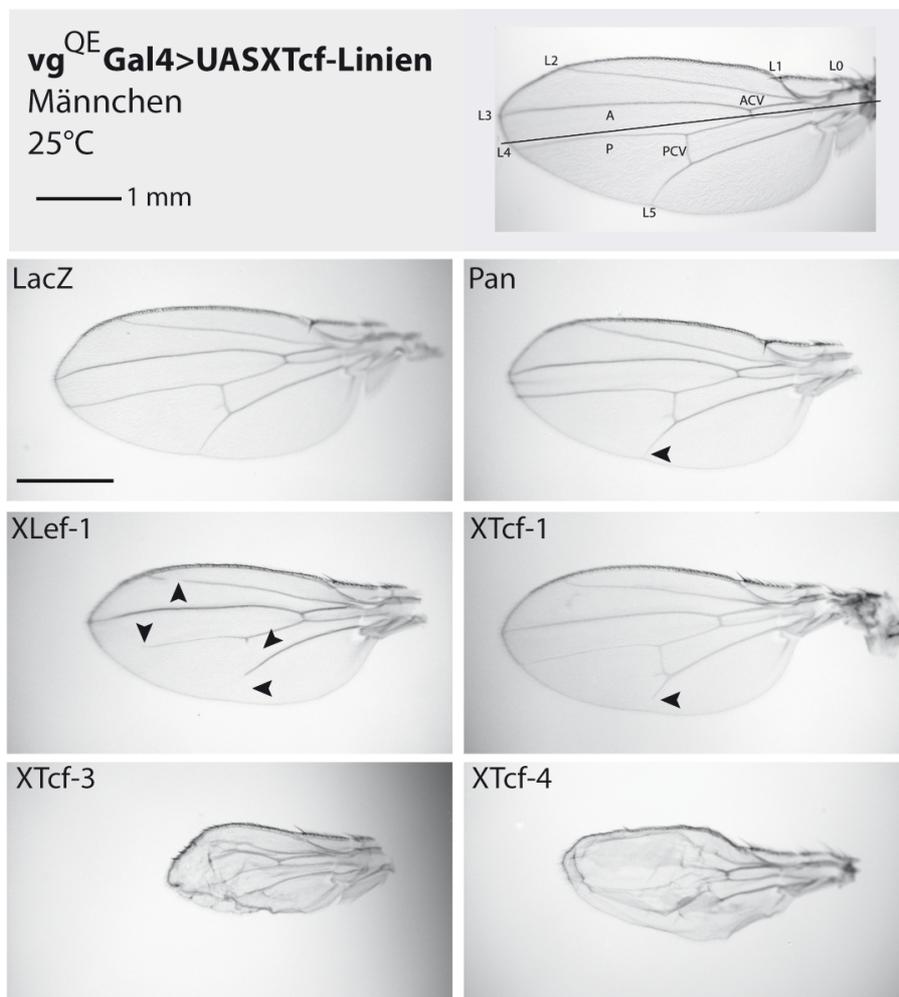
Für alle weiteren Experimente wurde jeweils nur eine transgene Linie für ein XTcf verwendet. Die Auswahl erfolgte anhand der Phänotypen der Weibchen bei 18°C Kultivierungstemperatur. Dabei wurde, aufgrund der vergleichsweise schwachen XTcf-1 Phänotypen, die Linie mit der stärksten Ausprägung gewählt (8590-1-5). Für die anderen XTcfs wurde jeweils eine Linie mit phänotypischen Ausprägungen ausgesucht, welche ungefähr der Stärke der XTcf-1 Linie entsprechen. Für XLef-1 wurde die Linie 8033-1-2, für XTcf-3 die Linie 8033-2-7 und für XTcf-4 die Linie 8033-3-1 gewählt. Im Folgenden werden daher nicht mehr die Bezeichnungen der Linien angegeben, sondern das entsprechende XTcf.

## 5.9 Überprüfung der Venenphänotypen in Überexpressionsstudien

Die spezifische Überexpression der XTcfs im Flügel unter Verwendung der MS1096-Gal4 Linie führte meist zur Ausprägung eines starken Phänotyps, daher konnte keine genaue Analyse der Venenphänotypen durchgeführt werden. Um das Venenmuster nach Überexpression der *Xenopus* Tcfs analysieren zu können, wurde eine schwache flügel-spezifische Gal4-Linie verwendet, *vestigial*<sup>QuadrantEnhancer</sup>-Gal4 (*vg*<sup>QE</sup>-Gal4). Diese Linie führt zur Überexpression der UAS-Linien im gesamten Flügel. Auch hier wurde nach Männchen (Abb. 5.29) und Weibchen (Abb. 5.30) sowie nach Kultivierungstemperatur unterschieden. Die Phänotypen der Männchen entsprachen denen der Weibchen, wobei auch hier bei Männchen teilweise ein minimal stärkerer Phänotyp entstand.

Es wurde wiederum eine UAS-LacZ Linie als Negativkontrolle verwendet, deren Überexpression auch in diesen Experimenten keinen Phänotyp erzeugte. Die Männchen zeigten bei einer Kultivierungstemperatur von 25°C nach Pangolin Überexpression mit *vg*<sup>QE</sup>-Gal4 eine Unterbrechung der L5 (Longitudinalvene) (schwarze Pfeilköpfe; Abb. 5.29). Die XLef-1 Überexpression induzierte Verkürzungen der Longitudinalvenen 2, 4 und 5 sowie eine Unterbrechung der posterioren Quervene (PCV, posterior cross vein). Eine Verkürzung der L5 war die Folge der XTcf-1 Überexpression. Aufgrund der starken Deformation und den durch

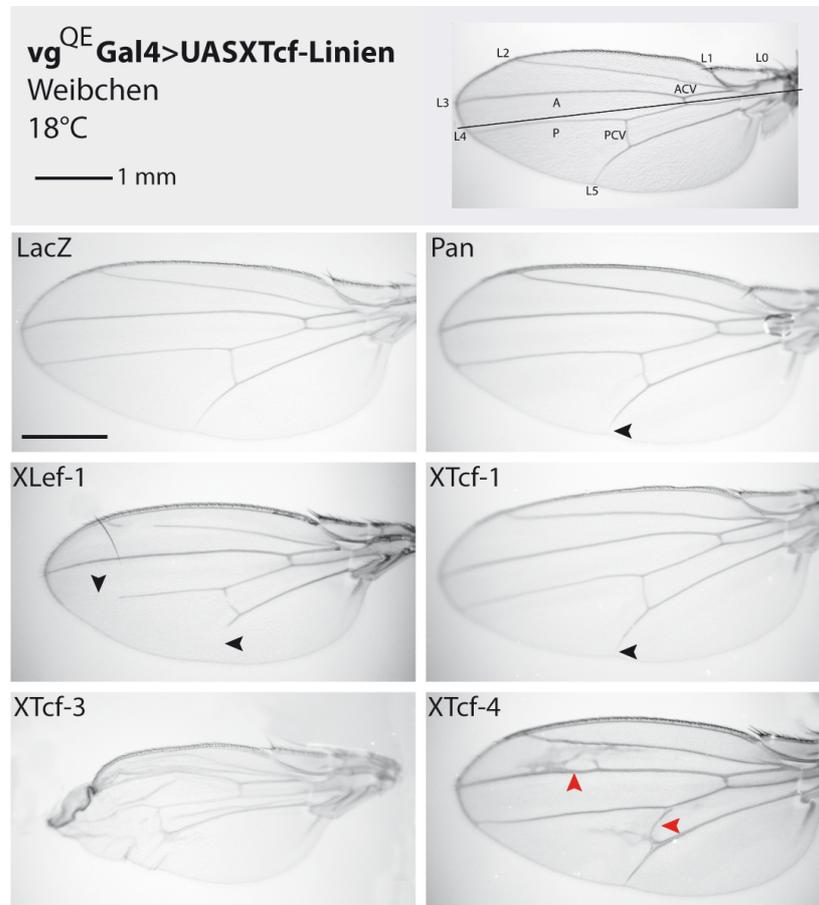
ektopisches Gewebe bedingten Auswölbungen des Flügels kann sowohl für überexprimiertes XTcf-3 als auch für XTcf-4 keine Aussage über Venenphänotypen bei einer Kultivierungstemperatur von 25°C getroffen werden (Abb. 5.29). Die Phänotypen der Weibchen entsprachen hier denen der Männchen (nicht gezeigt).



**Abbildung 5.29: Pangolin, XLef-1 und XTcf-1 erzeugten nach Überexpression mit der Flügeltreiberlinie  $vg^{QE}$ -Gal4 Verkürzungen und Unterbrechungen der Venen.** Oben rechts ist ein Kontrollflügel gezeigt. Eingezeichnet sind die Longitudinalvenen L1-L5, die anteriore-posteriore (a/p) Grenze sowie die anteriore Quervene (ACV, anterior cross vein) und die posteriore Quervene (PCV, posterior cross vein). Die schwarzen Pfeilköpfe zeigen Unterbrechungen oder Verkürzungen der Venen. Gezeigt sind die Flügel von Männchen bei einer Kultivierungstemperatur von 25°C.

Die überexprimierte LacZ Negativkontrolle führte wiederum zu wildtypischen Flügeln. Weibchen bei 18°C Kultivierungstemperatur induzierten nach Pangolin Überexpression eine verkürzte L5 (schwarze Pfeilköpfe; Abb. 5.30). Überexprimiertes XLef-1 erzeugte auch hier Verkürzungen der Venen. In diesem Experiment zeigten allerdings nur die L4 und die L5 diesen Phänotyp. Überexprimiertes XTcf-1 verursachte eine verkürzte L5. XTcf-3 ist auch in diesem Versuchsansatz nicht auswertbar. Die XTcf-4 Überexpression erzeugte ektopisches Venengewebe im

Bereich der PCV sowie zwischen der L2 und L3 (rote Pfeilköpfe). Auch hier wiesen die Männchen einen nahezu identischen, leicht stärkeren Phänotyp auf (nicht gezeigt).



**Abbildung 5.30: Pangolin, XLef-1 und XTcf-1 erzeugen nach Überexpression mit der Flügeltreiberlinie  $vg^{QE}$ -Gal4 verkürzte bzw. unterbrochene Venen. XTcf-4 führt zur Ausprägung von ektopischem Venengewebe.** Oben rechts ist ein Kontrollflügel gezeigt. Eingezeichnet sind die Longitudinalvenen L1-L5, die anteriore-posteriore (a/p) Grenze sowie die anteriore Quervene (ACV, anterior cross vein) und die posteriore Quervene (PCV, posterior cross vein). Die schwarzen Pfeilköpfe zeigen Unterbrechungen oder Verkürzungen der Venen. Für überexprimiertes XTcf-4 sind die Ausprägungen von ektopischem Venengewebe markiert (rote Pfeilköpfe). Gezeigt sind die Flügel von Weibchen bei einer Kultivierungstemperatur von 18°C.

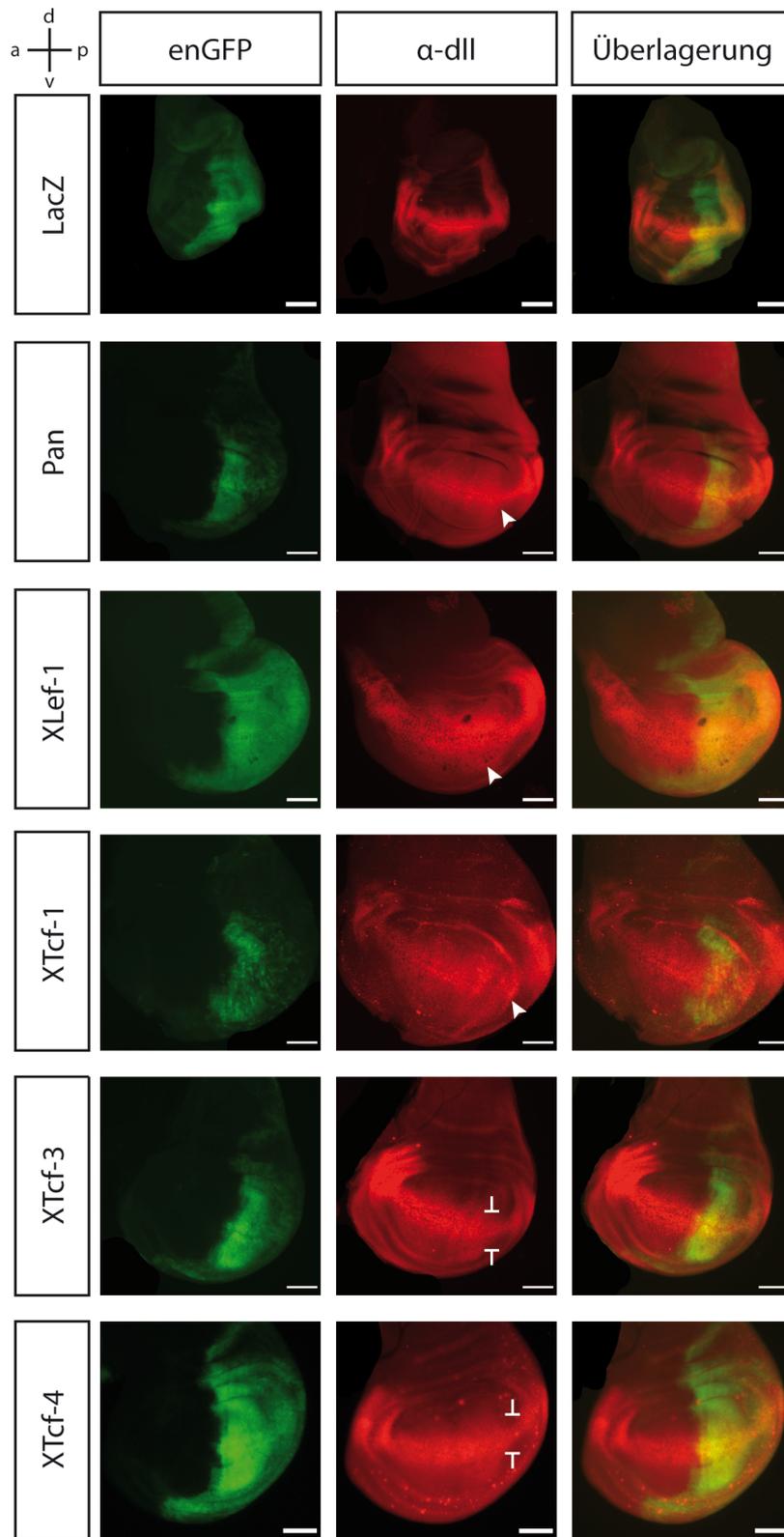
Dieses Überexpressionsexperiment zeigt deutliche Unterschiede der distinkten *Xenopus* Lef/Tcfs. So verhielten sich XLef-1 und XTcf-1 wie überexprimiertes Pangolin und erzeugten unterbrochene beziehungsweise verkürzte Venen. XTcf-4 zeigte nach Überexpression einen gegenteiligen Phänotyp, die Flügel bildeten ektopisches Venengewebe aus (Tab. 5.4). Somit wurde auch im invertebraten System *Drosophila melanogaster* die Diversität der XTcfs deutlich.

**Tabelle 5.4: Übersicht der Venenphänotypen nach Tcf Überexpression mit  $vg^{OE}$ -Gal4.** Es sind nur die Phänotypen weiblicher Tiere bei einer Kultivierungstemperatur von 18°C berücksichtigt.

Konstrukt	Venenphänotyp
Pan	verkürzte bzw. unterbrochene Venen
XLef-1	verkürzte bzw. unterbrochene Venen
XTcf-1	verkürzte bzw. unterbrochene Venen
XTcf-3	nicht auswertbar
XTcf-4	ektopisches Venengewebe

### 5.10 Einfluss der *Xenopus* Tcfs auf das Wingless Zielgen *distalless*

Pangolin weist eine Bifunktionalität auf, so ist sowohl eine Repressor- als auch eine Aktivatorfunktion beschrieben (Cavallo et al., 1998; Schweizer et al., 2003). Der Nachweis der Aktivatorfunktion wurde anhand von Immunfärbungen an Flügelimaginalscheiben erbracht. So konnte eine Expressionsreduktion der Wingless-Zielgene *vestigial* und *distalless* im *pangolin* mutanten Hintergrund nachgewiesen werden (Schweizer et al., 2003). Im nachfolgend beschriebenen Experiment werden die in Schweizer et al. (2003) publizierten Ergebnisse als Basis genutzt. Dabei wurde allerdings kein *pangolin* mutanter Hintergrund verwendet, sondern die Effekte auf das Zielgen *distalless* nach Überexpression untersucht. Um zu überprüfen, ob die Überexpression der *Xenopus* Tcfs eine Wirkung auf das Wingless-Zielgen *distalless* hat, wurden die XTcfs im Muster von Engrailed (En) überexprimiert. Die Verwendung dieser Treiberlinie führt zu einer gezielten Überexpression im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe. Zusätzlich ist diese Linie mit GFP fusioniert, dies ermöglicht die Visualisierung der Überexpressionsdomäne. Der Nachweis des Zielgens *distalless* wurde mit Hilfe einer Immunfärbung durchgeführt. Die Expressionsdomäne von Distalless erstreckt sich entlang der dorsoventralen Grenze in Form eines Streifens. Das Experiment ermöglicht den direkten Vergleich der wildtypischen Distalless Expression im anterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe mit der Expression im Tcf überexprimierten Hintergrund im posterioren Teil (Abb. 5.31).



**Abbildung 5.31: Die Überexpression von Pangolin, XLeF-1 und XTcf-1 führte zu einer stärkeren Distalless Expression, XTcf-3 und XTcf-4 dagegen zu einer Abschwächung.** Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m. Die linke Spalte zeigt die überexprimierten Tcfs beziehungsweise LacZ im Muster von enGFP (grün). In der mittleren Spalte ist die Distalless Expression (rot) dargestellt. Rechts ist die Überlagerung der Aufnahmen abgebildet. Die Pfeile markieren ein verstärktes Signal, die Inhibierungspfeile eine Abschwächung. Gezeigt sind Flügelimaginalscheiben des dritten Larvenstadiums. Als primärer Antikörper wurde  $\alpha$ -dll als sekundärer Esel- $\alpha$ -Ziege, konjugiert Cy3 verwendet. Die Kreuzungen wurden bei 25°C kultiviert. Nach circa sieben Tagen wurden die dritten Larven abgesammelt und die Flügelimaginalscheiben präpariert.

Als Negativkontrolle wurde erneut eine UAS-LacZ Linie verwendet, die keinen Einfluss auf die Zielgenexpression aufwies. Außerdem wurde Pangolin überexprimiert und diente als Positivkontrolle. Die Überexpression von Pangolin führte zu einer leichten Verstärkung der Distalless Expression (Pfeile; Abb. 5.31). Eine starke Aktivierung konnte nach XLef-1 und XTcf-1 Überexpression beobachtet werden. Dagegen resultierte überexprimiertes XTcf-3 in einer starken und überexprimiertes XTcf-4 in einer schwachen Reprimierung der Distalless Expression (Inhibierungspfeile).

So zeigte sich auch in diesem Experiment ein Unterschied der distinkten *Xenopus* Lef/Tcfs. Während XLef-1 und XTcf-1 aktivierend auf die Distalless Expression wirken, dies entspricht der Aktivatorfunktion von Pangolin in diesem Kontext, reprimierten XTcf-3 und XTcf-4 die Expression.

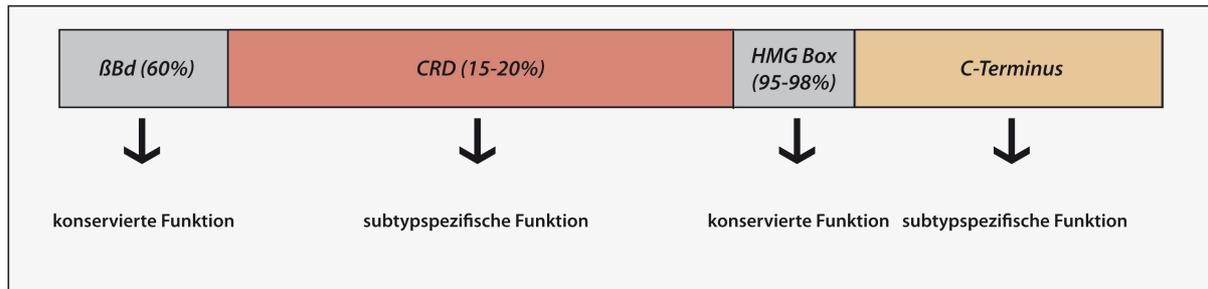
## 6. Diskussion

Die unterschiedlichen Spezies verfolgen verschiedenste Strategien um die Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren mit ihrer funktionalen Diversität auszustatten. In *Drosophila* wird die funktionale Vielfalt von Pangolin über die Bindung alternativer DNA-Sequenzen erreicht (Blauwkamp et al., 2008). *C.elegans* dagegen vermittelt diese Diversität über die Verwendung unterschiedlicher  $\beta$ -Catenin Homologe. Dies kann sowohl zu Reprimierung, als auch zu Aktivierung führen (Phillips und Kimble, 2009). Vertebraten folgen einem anderen Prinzip. Sie weisen vier Vertreter der Lef/Tcf Familie auf, denen distinkte Funktionen übertragen wurden. Unklar ist jedoch, ob diese durch Neofunktionalisierung oder Subfunktionalisierung entstanden sind. Das Prinzip der Neofunktionalisierung geht davon aus, dass manche Mitglieder mit neu erworbenen Funktionen ausgestattet sind. Unter Subfunktionalisierung versteht man, dass existierende Eigenschaften des Vorläufer Tcfs auf mehrere vertebraten Tcf Subfamilien aufgeteilt wurden.

Die Anlagerung der Lef/Tcf Aminosäuresequenzen im Stammbaum zeigte, dass die invertebraten Tcfs keinem der vertebraten Tcfs näher zugeordnet werden können (Abb. 1.2; Lin et al., 2006). Die *Cnidaria* und *Ecdysozoa* Tcfs stellen einen Cluster der ursprünglichen Tcfs dar. Die vertebraten Lef/Tcfs bilden vier Cluster, die sich in zwei Schwestergruppen unterteilen. Innerhalb einer Schwestergruppe befinden sich Tcf-1 und Lef-1, die andere Schwestergruppe umfasst Tcf-3 und Tcf-4. Dieser Stammbaum gibt jedoch keinen Aufschluss über mögliche Neofunktionalisierung und/oder Subfunktionalisierung.

Betrachtet man die verschiedenen Proteindomänen der Lef/Tcfs, lässt sich vermuten, dass vor allem die CRD und der C-Terminus für die subspezifischen Eigenschaften relevant sind (Abb. 6.1). Zum einen, aufgrund der schwachen Konservierung dieser Bereiche zum anderen, weil für diese Bereiche schon mehrfach gezeigt werden konnte, dass sie als Plattformen für verschiedenste Kofaktoren fungieren und durch alternatives Spleißen Isoformen entstehen, die ihrerseits weitere spezifische Funktionen übernehmen (Pukrop et al., 2001; Gradl et al., 2002; Liu et al., 2005; Ghogomu et al., 2006; Wöhrle et al., 2007; Weise et al., 2010). Die konservierten Bereiche der  $\beta$ -Catenin Bindedomäne ( $\beta$ Bd) und der DNA-bindende Bereich der HMG-Box (HMG) sind mit 60 % beziehungsweise fast 100 % Sequenzhomologie der

Tcf-Orthologe (Arce et al., 2006) dagegen vermutlich eher irrelevant für die subtypspezifischen Eigenschaften.



**Abbildung 6.1: Schematische Darstellung eines Lef/Tcf Transkriptionsfaktors.** Gezeigt sind die verschiedenen Domänen des Proteins sowie die Sequenzhomologie der jeweiligen Domäne der Tcf Orthologe (Arce et al., 2006). Bedingt durch die zahlreichen Spleißvarianten des C-Terminus (ocker) kann hier keine Sequenzhomologie angegeben werden. Aufgrund dieser starken Abweichungen des Konservierungsgrades, kann man mutmaßen, dass die CRD (rostrot) und der C-Terminus für die subtypspezifischen und die  $\beta$ -Catenin Bindedomäne ( $\beta$ Bd) (grau) sowie die HMG-Box (grau) für die konservierten Funktionen verantwortlich sind. Eine Anlagerung der Aminosäuresequenz einiger Lef/Tcfs findet sich im Anhang (Abb. 8.1).

Jedoch erleichtert diese starke Konservierung der  $\beta$ -Catenin Bindestelle sowie des DNA-bindenden Bereichs der HMG-Box die funktionale Analyse dieser Transkriptionsfaktoren erheblich. So kann aufgrund dieser hohen Homologie auch über Speziesgrenzen hinweg davon ausgegangen werden, dass diese Bereiche allen Lef/Tcfs, jedweder Herkunft, die Bindung an die DNA beziehungsweise an  $\beta$ -Catenin ermöglichen. Somit wird die funktionale Analyse derselben Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichen Modellorganismen möglich.

In vorliegender Arbeit wurden die invertebraten Tcfs aus *Hydra magnipapillata*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* und Chimären, bestehend aus XTcf-1 und XTcf-3 sowie aus XTcf-1 und HyTcf, auf ihre Aktivator- und Repressorfunktion untersucht, sowie in Rekonstitutionsexperimenten überprüft. Dies sollte mehr Aufschluss über die Evolution, die subtypspezifischen Funktionen sowie Zusammenhänge von Domänen und nicht-redundanten Funktionen geben.

## 6.1 Einfluss der invertebraten Tcfs auf die endogene Körperachse: Aktivatoren oder Repressoren?

Im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment wurde gezeigt, dass der Aktivator XTcf-1 nach ventraler Überexpression zur Ausprägung einer Doppelachse führt, im Gegensatz hierzu ruft die ventrale Überexpression des Repressors XTcf-3 keine Doppelachse hervor (Hamdi, Diplomarbeit, 2009; Gradl et al., 2002). Die ventral überexprimierten invertebraten Tcfs in vorliegender Arbeit induzierten ebenfalls keine

sekundären Körperachsen. Daher agieren sie im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment wie der Repressor XTcf-3. Auch nach Koinjektion mit dem Aktivator XTcf-1 reprimierten alle invertebraten Tcfs, ähnlich wie XTcf-3, die durch XTcf-1 induzierten Doppelachsen. Ein entsprechendes reprimierendes Verhalten von XTcf-3 wurde auch bei Koapplikation mit mLef-1 beschrieben (Gradl et al., 2002). Diese reprimierende Funktion des XTcf-3 wird auf die Bindung der Korepressoren Groucho und CtBP zurückgeführt (Brannon et al., 1999; Roose et al., 1998). Wobei gezeigt wurde, dass bereits die Bindung eines dieser Korepressoren ausreicht (Gradl et al., 2002). Unter den untersuchten invertebraten Tcfs enthält ausschließlich Pangolin Bindestellen für CtBP. Daher ist ein Einfluss dieses Korepressors im Rahmen der Repressorfunktion der invertebraten Tcfs zumindest für Pop-1 und HyTcf eher unwahrscheinlich. Für den Korepressor Groucho ergibt sich dagegen ein anderes Bild. So ist für das *C.elegans* Tcf Pop-1 gezeigt, dass es im Repressorkomplex mit Hda-1 (Histondeacetylase-1) und dem Groucho Homolog Unc-37 (Uncoordinated-37) Zielgene reprimiert (Pflugrad et al., 1997). Auch Pangolin kann im Komplex mit Groucho Zielgene reprimieren (Cavallo et al., 1998). Die Reprimierung über den Korepressor Groucho ist in Metazoen sehr stark konserviert, von *Ciona intestinalis* (Schlauchseescheide) bis hin zu Vertebraten (Jennings und Ish-Horowicz, 2008). Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch in *Hydra magnipapillata* ein entsprechender Mechanismus zur Zielgenreprimierung besteht. Nicht nur die Reprimierung mittels Groucho, sondern auch das Groucho Protein selbst, ist hoch konserviert (Bajoghli, 2007). Dies gilt insbesondere für den WD Wiederholungen enthaltenden C-Terminus. Dieser Bereich ist entscheidend für Protein-Protein-Interaktionen (Arce et al., 2009). Die in die ventralen Blastomere injizierten invertebraten Tcfs rekrutieren daher höchstwahrscheinlich ventrales Groucho und reprimieren die Induktion sekundärer Körperachsen, indem sie als Repressorkomplex auf den Bindestellen der Zielgenpromotoren mit dem überexprimierten Aktivator XTcf-1 um die DNA-Bindung kompetitieren. Dies setzt voraus, dass die invertebraten Tcfs tatsächlich DNA-Bindestellen von vertebraten Promotoren erkennen. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie in der DNA-Bindedomäne (95-98 %) kann davon ausgegangen werden, dass auch das Bindemotiv auf der DNA konserviert ist. Tatsächlich ist die Konsensussequenz für murines Tcf-1 (van de Wetering et al., 1991) und Pangolin (Chang et al., 2008) identisch.

Die invertebraten Tcfs wirken nicht nur ventral überexprimiertem XTcf-1, sondern auch dorsal überexprimiertem XTcf-3 entgegen. Es erscheint aber fraglich, dass die in *Xenopus* überexprimierten invertebraten Tcfs auf dieselben Regulationsmechanismen zurückgreifen können wie in ihren Ausgangsorganismen. Zwar wäre vorstellbar, dass Pangolin wie in *Drosophila* auch in *Xenopus* über die Bindung an alternative DNA-Sequenzen (Blauwkamp et al., 2008) als Aktivator und Repressor wirken kann, doch dass Pop-1 auch im Frosch Kontext-abhängig unterschiedliche  $\beta$ -Catenin Homologe rekrutiert ist unmöglich. Im Fadenwurm führt die Bindung von Bar-1 und Sys-1 zur Transkriptionsaktivierung, während Wrm-1 mit der reprimierenden Funktion assoziiert ist (Korswagen et al., 2000; Natarajan et al., 2001). *Xenopus* dagegen exprimiert, wie alle Vertebraten, nur ein  $\beta$ -Catenin. Einen vergleichbaren Mechanismus kann es also nicht geben.

Erstaunlich bleibt, dass die invertebraten Tcfs offensichtlich ihre duale Funktion auch in Vertebraten ausüben können. Dies bedarf der Aufklärung der molekularen Mechanismen, die diesen Funktionen zugrunde liegen. Nun unterscheidet sich die ventrale Situation im *Xenopus* Ei erheblich von der dorsalen. Wird das Ei in der animalen Hemisphäre befruchtet, dreht sich der Cortex um circa 30 Grad. Darunter versteht man den Vorgang der kortikalen Rotation. Auf der gegenüberliegenden Seite des Spermieintrittspunkts akkumuliert  $\beta$ -Catenin und bestimmt so die dorsale Seite des *Xenopus* Embryos (Schneider et al., 1996; Larabell et al., 1997). Auf der ventralen Seite liegt dagegen kaum  $\beta$ -Catenin vor (Moon und Kimelman, 1998). XTcf-1 und XTcf-3 kooperieren bei der Reprimierung der Wnt-Zielgene auf der ventralen Seite. Dorsal dagegen aktiviert XTcf-1 die Zielgene, während XTcf-3 sie reprimiert (Standley et al., 2006).

Die einfachste Erklärung wäre somit, dass die überexprimierten invertebraten Tcfs auf der ventralen Seite mit dem ebenfalls überexprimierten XTcf-1 um die Bindung von  $\beta$ -Catenin und/oder die DNA kompetitieren. Entsprechend ergäbe sich auf der dorsalen Seite eine Kompetition mit dem überexprimierten Repressor XTcf-3 um die Bindung von  $\beta$ -Catenin und/oder die DNA. Denkbar wäre auch eine kompetitive Reaktion um die Bindung eines Korepressor. Ob dabei, wie in *Drosophila* und *C.elegans*, auch der Korepressor Coop (Corepressor of pangolin) (Song et al., 2010) eine Rolle spielt, ist unklar.

Wenn diese einfache Erklärung zutrifft, dann sollten ventral überexprimierte invertebraten Tcfs keinen Phänotyp verursachen, denn ventral liegt endogen kein  $\beta$ -

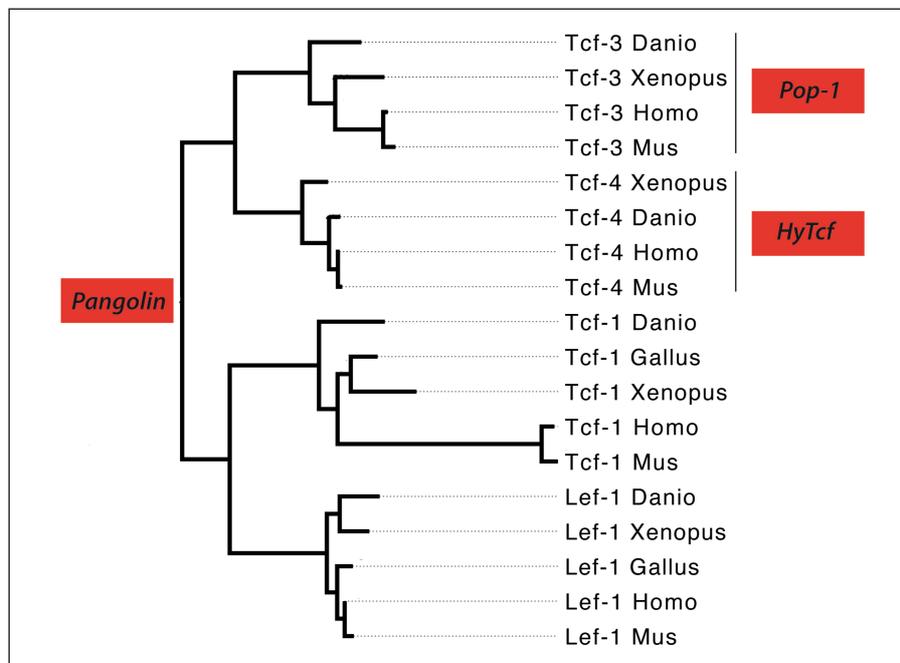
Catenin im Kern vor, und damit kann es auch zu keiner kompetitiven Reaktion mit endogen vorhandenem XTcf-1 oder XTcf-3 um  $\beta$ -Catenin kommen. Dies konnte auch im *Xenopus* Achsenduplikationsexperiment bestätigt werden. Dagegen sollten die dorsal überexprimierten invertebraten Tcfs in diesem einfachen Erklärungsmodell zur Unterdrückung der endogenen Achse führen, denn hier konkurrieren sie mit den endogen vorhandenen Tcfs XTcf-1 und XTcf-3 um nukleäres  $\beta$ -Catenin. Überraschenderweise verhalten sich die invertebraten Tcfs aber nach dorsaler Überexpression nicht wie Repressoren. So hatte die dorsale Überexpression keinen ventralisierten Phänotyp zur Folge. Die Kopfstrukturen, inklusive der Augen und der Zementdrüse, blieben erhalten. Dies mag daran liegen, dass dorsal endogenes XTcf-1 die Zielgene aktiviert, während XTcf-3 sie reprimiert (Standley et al., 2006). Invertebraten Tcfs konkurrieren hier sowohl mit dem Aktivator XTcf-1, als auch mit dem Repressor XTcf-3 um die Bindung von  $\beta$ -Catenin und/oder die DNA und/oder einen Korepressor.

Auffallend war, dass sich alle invertebraten Tcfs in den Überexpressionsstudien in *Xenopus* insgesamt gleich und ähnlich der XTcf-4 Variante XTcf-4C (Gradl et al., 2002) verhielten: Sie induzierten selbst keine sekundäre Körperachse und ventralisierten nicht, konnten aber auf der ventralen Seite die Wirkung eines starken Aktivators (XTcf-1) ausgleichen und auf der dorsalen Seite die Wirkung eines starken Repressors (XTcf-3). Somit scheinen die invertebraten Tcfs und XTcf-4 in sich Aktivator- und Repressorfunktionen zu vereinen. Für XTcf-4 konnte dies auf kleine Peptidmotiven, die ein aktivierendes Exon in der CRD flankieren, zurückgeführt werden (Pukrop et al., 2001; Gradl et al., 2002; Liu et al., 2005). Zwar lässt sich dieses Exon auch in invertebraten Tcfs identifizieren, nicht aber die flankierenden Motive. Somit müssten die invertebraten Tcfs hierfür andere Sequenzmotive verwenden als von XTcf-4 bekannt.

## **6.2 Die funktionale Analyse der invertebraten Tcfs ermöglicht deren neue Einteilung in den Stammbaum**

Um einen Einblick in die Entwicklung und die Funktionsweise der Lef/Tcfs zu erhalten, wurden funktionale Analysen der invertebraten Tcfs im vertebraten System *Xenopus laevis* durchgeführt. Basis dieser Experimente waren die spezifischen nicht-redundanten Zielgene der unterschiedlichen vertebraten Tcfs. So reguliert XTcf-1 die XTcf-4 Expression im Mittelhirn (Koenig et al., 2010) gleichzeitig ist XTcf-4 essentiell

für die XEn-2 Expression im Bereich des Isthmus (Kunz et al., 2004; Koenig et al., 2010). XCirp konnte als XTcf-3 subtypspezifisches Lef/Tcf Zielgen identifiziert werden (van Venrooy et al., 2008) und wurde hier für die Überprüfung der Tcf-3 Funktion genutzt. Die funktionale Analyse der invertebraten Tcfs offenbarte überraschende Ergebnisse. Anders als bei den Überexpressionsexperimenten verhielten sich alle drei untersuchten invertebraten Tcfs unterschiedlich und konnten sehr spezifisch die Depletion distinkter XTcfs ausgleichen. Das *Drosophila* Tcf Pangolin war in der Lage die Expression der Zielgene von XTcf-1, XTcf-3 und XTcf-4 partiell wiederherzustellen. Pop-1 dagegen konnte ausschließlich den Verlust von XTcf-3 kompensieren. HyTcf war hingegen in der Lage spezifisch XTcf-4 zu ersetzen. Dieses überraschend spezifische Ergebnis erlaubt eine neue Einteilung der invertebraten Tcfs in den Stammbaum der Lef/Tcfs (Abb. 6.2). Dabei ermöglichen diese neu gewonnenen Erkenntnisse die spezifische Zuordnung der invertebraten Tcfs basierend auf funktionalen Daten, im Gegensatz zu der bisherigen Einteilung basierend auf Sequenzanlagerungen (Abb. 1.2; Lin et al., 2006). So kann das *Caenorhabditis elegans* Tcf Pop-1 an den vertebraten Tcf-3 Cluster, HyTcf aus *Hydra magnipapillata* dagegen an den vertebraten Tcf-4 Cluster und das *Drosophila melanogaster* Tcf Pangolin kann an die Basis gestellt werden (Abb. 6.2).



**Abbildung 6.2: Neue Einteilung der invertebraten Tcfs basierend auf funktionalen Daten.** Der gezeigte Stammbaum entspricht einem Ausschnitt des phylogenetischen Stammbaums der Abbildung 1.2. (Holstein, Heidelberg). Die funktionale Analyse der invertebraten Tcfs Pangolin, HyTcf und Pop-1 lässt die Einteilung von Pop-1 an den vertebraten Tcf-3 Cluster, HyTcf an den Tcf-4 Cluster und Pangolin an die Basis zu.

Da selbst das *Cnidaria* Tcf aus *Hydra magnipapillata* in der Lage war ein *Xenopus* Tcf zu rekonstituieren, unterstreicht dies in erster Linie, dass die konservierten DNA-Bindestellen offenbar tatsächlich in der Lage sind, auch bei nur sehr weitläufig verwandten Spezies die „richtigen“ Zielgen-Promotoren zu binden. Dies sollte auch für das Tcf des letzten gemeinsamen Vorfahren aller *Eumetazoa* gelten.

Das *Drosophila* Tcf Pangolin konnte in den Wiederherstellungsexperimenten alle untersuchten XTcfs rekonstituieren. Dieses Resultat geht konform mit der für Pangolin beschriebenen Bifunktionalität. So vereint dieses Tcf sowohl Aktivator- als auch Repressorfunktion (Schweizer et al., 2003; Hoffmans et al., 2005). Es bleibt allerdings erstaunlich, dass ein Tcf ausgerechnet eines abgeleiteten Organismus wie *Drosophila* die ursprünglichen Funktionen des letzten gemeinsamen Vorfahren aller *Eumetazoa* konservierte. Auch das *C.elegans* Tcf Pop-1 vereint, wie Pangolin, Aktivator- und Repressorfunktion (Korswagen et al., 2000; Calvo et al., 2001; Owrighi et al., 2010), doch kann es in *Xenopus* ausschließlich XTcf-3, nicht aber XTcf-1 oder XTcf-4 ersetzen.

Dass die aus *Hydra magnipapillata* und *Caenorhabditis elegans* stammenden Tcfs HyTcf und Pop-1 jeweils nur ein vertebraten Homolog ersetzen können liegt eventuell an der großer Divergenz von *Hydra* und *C.elegans* innerhalb des *Cnidaria* bzw. des *Ecdysozoa* Stamms. Zwar fungieren Pop-1 und Pangolin als Aktivatoren und Repressoren, doch nehmen die beiden *Ecdysozoa* Tcfs grundsätzlich verschieden Einfluss auf die Zielgenexpression. So vermittelt Pangolin dies, unter anderem, über die Bindung an alternative DNA-Sequenzen (Blauwkamp et al., 2008). *C.elegans* folgt einem anderen Prinzip, das Wurmgenom kodiert vier verschiedene  $\beta$ -Catenin Homologe *bar-1*, *wrm-1*, *sys-1* und *hmp-2* (Natarajan et al., 2001; Takeshita und Sawa, 2005; Liu et al., 2008). Die Bindung der verschiedenen  $\beta$ -Catenin Homologe erfolgt in Abhängigkeit des Kontexts. Dies könnte erklären, warum Pop-1 weder XTcf-1 noch XTcf-4 ersetzen kann. Im Gegensatz dazu, kann Pop-1 aber den XTcf-3 Verlust substituieren. Dies liegt vermutlich in der *C.elegans* spezifischen Regulation des Pop-1 Einflusses begründet. So ist die Wirkung auf die Zielgene durch Pop-1 abhängig von dessen Konzentration. Eine niedere nukleäre Konzentration von Pop-1 wirkt aktivierend, eine hohe dagegen reprimierend auf die Transkription der Zielgene (Phillips und Kimble, 2009). Für XTcf-3 ist eine Repressorfunktion beschrieben (Brannon et al., 1999; Behrens et al., 1996; Gradl et al., 2002).

Ausgehend davon wäre denkbar, dass Pop-1 in dieser Überexpressionssituation auch reprimierend auf die XTcf-3 Zielgene wirken und daher XTcf-3 ersetzen kann. Die Interpretation der Ergebnisse mit dem aus *Hydra magnipapillata* stammendem HyTcf, gestaltet sich schwierig. So ist es weder klar, ob das endogene HyTcf aktivierend oder reprimierend auf die Wnt-Zielgene wirkt, noch ob es Kontext- und Wnt-abhängig aus einem Aktivator- in einen Repressorzustand wechseln kann. Zusammenfassend zeigen die Wiederherstellungsexperimente, dass die nicht-redundanten Tcf subtypspezifischen Funktionen der vertebraten Lef/Tcfs durch Subfunktionalisierung erklärt werden können. So ist davon auszugehen, dass die funktionellen Eigenschaften des gemeinsamen Vorläufer Tcfs durch Kontext-abhängige Aktivierung und Reprimierung gekennzeichnet war und diese auf die distinkten Vertreter der vertebraten Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren unterteilt wurden.

Die umgekehrte Analyse, also vertebraten Tcfs im invertebraten System, wurde in *C.elegans* durchgeführt (Robertson et al., 2011). In dieser Studie wurden drei vertebraten Tcf Proteine untersucht, humanes Tcf-4, *Xenopus* Tcf-3 und murines Lef-1 sowie das *C.elegans* eigene invertebraten Tcf Pop-1. Dabei wurden die Lef/Tcfs dahingehend überprüft, ob sie wie Pop-1 eine, durch die Lit-1/Wrm-1 vermittelte Phosphorylierung, Asymmetrie im Kern aufweisen und ob sie in der Lage sind, Pop-1 Zielgene zu reprimieren. Keines der untersuchten vertebraten Tcf Proteine wies ein asymmetrisches Niveau im Kern auf. Somit unterliegen sie nicht der Phosphorylierung durch Lit-1/Wrm-1 und dem damit verbundenen Kernexport.

In Rekonstitutionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass nur hTcf-4, aber nicht XTcf-3 oder mLef-1 Pop-1 ersetzen kann. Dieses Ergebnis scheint zunächst überraschend. So war im umgekehrten Fall Pop-1 in der Lage XTcf-3 zu ersetzen. Basierend auf den Ergebnissen in *Xenopus*, wäre zu vermuten, dass XTcf-3 Pop-1 ersetzen kann. In diesen Experimenten wurde die E-Form des hTcf-4 verwendet. Diese beinhaltet einen langen C-Terminus, der außerdem eine Cystein-Klammer enthält. Dieses Motiv ist auch in Pop-1 zu finden. mLef-1 liegt dagegen nur in der B-Form vor, also mit einem sehr kurzen C-Terminus. XTcf-3 hat zwar einen langen C-Terminus, dieser enthält aber ebenfalls keine Cystein-Klammer. Somit wird die Zielgenreprimierung durch Pop-1 bzw. hTcf-4 auf das Vorhandensein dieser Cystein-Klammer zurückgeführt. Dies erklärt, dass weder mLef-1 noch XTcf-3 Pop-1 in dieser spezifischen Funktion ersetzen können (Robertson et al., 2011).

Die funktionale Analyse von Pangolin in Wiederherstellungsexperimenten vorliegender Arbeit ergab, dass es in der Lage ist alle XTcfs zu ersetzen und konnte somit es als basalstes Tcf identifiziert werden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Voraussetzungen geschaffen, entsprechende Analysen auch im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* durchzuführen und die *Xenopus* Tcfs in diesem System zu untersuchen (6.5).

### **6.3 Die CRD und der C-Terminus ermöglichen die subtypspezifische Funktionen der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren**

Die zahlreichen subtypspezifischen Funktionen der Lef/Tcfs (Kunz et al., 2004; Standley et al., 2006; van Venrooy et al., 2009; Koenig et al., 2010) warfen die Frage auf, welche Domänen hierfür verantwortlich sind.

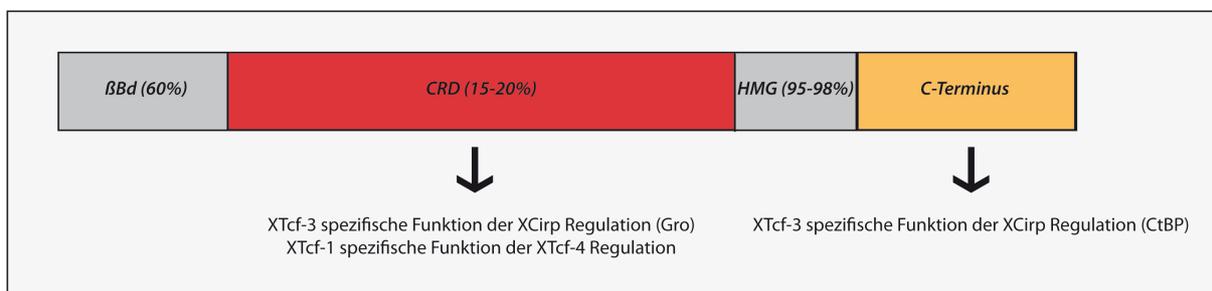
Zur Beantwortung dieser Frage wurden in vorliegender Arbeit chimäre Konstrukte bzw. ein Deletionskonstrukt verwendet. Die N-terminale  $\beta$ -Catenin Bindestelle sowie der DNA-bindende Bereich um die HMG-Box statten die Lef/Tcfs vermutlich nicht mit spezifischen Funktionen aus. Die starke Konservierung dieser Bereiche, selbst über Speziesgrenzen hinaus, lassen dies unwahrscheinlich erscheinen (Abb. 6.1). In *C.elegans* konnte bereits gezeigt werden, dass für die Reprimierung der Zielgene der C-Terminus des Pop-1 Proteins ausschlaggebend ist (Robertson et al., 2011). Versuche mit chimären Proteinen, bestehend aus Pop-1 und hTcf-4, zeigten, dass die CRD und der C-Terminus in Pop-1 die entscheidenden Bereiche für die Lit-1/Wrm-1 abhängige Pop-1 Phosphorylierung und die dadurch bedingte Asymmetrie im Kern sind (Robertson et al., 2011). Somit statten diese zwei Bereiche Pop-1 mit dessen spezifischen Eigenschaften aus.

Die große Bedeutung dieser Bereiche, auch in vertebraten Tcfs, zeigen die Versuche mit den Chimären aus XTcf-1 und XTcf-3 in vorliegender Arbeit. Diese Konstrukte waren in der Lage, die XCirp Expression in XTcf-3 depletierten Embryonen zu rekonstituieren, wobei sowohl der C-Terminus, als auch der N-Terminus bis einschließlich der HMG-Box hinreichend waren. Damit ist aber auch für diese spezifische Funktion von XTcf-3, das Vorhandensein der CRD oder des C-Terminus ausreichend. Möglicherweise lässt sich diese XTcf-3 spezifische Funktion durch die Bindung eines Korepressors erklären. So erfolgt die Groucho Bindung im Bereich der CRD, während CtBP den C-Terminus bindet. Einer dieser beiden Repressoren wäre

demnach hinreichend XCirp zu regulieren, wenn er über die HMG-Box und Wnt responsiven Elementen von Zielgenpromotoren rekrutiert wird (Abb. 6.3).

Übereinstimmend damit, können sowohl Pangolin als auch Pop-1 den Repressor XTcf-3 ersetzen, wobei nur Pangolin, aber nicht Pop-1, im C-Terminus Bindestellen für CtBP aufweist. Dagegen ist für beide gezeigt, wie auch für XTcf-3, dass sie Repressorkomplexe mit Groucho bilden (Pflugrad et al., 1997; Cavallo et al., 1998; Brannon et al., 1999). Somit scheint auch hier die Bindung eines Korepressors ausreichend zu sein. Eine einfache Erklärung, warum HyTcf den Verlust von XTcf-3 nicht kompensieren kann wäre demnach, dass dieser Transkriptionsfaktor Groucho Homologe der Vertebraten nicht erkennt.

Die Wiederherstellungsexperimente mit den Chimären aus XTcf-1 und HyTcf ergaben, dass die CRD offensichtlich die entscheidende Domäne des XTcf-1 Proteins für die Regulation der XTcf-4 Expression ist. So waren alle chimären Konstrukte mit der CRD von XTcf-1 in der Lage, die XTcf-4 Expression in XTcf-1 depletierten Embryonen partiell wiederherzustellen. Die Konstrukte mit der CRD des HyTcfs jedoch nicht. Entsprechend aktivierten alle Chimären mit der CRD von XTcf-1 den *siamois* Promotor deutlich stärker als HyTcf selbst oder Chimäre mit der CRD von HyTcf (Morath, Bachelorarbeit, 2010). Diese Regulation zeigte sich bei der Analyse des Super TOPFlash noch deutlicher (Morath, Bachelorarbeit, 2010). Somit ist die CRD von XTcf-1 wichtig für die Aktivierung der Transkription von Zielgenen und XTcf-1 subtypspezifische Funktionen, wie die Regulation der XTcf-4 Expression im Mittelhirn (Abb. 6.3).



**Abbildung 6.3: Schema der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren mit den relevanten Bereichen für deren subtypspezifische Funktionen.** Die CRD (rot) ist entscheidend für die XTcf-1 spezifische Regulation der XTcf-4 Expression und für die XCirp Regulation durch XTcf-3. Auch der C-Terminus (gelb) spielt eine Rolle in der XTcf-3 subtypspezifischen Funktion der XCirp Regulation.

Die Ergebnisse mit den Chimären in der vorliegenden Arbeit, sowie die funktionale Untersuchung in *C.elegans* (Robertson et al., 2011) zeigen deutlich, dass die CRD und der C-Terminus die Domänen sind, die den Tcfs ihre subtypspezifischen Eigenschaften verleihen. Dies ist nicht verwunderlich, da es sich hierbei um wenig konservierte Bereiche handelt, für die bereits gezeigt wurde, dass sie modulatorische Bereiche darstellen. So kann man von ihnen als Plattformen für die Bindung von Kofaktoren sprechen (Daniels und Weis, 2005; Bruhn et al., 1997; Ghogomu et al., 2006). Des Weiteren entstehen durch alternatives Spleißen in beiden Bereichen Isoformen mit wiederum unterschiedlichen Funktionen (Pukrop et al., 2001; Gradl et al., 2002; Liu et al., 2005; Wöhrle et al., 2007; Weise et al., 2010).

Unklar bleibt dennoch, wodurch die subtypspezifischen Funktionen genau definiert sind. Neben der Bindung verschiedener Kofaktoren an die CRD spielen auch posttranslationale Modifikationen in diesem Bereich eine wichtige Rolle. So kann die Hipk-2 (Homeobox induced protein kinase-2) Wnt-abhängig Serine in der CRD von Tcf-3, Tcf-4 und Lef-1 phosphorylieren. Im Gegensatz hierzu unterliegt Tcf-1 dieser Phosphorylierung nicht (Hikasa et al., 2010; Hikasa und Sokol, 2011). Manche dieser Phosphorylierungsstellen scheinen auch in den invertebraten Tcfs Pop-1 und Pangolin konserviert zu sein. Doch ob die Hipk-2 auch auf die Regulation dieser Tcfs Einfluss nimmt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Dagegen ist für die Nemo like kinase (Nlk) sowohl ein großer Einfluss auf die vertebraten Lef/Tcfs, als auch auf die invertebraten Tcfs beschrieben. So bewirkt die Phosphorylierung der vertebraten Tcfs Lef-1 und Tcf-4 durch die Nlk eine Abschwächung der Wnt-abhängigen Genexpression (Ishitani et al., 1999; Ishitani et al., 2003). Die Nlk Phosphorylierung von Tcf-3 dagegen hat eine aktivierende Wirkung auf die Zielgene (Thorpe und Moon, 2004). Wird das invertebraten Tcf Pop-1 durch die entsprechende Kinase phosphoryliert, führt dies zu dessen Kernexport und so zur Aktivierung von Zielgenen (Shetty et al., 2005; Phillips et al., 2007). Auch in *Drosophila* spielt diese Kinase eine wichtige Rolle. So konnte Nemo (NF-kappaB essential modulator like kinase) als Antagonist des Wingless-Signalwegs identifiziert werden (Zeng und Verheyen, 2004). Demnach kann für diese Kinase eine weitreichende Rolle in der Regulation der Lef/Tcfs angenommen werden.

Zudem werden die Lef/Tcfs von einer Vielzahl von Casein Kinasen phosphoryliert, was ebenfalls sowohl aktivierend, als auch reprimierend wirken kann (Lee et al., 2001; Miravet et al., 2002; Hammerlein et al., 2005; Wang und Jones, 2006). Neben

diesen Phosphorylierungen sind auch Sumoylierungen der Lef/Tcfs beschrieben, wobei auch diese Modifikationen in Abhängigkeit des Kontexts stimulierend oder inhibierend sind (Sachdev et al., 2001; Yamamoto et al., 2003).

Inwieweit diese und weitere posttranslationale Modifikationen aber auch im Kontext der subtypspezifischen Funktionen relevant sind gilt es noch zu klären.

#### **6.4 Doppelachseninduktion erfordert das komplette XTcf-1 Protein**

Der offenbar große Einfluss der CRD und des C-Terminus ist dennoch nicht für alle Funktionen der Lef/Tcfs ausreichend. So scheint für die Induktion einer Doppelachse das komplette XTcf-1 Protein notwendig zu sein. Jedwede Veränderung, sei es im C-Terminus, in der  $\beta$ -Catenin Bindedomäne oder in der CRD, führte zu Konstrukten, die keine oder nur noch sehr schwach Doppelachsen induzierten. Dies liegt nicht daran, dass die Konstrukte generell funktionslos sind, denn jedes der in der vorliegenden Arbeit getesteten Konstrukte war in mindestens einem biologischen Assay aktiv. Dies kann ebenfalls nicht daran liegen, dass einige der Konstrukte  $\beta$ -Catenin nicht binden können, denn alle chimären Konstrukte binden zumindest *in vitro* rekombinant exprimiertes humanes GST- $\beta$ -Catenin. Zudem wurde für die meisten Chimären eine Lokalisation im Kern bewiesen (Strietz, Bachelorarbeit, 2010; Morath, Bachelorarbeit, 2010).

Nicht überraschend war dabei der Einfluss des CRARF Motiv enthaltenden C-Terminus. Dieses Motiv stellt die ersten fünf Aminosäuren der Cystein-Klammer dar. Diese fungiert als zusätzliche DNA Bindedomäne, die GC reiche Motive (Konsensussequenz GCCGCCR R=A/G) stromabwärts der WREs erkennt und so die Bindung der HMG-Box an klassische Wnt-abhängige Elemente unterstützt. Sie wird somit für eine starke Zielgenaktivierung benötigt (Hecht und Stemmler, 2003; Atcha et al., 2007; Chang et al., 2008) und könnte so die starke Aktivatorfunktion von XTcf-1 erklären. Doch dieser Bereich kann hierfür nicht allein verantwortlich sein. Zum einen weil XTcf-1 nur eine unvollständige Cystein-Klammer aufweist. Die entsprechende Form des humanen Tcf-1 wurde in Zellkulturexperimenten als ein schwacher Aktivator identifiziert (Weise et al., 2010). Zum anderen beinhaltet der C-Terminus von HyTcf ein CRARF beziehungsweise ein CRARY Motiv (Archbold et al., 2012). Dieses sollte, basierend auf dessen Sequenz, in der Lage sein, eine vollständige Cystein-Klammer auszubilden und somit eine sekundäre Achse induzieren können. Die Ergebnisse der *Xenopus* Achsenduplikationsexperimente zeigten dagegen

deutlich, dass dies nicht der Fall ist. Dagegen induzieren die Aktivatoren mLef-1 und XLef-1 Doppelachsen (Behrens et al., 1996; Gradl et al., 2002), obwohl sie kein CRARF Motiv in ihrem C-Terminus enthalten. Insgesamt ist der C-Terminus und dabei vermutlich insbesondere das CRARF Motiv wichtig, aber nicht ausreichend für die XTcf-1 vermittelte Zielgenaktivierung.

Überraschend war, dass selbst der Austausch der  $\beta$ -Catenin Bindestelle zu einem Konstrukt führt, welches keine sekundären Achsen induzieren kann. Wobei deutlich gezeigt werden konnte, dass dieses Konstrukt (H111) an vertebraten  $\beta$ -Catenin binden kann. Denkbar wäre, dass die Fusion der  $\beta$ -Catenin Bindestelle des HyTcfs an das XTcf-1 zu einer veränderten Tertiärstruktur des Proteins führt. Diese Veränderung könnte eventuell die Interaktion mit Koaktivatoren verhindern. Wahrscheinlicher aber ist, dass die  $\beta$ -Catenin Bindestelle von HyTcf eine geringere Affinität zu  $\beta$ -Catenin aus *Xenopus* aufweist als XTcf-1. Diese Affinitätsunterschiede könnten sehr subtil und Kontext-abhängig sein, so dass sich das Konstrukt H111 im Doppelachsenexperiment von XTcf-1 deutlich unterscheidet, aber im Rekonstitutionsexperiment endogenes XTcf-1 ersetzen kann.

## **6.5 Die funktionale Diversität der *Xenopus* Tcfs zeigt sich auch in *Drosophila melanogaster***

Zu Beginn der funktionalen Analyse der transgenen XLef/Tcf Linien wurde zunächst durch Überexpressionsexperimente der Beantwortung dreier Fragestellungen nachgegangen. i) Führt die Überexpression der XTcfs zu einem Phänotyp und falls dies der Fall ist, ii) ähnelt dieser dem Pangolin Überexpressionsphänotyp? iii) Welche ist die geeignete Tcf Linie für die weiteren Versuche?

Dabei hängt die Wirkung von Pangolin stark vom jeweiligen Gewebe und zusätzlich auch vom Entwicklungsstadium ab. In der Musterung der Dentikel der Kutikula übt Pangolin eine reprimierende Funktion aus (Cavallo et al., 1998). Im Verlauf der Flügelentwicklung treten beide Formen auf. So hat Pangolin in der frühen Musterung eine aktivierende Wirkung auf die Zielgene *distalless* und *vestigial* (Schweizer et al., 2003). In der späteren Flügel- und Venenentwicklung jedoch eine reprimierende (Lawrence et al., 2000; Verheyen et al., 2001).

Die Linie MS1096-Gal4 induziert die Expression des eingekreuzten UAS Konstrukts im gesamten Flügel (Capdevila und Guerrero, 1994; Klein et al., 1997). Die Pangolin Überexpression mit dieser starken Flügeltreiberlinie führt zur Reduktion der Flügel-

größe, ektopischen Borsten, ektopischem Venengewebe und Einkerbungen der Flügelkante (Lawrence et al., 2000). In vorliegender Arbeit war die Pangolin Überexpression letal und führte somit zu einem deutlich stärkeren Phänotyp als in Lawrence et al. (2000) publiziert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass nicht die gleichen Linien von MS1096-Gal4 und UAS-Pangolin verwendet wurden. Die Ausprägung eines Phänotyps nach Überexpression mit dem Gal4/UAS-System steht im direkten Zusammenhang mit der Expressionsstärke des jeweiligen Konstrukts, wobei neben der Kultivierungstemperatur insbesondere der Insertionsort des Transgens die Expressionsstärke bedingt (Duffy, 2000).

Die überexprimierten XTcfs führten zu einer Reduktion der Flügelgröße, ektopischen Borsten, ektopischem Venengewebe und Einkerbungen der Flügelkante, ähnlich dem publizierten Pangolin Überexpressionsphänotyp (Lawrence et al., 2000). Dies ergab sowohl die Auswertung der gesamten Flügel als auch die der Flügelkanten. Somit scheinen auch im invertebraten System *Drosophila* die vertebraten Tcfs die „richtigen“ Zielgen-Promotoren zu erkennen und zu regulieren. Dieser Phänotyp war, aufgrund der unterschiedlichen Insertionsorte der transgenen Konstrukte, bei manchen überexprimierten XLef/Tcf Linien schwächer, bei anderen stärker ausgeprägt, bei einigen sogar so stark, dass die Flügel derart deformiert waren, dass eine detaillierte Analyse unmöglich war.

### **6.5.1 Diversität der distinkten *Xenopus* Tcfs in der Venenentwicklung**

Erst nach der Überexpression mit der schwachen Flügeltreiberlinie  $vg^{QE}$ -Gal4 wurde eine genauere Analyse der Flügelphänotypen möglich. Einzig überexprimiertes XTcf-3 konnte nicht ausgewertet werden, da auch mit dieser schwachen Treiberlinie die Flügel für eine detaillierte Analyse zu verkümmert waren.

Verheyen et al. (2001) zeigten, dass die schwache Pangolin Überexpression zu Defekten der posterioren Flügelkante, wie der Unterbrechung der Longitudinalvene 5 (L5), führt. Im Gegensatz hierzu induziert die Wingless bzw. die Armadillo Überexpression ektopisches Venengewebe im Bereich der Longitudinalvenen 2 und 5 sowie der posterioren Quervene (PCV; posterior cross vein) (White et al., 1998; Verheyen et al., 2001). Dies ist darin begründet, dass Pangolin in diesem Fall als Antagonist des Wingless-Signalwegs fungiert (Lawrence et al., 2000; Verheyen et al., 2001). In vorliegender Arbeit war der Pangolin Phänotyp zwar schwächer als bei

Verheyen et al. (2001), aber qualitativ nicht unterschiedlich. In jedem Fall führte die Pangolin Überexpression zur Unterdrückung der Venen.

Die Überexpression der *Xenopus* Tcfs offenbarte erstaunliche Ergebnisse, denn auch hier spiegelte sich ihre funktionale Diversität wider. Die überexprimierten vertebraten Tcfs XLef-1 und XTcf-1 führten zu einem Phänotyp, entsprechend dem Pangolin Überexpressionsphänotyp, also insbesondere einer Unterbrechung der Longitudinalvene 5. XTcf-4 dagegen erzeugte einen Phänotyp, welcher der Wingless bzw. der Armadillo Überexpression glich (White et al., 1998; Verheyen et al., 2001), das heißt die Ausprägung ektopischen Venengewebes.

Dieses Ergebnis ist insofern besonders überraschend, als Pangolin in diesem System eine reprimierende Wirkung auf den Wingless-Signalweg ausübt. XTcf-1 und XLef-1 sind im vertebraten System jedoch Aktivatoren, die untersuchte XTcf-4 Isoform (XTcf-4A) dagegen ein Repressor (Gradl et al., 2002). Da der XTcf-4 Überexpressionsphänotyp aber dem Wingless/Armadillo Überexpressionsphänotyp entspricht, würde es in diesem System aber als Aktivator wirken. Insgesamt sind die Phänotypen der Überexpression der vertebraten Tcfs also genau das Gegenteil dessen was erwartet wurde.

Diese Unterschiede könnten auf posttranslationale Modifikationen durch die Kinase Nemo zurückzuführen sein. Nemo agiert in der Venenentwicklung als Antagonist des Wingless-Signalwegs (Verheyen et al., 2001). Es handelt sich hierbei um ein direktes Zielgen des Wingless-Signalwegs. Die Regulation über die Phosphorylierung durch Nemo verläuft somit über einen autoregulatorischen Kreislauf (Zeng und Verheyen, 2004). Diese antagonistische Wirkung von Nemo zeigt sich auch in der phänotypischen Analyse. So entspricht der *nemo* mutante Phänotyp dem Wingless und Armadillo Überexpressionsphänotyp (White et al., 1998; Verheyen et al., 2001). Demnach wäre denkbar, dass Nemo zwar XTcf-1 und XLef-1, nicht aber XTcf-4 phosphoryliert. Eine Phosphorylierung durch Nemo bewirkt immer eine Verdrängung des jeweiligen Tcfs vom Zielgenpromotor. Damit wirken die Transkriptionsfaktoren, die durch Nemo phosphoryliert werden wie Wingless Antagonisten. Alternativ werden XTcf-1 und XLef-1 durch eine andere Kinase phosphoryliert und nehmen dann in der entsprechenden Position eine ähnliche Struktur ein wie Nemo-phosphoryliertes Pangolin.

Eine Regulation über die Nemo like kinase (Nlk) ist auch bei Vertebraten beschrieben. Für Lef-1 als auch für Tcf-4 bewirkt diese Phosphorylierung eine

Reduktion des Wnt-Signalwegs (Ishitani et al., 1999; Ishitani et al., 2003). Im Zebrafisch dagegen wirkt diese aktivierend auf die Zielgenexpression, da sie den Repressor Tcf-3 vom Promotor verdrängt (Thorpe und Moon, 2004). Der vielfältige Einsatz des Regulationsmechanismus über diese Kinase, macht es denkbar, dass Nemo auch den Repressor XTcf-4A in *Drosophila* phosphoryliert und ähnlich wie den Repressor Tcf-3 von Zielgenpromotoren entfernt. In weiterführenden Experimenten sollte die Bindung von Nemo an die *Xenopus* Tcfs durch eine Immunopräzipitation überprüft werden.

Ein anderer Erklärungsansatz der unterschiedlichen Regulation der XTcfs wäre die Bindung unterschiedlicher Zielsequenzen beziehungsweise Kofaktoren, wobei über mögliche Kofaktoren im Moment nur spekuliert werden kann. Die differentielle Bindung alternativer Zielsequenzen dagegen wäre insofern nicht überraschend, als in *Drosophila melanogaster* bereits gezeigt wurde, dass die Bindung des Pangolin/Armadillo Komplex an unterschiedliche Zielsequenzen eine Aktivierung oder eine Reprimierung zur Folge haben kann (Blauwkamp et al., 2008). Somit ist auch nicht auszuschließen, dass XTcf-4 an andere Zielsequenzen als Pangolin, XTcf-1 und XLef-1 bindet. Chromatin-Immunpräzipitationen würden bei der Aufklärung dieser Fragestellung sicher helfen, sind aber im Moment sehr schwierig, da es kaum geeignete Antikörper gegen die Lef/Tcfs aus *Xenopus* gibt.

### **6.5.2 Distinkte Auswirkungen der *Xenopus* Tcfs auf die Distalless Expression**

Eine Aktivatorfunktion von Pangolin ist am besten für die Regulation der direkten Wingless Zielgene *distalless* und *vestigial* beschrieben. Im *pangolin* mutanten Hintergrund ist deren Expression reduziert (Schweizer et al., 2003). In vorliegender Arbeit wurden die Tcfs überexprimiert und die Auswirkungen auf die Distalless Expression untersucht. Auch in diesem Experiment zeigte sich, dass die *Xenopus* Tcfs unterschiedliche Auswirkungen haben und dass Pangolin und die vertebraten Tcfs XTcf-1 und XLef-1 sich wiederum gleich verhalten. Diese drei Tcfs führten hier zu einer Aktivierung von Distalless, während XTcf-3 und XTcf-4 die Expression von Distalless reduzierten. In diesem Experiment verhalten sich die vertebraten Lef/Tcfs in *Drosophila* also wie in Vertebraten. Auch hier agieren XTcf-1 und XLef-1 als Aktivatoren, während XTcf-3 und das hier verwendete XTcf-4A als Repressoren fungieren (Molenaar et al., 1996; Gradl et al., 2002; Standley et al., 2006). Wobei XTcf-3 im vertebraten System ein stärkerer Repressor ist als XTcf-4A. Auch die

Immunfärbung zeigte einen stärker reprimierenden Effekt für XTcf-3 als für XTcf-4. Ob dies allerdings tatsächlich auf die unterschiedlich starke reprimierende Wirkung zurückgeführt werden kann ist fraglich. Denkbar wäre auch, dass dies auf einer unterschiedlich starken Expression der Transgene, bedingt durch den Insertionsort auf dem Chromosom beruht.

## 6.6 Fazit und Ausblick

Insgesamt lieferten die Überexpressionen der vertebraten Lef/Tcfs in *Drosophila* einige interessante und auch unerwartete Ergebnisse. Interessant ist, dass sich die funktionale Diversität, wie sie von vertebraten Tcfs in zahlreichen Organismen und Systemen gezeigt wurde, auch nach ihrer Überexpression in der Fliege wiederfindet. Das heißt, nicht-redundante Funktionen der Lef/Tcfs sind im Laufe der Evolution offensichtlich über Subfunktionalisierung vorhandener Elemente entstanden und diese Elemente sind so hoch konserviert, dass sie in so entfernt verwandten Organismen wie Frosch und Fliege gleichermaßen erkannt werden. Die Entstehung der subtypspezifischen Funktionen der distinkten vertebraten Lef/Tcfs über Subfunktionalisierung konnte in vorliegender Arbeit somit in zwei Organismen gezeigt werden. Einerseits in Rekonstitutionsexperimenten im vertebraten Modellorganismus *Xenopus laevis*, in denen die invertebraten Tcfs die Depletion der distinkten *Xenopus* Tcfs spezifisch ersetzen konnten, andererseits in Überexpressionsexperimenten im invertebraten Modellorganismus *Drosophila melanogaster*, in denen die verschiedenen Vertreter der XTcfs sich funktional unterschiedlich verhielten.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Versuche in *Drosophila* war, dass sich die Schwestergruppen Lef-1 und Tcf-1 beziehungsweise Tcf-3 und Tcf-4 in allen auswertbaren Experimenten gleich verhielten. Auch im vertebraten System verhalten sie sich meist gleich, XLef-1 und XTcf-1 als Aktivatoren und XTcf-3 und XTcf-4A als Repressoren (Molenaar et al., 1996; Gradl et al., 2002; Standley et al., 2006). Unerwartet war allerdings, dass in Überexpressionsexperimenten in *Drosophila* den Aktivatoren Tcf-1 und Lef-1 erstmals eine Repressorfunktion zugeschrieben werden konnte. Dabei wird interessant sein, inwieweit sich diese Repressorfunktion in Zukunft bei der Regulation distinkter Zielgene beobachten lässt und ob tatsächlich, wie oben diskutiert, Phosphorylierungen ausschlaggebend für diese Repressorfunktion sind.

Für eine spezifischere Aussage sind Studien der *Xenopus* Tcfs im *pangolin* mutanten Hintergrund nötig. Die Etablierung von Stämmen die zum einen eine PanRNAi-Sequenz und zum anderen das jeweilige XTcf tragen, würde die Analyse beider Funktionen der aktivierenden sowie der reprimierenden erlauben. Ein großer Vorteil ist die Induzierbarkeit des Systems durch die Kopplung eines jeden Abschnitts an ein UAS-Element. Somit können beide gleichzeitig zum gewünschten Zeitpunkt im gewünschten Gewebe exprimiert werden. Kutikulapräparate könnten Aufschluss über die reprimierende Funktion geben. Des Weiteren könnten diese Linien auch zur Untersuchung in der Flügelentwicklung verwendet werden. So wäre es interessant ob und wenn ja, welches XTcf den Pangolin Verlust ausgleichen kann und welches XTcf dabei eine Aktivator- und welches eine Repressorfunktion des Pangolins übernehmen kann. Mit der Etablierung und Beschreibung der XLeF/Tcf überexprimierenden Linien in vorliegender Arbeit sind solche Experimente durch einfache Kreuzungen möglich.

Auch unterstreichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Rolle der vier Proteindomänen. Die  $\beta$ -Catenin Bindedomäne und die DNA-bindende HMG-Box der Lef/Tcfs sind mit den konservierten und die CRD sowie der C-Terminus mit den spezifischen Funktionen assoziiert. So kann HyTcf sowie alle chimären Konstrukte an vertebraten  $\beta$ -Catenin binden. Auch die Bindung der invertebraten Tcfs an vertebraten Promotoren scheint tatsächlich möglich. So ist nicht nur die Konsensussequenz für murines Tcf-1 (van de Wetering et al., 1991) und Pangolin (Chang et al., 2008) identisch, sondern selbst das Tcf aus *Hydra magnipapillata* war in Wiederherstellungsexperimenten in der Lage, ein *Xenopus* Tcf zu substituieren. Somit untermauert auch dies, dass die konservierten DNA-Bindestellen offenbar tatsächlich in der Lage sind, auch bei kaum verwandten Spezies die entsprechenden Zielgen-Promotoren zu binden und in der Folge, dass die Lef/Tcfs über Subfunktionalisierung entstanden sind. Die CRD und der C-Terminus statten die Lef/Tcfs mit ihren subtypspezifischen Funktionen aus. So ist die CRD entscheidend für die XTcf-1 spezifische Funktion der XTcf-4 Regulation sowie für die XTcf-3 spezifische Funktion der XCirp Regulation. Der C-Terminus spielt ebenfalls in der XCirp Regulation durch XTcf-3 eine Rolle. Interessant wäre daher auch die Erzeugung transgener Linien die chimäre Konstrukte der Tcfs tragen und deren Untersuchung im *pangolin* mutanten Hintergrund und in Überexpressionsexperimenten. Dies könnte erhebliche Einblicke in die spezifischen Funktionen der Domänen sowie deren Eigenschaften geben. So

könnte überprüft werden, ob auch im *Drosophila* Tcf Pangolin die CRD und der C-Terminus die entscheidenden Domänen für dessen spezifische Funktionen sind. Die Nutzung weiterer chimärer Konstrukte könnte auch in *Xenopus* helfen, die Bereiche für weitere subtypspezifische Funktionen zu identifizieren und zu analysieren. Wobei hier auch Konstrukte mit Punktmutationen helfen könnten die Rolle von Phosphorylierungen und anderen Modifikationen aufzuklären.

Ein Hauptaspekt zukünftiger Experimente sollte die Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen beziehungsweise die Bindung von Kofaktoren und deren Einfluss auf die Lef/Tcfs sein. Zum einen könnten derartige Bindungen durch Immunopräzipitationen nachgewiesen werden. Diese Methode eignet sich insbesondere, um die Bindung von bereits vorliegenden Kandidaten, wie zum Beispiel die Kinase Nemo zu überprüfen. Eine andere Möglichkeit um Bindungspartner zu identifizieren würde das Hefe-Zwei-Hybrid System, unter Verwendung einer *Xenopus* spezifischen Hefe-Zwei-Hybrid Bibliothek, darstellen. Hierfür könnten die verschiedenen Domänen der *Xenopus* Lef/Tcfs als Köder eingesetzt werden und die Verwendung spezifischer Gewebe als Beute würde die Identifizierung von spezifischen Bindungspartnern ermöglichen.

## 7. Literatur

**Adamska, M., Larroux, C., Adamski, M., Green, K., Lovas, E., Koop, D., Richards, G.S., Zwafink, C., Degnan, B.M.** (2010). Structure and expression of conserved Wnt pathway components in the demosponge *Amphimedon queenslandica*. *Evol. Dev.* **12**, 494–518.

**Arata, Y., Kouike, H., Zhang, Y., Herman, M.A., Okano, H., Sawa, H.** (2006). Wnt signaling and a Hox protein cooperatively regulate PSA-3/Meis to determine daughter cell fate after asymmetric cell division in *C. elegans*. *Dev. Cell* **11**, 105–115.

**Arce, L., Pate, K. T., Waterman, M. L.** (2009). Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. *BMC Cancer* **9**, 159.

**Arce, L., Yokoyama, N. N., Waterman, M. L.** (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* **25**, 7492-7504.

**Archbold, H.C., Yang, Y. X., Chen, L., Cadigan, K. M.** (2012). How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/beta-catenin pathway. *Acta Physiol.* **204**, 74-109.

**Atcha, F. A., Munguia, J. E., Li, T. W., Hovanes, K., Waterman, M. L.** (2003). A new beta-catenin dependent activation domain in T cell factor. *J. Biol. Chem.* **278**, 16169–16175.

**Atcha, F.A., Syed, A., Wu, B., Hoverter, N.P., Yokoyama, N.N., Ting, J.H., Munguia, J.E., Mangalam, H.J., Marsh, J.L. and Waterman, M.L.** (2007). A unique DNA binding domain converts T-cell factors into strong Wnt effectors. *Mol. Cell Biol.* **27**, 8352-8363.

**Bajoghli, B.** (2007). Evolution of the Groucho/Tle gene family: gene organization and duplication events. *Dev. Genes Evol.* **217**, 613-618.

- Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M., Clevers, H.** (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J.* **20**, 4935-4943.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R.** (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**, 225–230.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmeier, W.** (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-642.
- Bertrand, V. und Hobert, O.** (2009). Linking asymmetric cell division to the terminal differentiation program of postmitotic neurons in *C. elegans*. *Dev. Cell* **16**, 563–575.
- Bienz, M.** (2005).  $\beta$ -Catenin: A pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr. Biol.* **15**, R64–R67.
- Bienz, M. und Clevers, H.** (2003). Armadillo/beta-catenin signals in the nucleus--proof beyond a reasonable doubt? *Nat. Cell Biol.* **5**, 179-182.
- Birnboim, H.C. und Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Blair, J.E. und Hedges, S.B.** (2005). Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 2275-2284.
- Blauwkamp, T.A., Chang, M.V., Cadingan, K.M.** (2008). Novel TCF-binding sites specify transcriptional repression by Wnt signalling. *EMBO J.* **27**, 1436-1444.
- Brand, A.H., und Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.

**Brannon, M., Brown, J. D., Bates, R., Kimelman, D., Moon, R. T.** (1999). XctBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* **126**, 3159- 3170.

**Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T., Kimelman, D.** (1997). A beta- catenin/XTcf-3 complex binds to the *siamois* promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.* **11**, 2359-2370.

**Brannon, M. und Kimelman, D.** (1996). Activation of *Siamois* by the *Wnt* Pathway. *Dev. Biol.* **180**, 344-347.

**Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B., Bode, H.R.** (2005). Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway. *Development* **132**, 2907–2916.

**Bruhn, L., Munnerly, A., Grosschedl, R.** (1997). ALY, a contextdependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCR alpha enhancer function. *Genes Dev.* **11**, 640–653.

**Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L., Basler, K.** (1997). Pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* **385**, 289-833.

**Calvo, D., Victor, M., Gay, F., Sui, G., Luke, M. P., Dufourcq, P., Wen, G., Maduro, M., Rothman, J., Shi, Y.** (2001). A POP-1 repressor complex restricts inappropriate cell type-specific gene transcription during *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *EMBO J.* **20**, 7197-7208.

**Campos-Ortega, J.A. und Hartenstein, V.** (1985) *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin.

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

- Carlsson, P., Waterman, M. L., Jones, K. A.** (1993). The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells. *Genes Dev.* **7**, 2418–2430.
- Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., Bejsovec, A.** (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**, 604-608.
- Chang, M.V., Chang, J.L., Gangopadhyay, A., Shearer, A., Cadigan K.M.** (2008). Activation of wingless targets requires bipartite recognition of DNA by TCF. *Curr. Biol.* **18**,1877-1881.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S., Courey, A.J.** (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor Groucho in Drosophila development. *Genes Dev.* **13**, 2218-2230.
- Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B., Hardin, J., Priess, J.R.** (1998). A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the Caenorhabditis elegans embryo. *J. Cell Biol.* **141**, 297–308.
- Couso, J.P., Bishop, S.A., Martinez Arias, A.** (1994). The wingless signalling pathway and the patterning of the wing margin in Drosophila. *Development* **120**, 621-636.
- Cramer von Laue, C.** (2003). Untersuchungen zur dualen Funktion von  $\beta$ -Catenin im Wnt-Signalweg und der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion bei Hydra. Doktorarbeit an der Technischen Universität Darmstadt.
- Daniels, D.L. und Weis, W.I.** (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 364-371.
- de la Roche, M. und Bienz, M.** (2007). Wingless-independent association of Pygopus with dTCF target genes. *Curr. Biol.* **17**, 556-561.

**Dorsky, R. I., Snyder, A., Cretekos, C. J., Grunwald, D. J., Geisler, R., Haffter, P., Moon, R. T., Raible, D. W.** (1999). Maternal and embryonic expression of zebrafish *lef1*. *Mech. Dev.* **86**, 147 -150.

**Duffy, D.J., Plickert, G., Kuenzel, T., Tilmann, W., Frank, U.** (2010). Wnt signaling promotes oral but suppresses aboral structures in *Hydractinia* metamorphosis and regeneration. *Development* **137**, 3057–3066.

**Duffy, J.B.** (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1-15.

**Duval, A., Rolland, S., Tubacher, E., Bui, H., Thomas, G., Hamelin, R.** (2000). The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res.* **60**, 3872-3879.

**Fan, M.J., Gruning, W., Walz, G., Sokol, S.Y.,** (1998). Wnt signaling and transcriptional control of *Siamois* in *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 5626–5631.

**Fang, M., Li, J., Blauwkamp, T., Bhambhani, C., Campbell, N., Cadigan, K.M.** (2006). C-terminal-binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in *Drosophila*. *EMBO J.* **25**, 2735-2745.

**Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L., Postlethwait, J.** (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**, 1531–1545.

**Galceran, J., Fariñas, I., Depew, M.J., Clevers, H., Grosschedl, R.** (1999). *Wnt3a*<sup>-/-</sup>-like phenotype and limb deficiency in *Lef1*<sup>(-/-)</sup>*Tcf1*<sup>(-/-)</sup> mice. *Genes Dev.* **15**, 709-717.

**Gay, F., Calvo, D., Lo, M.C., Ceron, J., Maduro, M., Lin R., Shi, Y.** (2003). Acetylation regulates subcellular localization of the Wnt signaling nuclear effector POP-1. *Genes Dev.* **17**, 717-722.

**Gee, L., Hartig, J., Law, L., Wittlieb, J., Khalturin, K., Bosch, T.C., Bode, H.R.** (2010). Beta-catenin plays a central role in setting up the head organizer in hydra. *Dev. Biol.* **340**, 116– 124.

**Ghogomu, S.M., van Venrooy, S., Ritthaler, M., Wedlich, D., Gradl, D.** (2006). HIC-5 is a novel repressor of lymphoid enhancer factor/T-cell factor-driven transcription. *J. Biol. Chem.* **281**, 1755-1764.

**Giese, K. und Grosschedl, R.** (1993). LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites. *EMBO J.* **12**, 4667–4676.

**Giese, K., Amsterdam, A., Grosschedl, R.** (1991). DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev.* **5**, 2567– 2578.

**Giese, K., Cox, J., Grosschedl, R.** (1992). The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* **69**, 185–195.

**Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J.R., Grosschedl, R.** (1995). Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein–protein interactions. *Genes Dev.* **9**, 995–1008.

**Gorman, C.** (1985). High efficiency gene transfer into mammalian cells. A cloning: a practical approach, IRL press Oxford.

**Gradl, D., König, A., Wedlich, D.** (2002). Functional diversity of Xenopus lymphoid enhancer factor/T-cell factor transcription factors relies on combinations of activating and repressing elements. *J. Biol. Chem.* **277**, 14159-14171.

**Graham, T.A., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D., Xu, W.** (2000). Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell* **103**, 885–896.

**Gregorieff, A., Grosschedl, R., Clevers, H.** (2004). Hindgut defects and transformation of the gastro-intestinal tract in Tcf4(-/-)/Tcf1(-/-) embryos. *EMBO J.* **23**, 1825-1833.

**Guder, C., Pinho, S., Nacak, T.G., Schmidt, H.A., Hobmayer, B., Niehrs, C., Holstein, T.W.** (2006). An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in Hydra. *Development* **133**, 901-911.

**Hamada, F. und Bienz, M.** (2004). The APC tumor suppressor binds to C-terminal binding protein to divert nuclear beta-catenin from TCF. *Dev. Cell.* **7**, 677-685.

**Hamdi, K.** (2009). Die Rolle von *XTcf1* in der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. Diplomarbeit am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie. Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Campus Süd.

**Hammerlein, A., Weiske, J., Huber, O.A.** (2005). A second protein kinase CK1-mediated step negatively regulates Wnt signalling by disrupting the lymphocyte enhancer factor-1/beta-catenin complex. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 606-618.

**Hamilton, F.S., Wheeler, G.N., Hoppler, S.** (2001). Difference in XTcf-3 dependency accounts for change in response to beta-catenin-mediated Wnt signalling in *Xenopus* blastula. *Development* **128**, 2063-2073.

**Hay, B.A., Maile, R., Rubin, G.M.** (1997). P element insertion-dependent gene activation in the *Drosophila* eye. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 5195-5200.

**He, X.L. und Zhang, J.Z.** (2005). Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics* **169**, 1157–1164.

**Hecht, A. und Stemmler, M. P.** (2003). Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4. *J. Biol. Chem.* **278**, 3776-3785.

**Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M.P., van Roy, F., Kemler, R.** (2000). The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.* **19**, 1839-1850.

**Heeg-Truesdell, E. und LaBonne, C.** (2006). Neural induction in *Xenopus* requires inhibition of Wnt-beta-catenin signaling. *Dev. Biol.* **298**, 71-86.

**Heller, N. und Brändli, A.W.** (1997). *Xenopus* Pax-2 displays multiple splice forms during embryogenesis and pronephric kidney development. *Mech. Dev.* **69**, 83-104.

**Herman, M.A.** (2003). Wnt Signaling in *C. elegans*. In Wnt Signaling in Development, M. Kuhl, ed. (Georgetown, TX: Kluwer Academic/Plenum Publishers).

**Herman, M.A., Vassilieva, L.L., Horvitz, H.R., Shaw, J.E., Herman, R.K.** (1995). The *C. elegans* gene *lin-44*, which controls the polarity of certain asymmetric cell divisions, encodes a Wnt protein and acts cell nonautonomously. *Cell* **83**, 101-110.

**Hikasa, H. Ezan, J., Itoh, K., Li, X., Klymkowsky, M.W., Sokol, S.Y.** (2010). Regulation of TCF3 by Wnt-dependent phosphorylation during vertebrate axis specification. *Dev. Cell* **19**, 521-532.

**Hikasa, H. und Sokol, S.Y.** (2011). Phosphorylation of TCF proteins by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J. Biol. Chem.* **286**, 12093-12100.

**Hobmayer, E., Hatta, M., Fischer, R., Fujisawa, T., Holstein, T.W., Sugiyama, T.** (1996). Identification of a *Hydra* homologue of the *â-catenin/plakoglobin/armadillo* gene family. *Gene* **172**, 155-159.

**Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C.M., von Laue, C.C., Snyder, P., Rothbacher, U., Holstein, T.W.** (2000). WNT signalling molecules act in axis

formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* **407**, 186-189.

**Hoffmans, R., Städeli, R., Basler, K.** (2005). Pygopus and legless provide essential transcriptional coactivator functions to armadillo/beta-catenin. *Curr. Biol.* **13**, 1207-1211.

**Hoppler, S. und Kavanagh, C.L.** (2007). Wnt signalling: variety at the core. *J. of Cell Science* **120**, 385-393.

**Houston, D. W., Kofron, M., Resnik, E., Llangland, R., Destrèe, O., Wylie, C., Heasman, J.** (2002). Repression of organizer genes in dorsal and ventral *Xenopus* cells mediated by maternal XTcf-3. *Development* **129**, 4015-4025.

**Hovanes, K., Li, T.W., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence, Marsh J., Holcombe, R.F., Waterman, M.L.** (2001). Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat. Genet.* **28**, 53-57.

**Huang, S., Shetty, P., Robertson, S.M., Lin, R.** (2007). Binary cell fate specification during *C. elegans* embryogenesis driven by reiterated reciprocal asymmetry of TCF POP-1 and its coactivator b-catenin SYS-1. *Development* **134**, 2685–2695.

**Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K.** (2003). Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/b-catenin signaling. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1379–1389.

**Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Nagai, S., Nishita, M., Meneghini, M., Barker, N., Waterman, M., Bowerman, B., Clevers, H., Shibuya, H.** (1999). The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between b-catenin and transcription factor TCF. *Nature* **399**, 798–802.

**Jamora, C, DasGupta, R., Kocieniewski, P., Fuchs, E.** (2003). Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature*

422, 317–322.

**Jennings, B.H. und Ish-Horowicz, D.** (2008). The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors. *Genome Biol.* **9**, 205.

**Kadoya, T., Yamamoto, H., Suzuki, T., Yukita, A., Fukui, A., Michiue, T., Asahara, T., Tanaka, K., Asashima, M., Kikuchi, A.** (2002). Desumoylation activity of Axam, a novel Axin-binding protein, is involved in downregulation of beta-catenin. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3803–3819.

**Kahler, R. A. und Westendorf, J. J.** (2003). Lymphoid enhancer factor-1 and  $\beta$ -catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J. Biol. Chem.* **278**, 11937–11944.

**Kaletta, T., Schnabel, H., Schnabel, R.** (1997). Binary specification of the embryonic lineage in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **390**, 294–298.

**Kao, K. R. und Elinson, R. P.** (1988) The entire mesodermal mantle behaves as Spemann's organizer in dorsoanterior enhanced *Xenopus laevis* embryos. *Dev. Biol.* **127**, 64–77.

**Kidd, A.R., III, Miskowski, J.A., Siegfried, K.R., Sawa, H., Kimble, J.** (2005). A  $\beta$ -catenin identified by functional rather than sequence criteria and its role in Wnt/MAPK signaling. *Cell* **121**, 761–772.

**King, N., Westbrook, M.J., Young, S.L., Kuo, A., Abedin, M., Chapman, J., Fairclough, S., Hellsten, U., Isogai, Y., Letunic, I., Marr, M., Pincus, D., Putnam, N., Rokas, A., Wright, K.J., Zuzow, R., Dirks, W., Good, M., Goodstein, D., Lemons, D., Li, W., Lyons, J.B., Morris, A., Nichols, S., Richter, D.J., Salamov, A., Sequencing, J.G., Bork, P., Lim, W.A., Manning, G., Miller, W.T., McGinnis, W., Shapiro, H., Tjian, R., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.** (2008). The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature* **451**, 783–788.

**Klein, T., Brennan, K., Arias, A.M.** (1997). An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **189**, 123-134.

**Kioussi, C., Briata, P., Baek, S.H., Rose, DW., Hamblet, N.S., Herman, T., Ohgi, K.A., Lin, C., Gleiberman, A., Wang, J., Brault, V., Ruiz-Lozano, P., Nguyen, H.D., Kemler, R., Glass, C.K., Wynshaw-Boris, A., Rosenfeld, M.G.** (2002). Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* **111**, 673-685.

**Kirmizis, A., Bartley, S.M., Farnham, P.J.** (2003). Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* **2**, 113-121.

**König, A., Gradl, D., Kühl, M., Wedlich, D.** (2000). The HMG-box transcription factor XTcf-4 demarcates the forebrain-midbrain boundary. *Mech. Dev.* **93**, 211-214.

**König, A. O.** (2003). Isolierung und Charakterisierung des Transkriptionsfaktors XTcf-4 in *Xenopus laevis*. Doktorarbeit in der Abteilung Biochemie. Universität Ulm.

**Koenig, S.F., Brentle, S., Hamdi, K., Fichtner, D., Wedlich, D., Gradl, D.** (2010) En2, Pax2/5 and Tcf-4 transcription factors cooperate in patterning the *Xenopus* brain. *Dev. Biol.* **340**, 318-328.

**Koenig, S.F., Lattanzio, R., Mansperger, K., Rupp, R.A., Wedlich, D., Gradl, D.** (2008). Autoregulation of XTcf-4 depends on a Lef/Tcf site on the XTcf-4 promoter. *Genesis* **46**, 81-86.

**Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destrée, O., Clevers, H.** (1998) Two Members of the Tcf Family Implicated in Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling During Embryogenesis in the Mouse. *Mol. Cell Biol.* **18**, 1248-1256.

**Korswagen, H.C., Herman, M.A., Clevers, H.C.** (2000). Distinct beta-catenins mediate adhesion and signalling functions in *C. elegans*. *Nature* **406**, 527–532.

**Kühl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., Moon, R.T.** (2000). The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* **16**, 279–283.

**Kunz, M., Herrmann, M., Wedlich, D., Gradl, D.** (2004). Autoregulation of canonical Wnt signaling controls midbrain development. *Dev. Biol.* **273**, 390-401.

**Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hrouda, M., Lentfer, J., Schmidt, H.A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M.Q., Holstein, T.W.** (2005). Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* **433**, 156–160.

**Lam, N., Chesney, M.A., Kimble, J.** (2006). Wnt signaling and CEH-22/tinman/Nkx2.5 specify a stem cell niche in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **16**, 287–295.

**Lawrence, N., Dearden, P., Hartley, D., Roose, J., Clevers, H., Arias, A.M.** (2000). dTcf antagonises Wingless signalling during the development and patterning of the wing in *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 749-756.

**Lee, E., Salic, A., Kirschner, M.W.** (2001). Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon. *J. Cell Biol.* **154**, 983-993.

**Lemaire, P., Garrett, N., Gurdon, J.B.** (1995). Expression cloning of Siamois, a *Xenopus* homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis. *Cell* **81**, 85-94.

**Lengfeld, T., Watanabe, H., Simakov, O., Lindgens, D., Gee, L., Law, L., Schmidt, H.A., Ozbek, S., Bode, H., Holstein, T.W.** (2009). Multiple Wnts are involved in Hydra organizer formation and regeneration. *Dev Biol.* **330**, 186-199.

**Li, J. und Wang, C.Y.** (2008). TBL1-TBLR1 and beta-catenin recruit each other to Wnt target-gene promoter for transcription activation and oncogenesis. *Nat. Cell Biol.* **10**, 160-169.

**Lin, H. C., Holland, L. Z., Holland, N. D.** (2006). Expression of the *AmphiTcf* gene in amphioxus: insights into the evolution of the TCF/LEF gene family during vertebrate evolution. *Dev. Dyn.* **235**, 3396-3403.

**Lin, R., Hill, R.J., Priess, J.R.** (1998). POP-1 and anterior-posterior fate decision in *C. elegans* embryos. *Cell* **92**, 229–239.

**Lin, R., Thompson, S., Priess, J. R.** (1995). *pop-1* encodes an HMG box protein required for the specification of a mesoderm precursor in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**, 599-609.

**Liu, F., van den Broek, O., Destree, O., Hoppler, S.** (2005). Distinct roles for *Xenopus* Tcf/Lef genes in mediating specific responses to Wnt/beta-catenin signalling in mesoderm development. *Development* **132**, 5375-5385.

**Liu, J., Phillips, B.T., Amaya, M.F., Kimble, J., Xu, W.** (2008). The *C. elegans* SYS-1 protein is a bona fide b-catenin. *Dev. Cell* **14**, 751–761.

**Lo, M.C., Gay, F., Odom, R., Shi, Y., Lin, R.** (2004). Phosphorylation by the b-catenin/MAPK complex promotes 14-3-3-mediated nuclear export of TCF/ POP-1 in signal-responsive cells in *C. elegans*. *Cell* **117**, 95–106.

**Logan, C.Y. und Nusse, R.** (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 781-810.

**MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X.** (2009). Wnt/b-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **17**, 9–26.

**Maduro, M.F., Kasmir, J.J., Zhu, J., Rothman, J.H.** (2005). The Wnt effector POP-1 and the PAL-1/Caudal homeoprotein collaborate with SKN-1 to activate *C. elegans*

endoderm development. *Dev. Biol.* **285**, 510–523.

**Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M., Vinkemeier, U.** (2004). Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol.* **165**, 823-833.

**McGrew, L. L., Takemaru, K., Bates, R., Moon, R. T.** (1999). Direct regulation of the *Xenopus engrailed-2* promoter by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt- responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in *Xenopus*. *Mech. Dev.* **87**, 21-32.

**McKendry, R., Hsu, S.C., Harland, R.M., Grosschedl, R.,** (1997). LEF-1/TCF proteins mediate wnt-inducible transcription from the *Xenopus nodal*- related 3 promoter. *Dev. Biol.* **192**, 420–431.

**Meneghini, M.D., Ishitani, T., Carter, J.C., Hisamoto, N., Ninomiya-Tsuji, J., Thorpe, C.J., Hamill, D.R., Matsumoto, K., Bowerman, B.** (1999). MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **399**, 793–797.

**Menzel, K.** (2011). Evolutionär konservierte Funktionen der Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren. Diplomarbeit am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie. Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Campus Süd.

**Merrill, B.J., Pasolli, H.A., Polak, L., Rendl, M., García-García, M.J., Anderson, K.V., Fuchs, E.** (2004). Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development* **131**, 263-274.

**Minde, D.P., Anvarian, Z., Rüdiger, S.G., Maurice, M.M.** (2011). Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol. Cancer* **10**, 101.

**Miravet, S., Piedra, J., Miro, F., Itarte, E., García de Herreros, A., Duñach, M.** (2002). The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin. *J. Biol. Chem.* **277**, 1884-1891.

**Molenaar, M., Roose, J., Peterson, J., Venanzi, S., Clevers, H., Destree, O.** (1998). Differential expression of the HMG box transcription factors XTcf-3 and XLef-1 during early xenopus development. *Mech Dev.* **75**, 151-154.

**Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., Clevers, H.** (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. *Cell* **86**, 391-399.

**Moon, R.T. und Kimelman, D.** (1998). From cortical rotation to organizer gene expression: toward a molecular explanation of axis specification in Xenopus. *Bioessays* **20**, 536-545.

**Morata, G.** (2001). How *drosophila* appendages develop. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 89-97.

**Morath, I.** (2010). Konservierte und nicht konservierte Funktionen der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren. Bachelorarbeit am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie. Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Campus Süd.

**Mosiman, C., Hausmann, G., Basler, K.** (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 276-286.

**Müller, W., Frank, U., Teo, R., Mokady, O., Guette, C., Plickert, G.** (2007). Wnt signaling in hydroid development: ectopic heads and giant buds induced by GSK-3beta inhibitors. *Int. J. Dev. Biol.* **51**, 211–220.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.** (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction, *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* **51**, 263.
- Natarajan, L., Witwer, N.E., Eisenmann, D.M.** (2001). The divergent *Caenorhabditis elegans* b-catenin proteins BAR-1, WRM-1 and HMP-2 make distinct protein interactions but retain functional redundancy in vivo. *Genetics* **159**, 159–172.
- Neufeld, T.P. und Edgar, B.A.** (1998). Connections between growth and the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 784-790.
- Nieuwkoop, P. D. und Faber, J.** (1967). Normtabelle von *Xenopus laevis*. Elsevier North- Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Nusse, R.** (2001). An ancient cluster of Wnt paralogues. *Trends Genet.* **17**, 443.
- Okamura, R. M., Sigvardsson, M., Galceran, J., Verbeek, S., Clevers, H., Grosschedl, R.** (1998). Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity* **8**, 11-20.
- Oosterwegel, M., van de Wetering, M., Dooijes, D., Klomp, L., Winoto, A., Georgopoulos, K., Meijlink, F., Clevers, H.** (1991). Cloning of murine TCF-1, a T cell-specific transcription factor interacting with functional motifs in the CD3-epsilon and T cell receptor alpha enhancers. *J. Exp. Med.* **173**, 1133–1142.
- Owraghi, M., Broitman-Maduro, G., Luu, T., Roberson, H., Maduro, M.F.** (2010). Roles of the Wnt effector POP-1/TCF in the *C. elegans* endomesoderm specification gene network. *Dev. Biol.* **2**, 209-221.
- Pang, K., Ryan, J.F., Mullikin, J.C., Baxevanis, A.D., Martindale, M.Q.** (1999). Genomic insights into Wnt signaling in an early diverging metazoan, the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *EvoDevo* **1**, 10.

**Park, F.D. und Priess, J.R.** (2003). Establishment of POP-1 asymmetry in early *C. elegans* embryos. *Development* **130**, 3547–3556.

**Parker, D.S., Ni, Y.Y., Chang, J.L., Li, J., Cadigan, K.M.** (2008). Wingless signaling induces widespread chromatin remodeling of target loci. *Mol. Cell Biol.* **28**, 1815-1828.

**Pflugrad, A., Meir, J.Y., Barnes, T.M., Miller, D.M. 3rd** (1997). The Groucho-like transcription factor UNC-37 functions with the neural specificity gene *unc-4* to govern motor neuron identity in *C. elegans*. *Development* **124**, 1699-1709.

**Phillips, B.T., Kidd, A.R., III, King, R., Hardin, J., Kimble, J.** (2007). Reciprocal asymmetry of SYS-1/b-catenin and POP-1/TCF controls asymmetric divisions in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 3231– 3236.

**Phillips, B.T. und Kimble, J.** (2009). A new look at TCF and beta-catenin through the lens of a divergent *C. elegans* Wnt pathway. *Dev. Cell* **17**, 27-34.

**Piepenburg, O., Vorbrüggen, G., Jäckle, H.** (2000). *Drosophila* Segment Borders Result from Unilateral Repression of Hedgehog Activity by Wingless Signaling. *Mol. Cell* **6**, 203–209.

**Pukrop, T.** (2002) Untersuchung zur Regulation der „Lymphoid Enhancer Factor/T-Cell Factor“ Transkriptionsfaktoren. Doktorarbeit in der Abteilung Biochemie. Universität Ulm.

**Pukrop, T., Gradl, D., Henningfeld, K.A., Knochel, W., Wedlich, D., Köhl, M.** (2001). Identification of two regulatory elements within the high mobility group box transcription factor XTCF-4. *J. Biol. Chem.* **276**, 8968-8978.

**Putnam, N.H., Butts, T., Ferrier, D.E., Furlong, R.F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J.K., Benito-Gutiérrez, E.L., Dubchak, I., Garcia-Fernández, J., Gibson-Brown, J.J., Grigoriev, I.V., Horton, A.C., de Jong, P.J., Jurka, J., Kapitonov, V.V., Kohara, Y., Kuroki, Y., Lindquist,**

**E., Lucas, S., Osoegawa, K., Pennacchio, L.A., Salamov, A.A., Satou, Y., Sauka-Spengler, T., Schmutz, J., Shin-I, T., Toyoda, A., Bronner-Fraser, M., Fujiyama, A., Holland, L.Z., Holland, P.W., Satoh, N., Rokhsar, D.S.** (2008). The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* **453**, 1064-1071.

**Reya, T. und Clevers, H.** (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843–850.

**Reya, T., O’Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., Grosschedl, R.** (2000). Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* **13**, 15-24.

**Robertson, S.M., Lo, M.C., Odom, R., Yang, X.D., Medina, J., Huang S, Lin, R.** (2011). Functional analyses of vertebrate TCF proteins in *C. elegans* embryos. *Dev. Biol.* **355**, 115-123.

**Rocheleau, C.E., Downs, W.D., Lin, R., Wittmann, C., Bei, Y., Cha, Y.H., Ali, M., Priess, J.R., Mello, C.C.** (1997). Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* **90**, 707–716.

**Rocheleau, C.E., Yasuda, J., Shin, T.H., Lin, R., Sawa, H., Okano, H., Priess, J.R., Davis, R.J., Mello, C.C.** (1999). WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. *Cell* **97**, 717-726.

**Roël, G., Hamilton, F.S., Gent, Y., Bain, A.A., Destrée, O., Hoppler, S.** (2002). Lef-1 and Tcf-3 transcription factors mediate tissue-specific Wnt signaling during *Xenopus* development. *Curr. Biol.* **12**, 1941-1945.

**Roël, G., Gent, Y.Y., Peterson-Maduro, J., Verbeek, F.J., Destrée, O.** (2009). Lef1 plays a role in patterning the mesoderm and ectoderm in *Xenopus tropicalis*. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 81-89.

**Roël, G., van den Broek, O., Spieker, N., Peterson-Maduro, J., Destrée, O.** (2003). Tcf-1 expression during *Xenopus* development. *Gene Expr. Patterns* **3**, 123-126.

**Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Weering, M., Destree, O., Clevers, H.** (1998). The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* **395**, 608 – 612.

**Roth W, Sustmann C, Kieslinger M, Gilmozzi A, Irmer D, Kremmer E, Turck C, Grosschedl R.** (2004). PIASy-deficient mice display modest defects in IFN and Wnt signaling. *J. Immunol.* **173**, 6189-6199.

**Rubin, G. M. und Spradling, A. C.,** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science.* **218**, 348-353.

**Ruvkun, G. und Hobert, O.** (1998). The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **282**, 2033–2041.

**Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., Grosschedl, R.** (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* **15**, 3088-3103.

**Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H.** (1985). Enzymatic Amplification of Beta-Globin Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia, *Science* **230**, 1350-1354.

**Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.,** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* **24**,104-108.

**Satow, R., Shitashige, M., Jigami, T., Honda, K., Ono, M., Hirohashi, S., Yamada, T.** (2010). Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for canonical Wnt signaling in *Xenopus* axis formation. *J. Biol. Chem.* **285**, 26289-26294.

- Sawa, H., Lobel, L., Horvitz, H.R.** (1996). The *Caenorhabditis elegans* gene *lin-17*, which is required for certain asymmetric cell divisions, encodes a putative seven-transmembrane protein similar to the *Drosophila* frizzled protein. *Genes Dev.* **10**, 2189–2197.
- Schweizer, L., Nellen, D., Basler, K.** (2003). Requirement for Pangolin/dTCF in *Drosophila* Wingless signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 5846–5851.
- Seto, E. und Bellen, H.J.** (2004). The ins and outs of Wingless signaling. *Trends Cell Biol.* **14**, 45–53.
- Shackelford, G.M., Shivakumar, S., Shiue, L., Mason, J., Kenyon, C., Varmus, H.E.** (1993). Two Wnt genes in *Caenorhabditis elegans*. *Oncogene* **8**, 1857–1864.
- Shetty, P., Lo, M.-C., Robertson, S.M., Lin, R.** (2005). *C. elegans* TCF protein, POP-1, converts from repressor to activator as a result of Wnt- induced lowering of nuclear levels. *Dev. Biol.* **285**, 584–592.
- Shin, T.H., Yasuda, J., Rocheleau, C.E., Lin, R., Soto, M., Bei, Y., Davis, R.J., Mello, C.C.** (1999). MOM-4, a MAP kinase kinase kinase-related protein, activates WRM-1/LIT-1 kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. *Mol. Cell* **4**, 275–280.
- Shitashige, M., Hirohashi, S., Yamada, T.** (2008). Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer science* **99**, 631–637.
- Shulewitz, M., Soloviev, I., Wu, T., Koeppen, H., Polakis, P., Sakanaka, C.** (2006). Repressor roles for TCF-4 and Sfrp1 in Wnt signaling in breast cancer. *Oncogene* **25**, 4361–4369.
- Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C.A., Jones, K.A.** (2006) The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev.* **5**, 586–600.

**Siegfried, K.R., Kidd, A.R.III, Chesney, M.A., Kimble, J.** (2004). The *sys-1* and *sys-3* genes cooperate with Wnt signaling to establish the proximal-distal axis of the *Caenorhabditis elegans* gonad. *Genetics* **166**, 171-186.

**Siegfried, K.R., und Kimble, J.** (2002). POP-1 controls axis formation during early gonadogenesis in *C. elegans*. *Development* **129**, 443–453.

**Smith, W.C. und Harland R.M.** (1991). Injected Xwnt-8 RNA acts early in *Xenopus* embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell* **67**, 753-765.

**Sokol, S.Y., Christian, J., Moon, R., Melton, D.,** (1991). Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell* **67**, 741-752.

**Sokol, S.Y.** (2011). Wnt signaling through T-cell factor phosphorylation. *Cell Res.* **21**, 1002-1012.

**Song, H., Goetze, S., Bischof, J, Spichiger-Haeusermann, C., Kuster, M., Brunner, E., Basler, K.** (2010). Coop functions as a corepressor of Pangolin and antagonizes Wingless Signaling. *Genes Dev.* **24**, 881-886.

**Srivastava, M., Begovic, E., Chapman, J., Putnam, N.H., Hellsten, U., Kawashima, T., Kuo, A., Mitros, T., Salamov, A., Carpenter, M.L., Signorovitch, A.Y., Moreno, M.A., Kamm, K., Grimwood, J., Schmutz, J., Shapiro, H., Grigoriev, I.V., Buss, L.W., Schierwater, B., Dellaporta, S.L., Rokhsar, D.S.** (2008). The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature* **454**, 955-960.

**Städeli, R. und Basler, K.** (2005). Dissecting nuclear Wingless signalling: recruitment of the transcriptional co-activator Pygopus by a chain of adaptor proteins. *Mech. Dev.* **122**, 1171-1182.

**Standley, H.J., Destrée, O., Kofron, M., Wylie, C., Heasman, J.** (2006). Maternal XTcf1 and XTcf4 have distinct roles in regulating Wnt target genes. *Dev. Biol.* **289**, 318-328.

**Strietz, J.** (2010) Konservierte und nicht konservierte Funktionen des Transkriptionsfaktors XTcf3. Bachelorarbeit am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie. Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Campus Süd.

**Takamaru, K. I. und Moon, R. T.** (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with  $\beta$ -catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.* **149**, 249–254.

**Takeshita, H. und Sawa, H.** (2005). Asymmetric cortical and nuclear localizations of WRM-1/ $\beta$ -catenin during asymmetric cell division in *C. elegans*. *Genes Dev.* **19**, 1743–1748.

**Theisen, H., Syed, A., Nguyen, B. T., Lukacsovich, T., Purcell, J., Srivastava, G. P., Iron, D., Gaudenz, K., Nie, Q., Wan, F. Y., Waterman, M. L., Marsh, J. L.** (2007). Wingless directly represses DPP morphogen expression via an armadillo/TCF/Brinker complex. *PLoS One* **2**, e142.

**Theodosiou, N.A. und Xu, T.** (1998). Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods* **4**, 355-365.

**Thompson, B. J.** (2004). A complex of Armadillo, Legless, and Pygopus coactivates dTCF to activate Wingless target genes. *Curr. Biol.* **14**, 458-466.

**Thorpe, C.J. und Moon, R.T.** (2004). nemo-like kinase is an essential co-activator of Wnt signaling during early zebrafish development. *Development* **131**, 2899-2909.

**Thorpe, C.J., Schlesinger, A., Carter, J.C., Bowerman, B.** (1997). Wnt signaling polarizes an early *C. elegans* blastomere to distinguish endoderm from mesoderm. *Cell* **90**, 695–705.

**Travis, A., Amsterdam, A., Belanger C., Grosschedl, R.** (1991). LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes Dev.* **5**, 880-894.

- Vacik, T., Stubbs, J.L., Lemke, G.** (2011). A novel mechanism for the transcriptional regulation of Wnt signaling in development. *Genes Dev.* **25**, 1783-1795.
- Valenta, T., Lukas, J., Doubravska, L., Fafilek, B., Korinek, V.** (2006). HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *EMBO J.* **25**, 2326-2337.
- van Beest, M., Dooijes, D., van de Wetering, M., Kjaerulff, S., Bonvin, A., Nielsen, O., Clevers, H.** (2000). Sequence-specific High Mobility Group Box Factors Recognize 10- 12-Base Pair Minor groove Motifs. *J. Biol. Chem.* **275**, 27266-27273.
- van de Wetering, M., Castrop, J., Korinek, V., Clevers, H.** (1996). Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol. Cell Biol.* **16**, 745-752.
- van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., Peifer, M., Mortin, M., Clevers, H.** (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene *dTCF*. *Cell* **88**, 789-799.
- van de Wetering, M., Oesterwegel, M., Dooijes, D., Clevers, H.** (1991). Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J.* **10**, 123-132.
- van Genderen, C., Okamura, R.M., Fariñas, I., Quo, R.G., Parslow, T.G., Bruhn, L., Grosschedl, R.** (1994). Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.* **8**, 2691-2703.
- van Venrooy, S., Fichtner, D., Kunz, M., Wedlich, D., Gradl, D.** (2008) Cold-inducible RNA binding protein (CIRP), a novel XTcf-3 specific target gene regulates neural development in *Xenopus*. *BMC Dev. Biol.* **8**, 77.

---

**Veeman, M.T., Axelrod, J.D., Moon, R.T.** (2003). A second canon. Functions and mechanisms of  $\beta$ -catenin-independent Wnt signaling. *Dev. Cell* **5**, 367–377.

**Veien, E. S., Grierson, M. J., Saund, R. S., Dorsky, R. I.** (2005). Expression pattern of zebrafish *tcf7* suggest unexplored domains of Wnt/beta-catenin activity. *Dev. Dyn.* **233**, 233- 239.

**Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A., MacDonald, H.R., Clevers, H.** (1995). An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* **374**, 70-74.

**Verheyen, E.M., Mirkovic, I., MacLean, S.J., Langmann, C., Andrews, B.C., MacKinnon, C.** (2001). The tissue polarity gene *nemo* carries out multiple roles in patterning during *Drosophila* development. *Mech. Dev.* **101**, 119-132.

**Waltzer, L. und Bienz, M.** (1998). *Drosophila* CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature* **395**, 521-525.

**Wang, S. und Jones, K.A.** (2006) CK2 controls the recruitment of Wnt regulators to target genes *in vivo*. *Curr. Biol.* **16**, 2239- 2244.

**Waterman, M.L., Fischer, W.H., Jones, K.A.** (1991). A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer. *Genes Dev.* **5**, 656–669.

**Weise, A., Bruser, K., Elfert, S., Wallmen, B., Wittel, Y., Wöhrle, S., Hecht, A.** (2010). Alternative splicing of *Tcf7l2* transcripts generates protein variants with differential promoter-binding and transcriptional activation properties at Wnt/beta-Catenin targets. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1964- 1981.

**White, P., Aberle, H., Vincent, J.P.** (1998). Signaling and adhesion activities of mammalian beta-catenin and plakoglobin in *Drosophila*. *J. Cell. Biol.* **140**, 183-195.

---

**Willert, K. und Jones, K.A.** (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev.* **20**, 1394-1404.

**Wöhrle, S., Wallmen, B., Hecht, A.** (2007). Differential control of Wnt target genes involves epigenetic mechanisms and selective promoter occupancy by TCFs. *Mol. Cell Biol.* **27**, 8164-8177.

**Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y., Kikuchi, A.** (2003). Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J.* **22**, 2047-2059.

**Yang, M., Waterman, M.L., Brachmann, R.K.** (2008). hADA2a and hADA3 are required for acetylation, transcriptional activity and proliferative effects of beta-catenin. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 120-128.

**Young, R. M., Reyes, A. E., Allende, M. L.** (2002). Expression and splice variant analysis of the zebrafish tcf4 transcription factor. *Mech. Dev.* **117**, 269-273.

**Zeng, Y.A und Verheyen E.M.** (2004). Nemo is an inducible antagonist of Wingless signaling during Drosophila wing development. *Development* **131**, 2911-2920.

## 8. Anhang

### Liste der verwendeten Abkürzungen

***Neben den üblichen SI-Einheiten kommen folgende Abkürzungen vor:***

(v/v)	Volumen - Volumen - Verhältnis
(w/v)	Gewichts - Volumen - Verhältnis
Apc	Adenomatous Polyposis Coli
Arm	Armadillo (Drosophila $\beta$ -Catenin)
Bar-1	beta-catenin/armadillo related-1
$\beta$ Bd	$\beta$ -Catenin Bindedomäne
Bcl-9	B-cell lymphoma-9
Bra	Brachyury
Cbp/p300	Creb binding protein/E1A-Binding protein, 300 kDA
Cirp	cold inducible RNA binding protein
CRD	Kontext abhängige regulatorische Domäne (engl. <i>context dependent regulatory domain</i> )
CtBP	C-terminal binding protein
Dll	DlStalless
Dsh	Dishevelled (Dvl in <i>Drosophila</i> )
dTcf	<i>Drosophila melanogaster</i> Tcf (Pangolin)
En	Engrailed
Grg	Groucho related genes (Gro Groucho in <i>Drosophila</i> )
Gsk	Glycogen synthase kinase
Hipk	Homeodomain interacting protein kinase
HMG	High Mobility Group
Hy $\beta$ -Catenin	<i>Hydra magnipapillata</i> $\beta$ -Catenin
HyTcf	<i>Hydra magnipapillata</i> Tcf
Lef	Lymphoid enhancer factor
Lgs	Legless
Lit-1	Loss of intestine-1

---

Nemo	NF-kappaB essential modulator like kinase
Nik	NEMO like kinase
Nr-3	Nodal related-3
Pan	Pangolin ( <i>Drosophila melanogaster</i> Tcf)
Pax	Paired box
Pop-1	Posterior pharynx defect-1 ( <i>Caenorhabditis elegans</i> Tcf)
Sia	Siamois
Sys-1	Symmetrical sister-1
Tcf	T-cell factor
TLE	Transducin like enhancer
UAS	Stromaufwärts liegende Aktivierungssequenz (engl. <i>upstream activating sequence</i> )
Vg <sup>QE</sup>	Vestigial quadrant enhancer
Wg	Wingless ( <i>Drosophila melanogaster</i> Wnt)
Wnt	Wingless/Int-related
WRE	Wnt responsives Element (engl. <i>Wnt responsive element</i> )
Wrm-1	Worm armadillo-1

## Anlagerung der Lef/Tcf Sequenzen

	1	10	20	30	40	50	60
Tcf (Pangolin) Drosophila	MPHTHSRHG	-----	-----	SSGDDL	CSTDEVK	IFKDEGDRE	EKISSENL
Tcf (Pangolin) Tribolium	MPHVSS	-----	-----	SSGDDL	LGSTDEVK	VFKDEGDGE	DEKRSSEN
Lef-1 Homo	MPQLSGGGGG	-----	-----	GGPEL	CATDEMIP	PFKDEGDP	QKEKIFAEISHPE
Lef-1 Mus	MPQLSGGGGG	-----	-----	GDPEL	CATDEMIP	PFKDEGDP	QKEKIFAEISHPE
Lef-1 Gallus	MPQLPGAGGGG	-----	-----	GDPEL	CATDEMIP	PFKDEGDP	QKEKIFAEISHPE
Lef-1 Xenopus	MPQLSGAGGGNG	-----	-----	VGGPEL	CATDEMIP	PFKDEGDP	QKEKIYAEISNPE
Lef-1 Danio	MPQLSGGGGG	-----	-----	GGPEL	CATDEMIP	PFKDEGDP	HPKEQIFAEISHSE
Tcf-4 Mus	MPQLNGG	-----	-----	GGDDL	GANDELIS	FKDEG-EQ	EENKSENS
Tcf-4 Homo	MPQLNGG	-----	-----	GGDDL	GANDELIS	FKDEG-EQ	EENKSENS
Tcf-4 Danio	MPQLNGG	-----	-----	GGDDL	GANDEMIS	FKDEG-EQ	EENKSENS
Tcf-4 Xenopus	MPQLNGG	-----	-----	GGDDL	GANDEMIS	FKDEG-EQ	EENKSENS
Tcf-3 Homo	MPQLGGGGGGGGGGGGGGGGGG	SSAGAGGG	GGDDL	GANDELIP	FQDEGGEE	QEPSSD	SAS
Tcf-3 Mus	MPQLGGGRGGAGGG	-----	GGGS	GAGATSG	GGDDL	GANDELIP	FQDEGGEE
Tcf-3 Xenopus	MPQLNSG	-----	-----	GGDEL	GANDELIR	FKDEG-EQ	EENKSPGEGS
Tcf-3 Danio	MPQLNGG	-----	-----	GGDDL	GANDELIS	FKDEG-EQ	EENKSENS
Tcf-1 Mus	MPQLDSGGGGAG	-----	-----	AGDDL	GAPDELLA	FQDEGEE	QDDKNRDSAVGP
Tcf-1 Homo	MPQLDSGGGGAG	-----	-----	GGDDL	GAPDELLA	FQDEGEE	QDDKSRDSAAGP
Tcf-1 Gallus	MPQLSGGGG	-----	-----	DDL	GATDEMLA	FKDEG-EQ	EENKIPENAF
Tcf-1 Xenopus	MPQMNSAGE	-----	-----	DDL	GASDEMIS	FKDEG-EQ	EENKIRENGFT
Tcf-1 Danio	MPQLNGGGG	-----	-----	DDL	GANDEMI	AFKDEG-EQ	EENKIRESAFT
Tcf Amphioxus	MPQLNGS	-----	-----	GGDDL	GAGDETI	SFKDEG-EQ	EENKSAENVS
Tcf Strongylocentrotus	MPQQHSR	-----	-----	GGEDD	GGPPDET	KTYHTEG-EQ	EENKASENVVGP
Tcf Hydra	MPQLPTSTA	-----	-----	EYGA	EDEIKLYT	QEQE-EQ	EENKSDTSTVD
Tcf Ciona	MPQLNS	-----	-----	DEA	ANDEPKTY	NDERVGE	EENKRWGHEND
Tcf Amphimedon	-----	-----	-----	MAAT	SAQPPPG	TGQPPPP	GAAVVSSN
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis	-----	-----	-----	MM	ADEELG	DEVKVF	RRDEDEDADDDPMISGETS
Tcf (Pangolin) Drosophila	-----	LVEEK	SSLIDL	TESEK	-----	-----	HKISRPHDSVPVFNKLD
Tcf (Pangolin) Tribolium	-----	LTEEK	SSLIDL	TESEK	SGGS	-----	YSSNKNVSRADHSPVFGKVEVVP
Lef-1 Homo	EEGDLADIK	SSLVNESE	II--PA	-----	-----	-----	SNGHEVAROQAT--SQEPYHDKA
Lef-1 Mus	EEGDLADIK	SSLVNESE	II--PA	-----	-----	-----	SNGHEVVRQAPS--SQEPYHDKA
Lef-1 Gallus	EEGDLADIK	SSLVNESE	IA--PG	-----	-----	-----	SGGHEVSRQTP--AQDSYHDKG
Lef-1 Xenopus	EEGDLADIK	SSLVNETE	II--PS	-----	-----	-----	SNSHEISRRRQ--DSYHENP
Lef-1 Danio	EEGDLAEIK	SSLVNETE	IS--PN	-----	-----	-----	SNSHDAARQSQI--TPDSYHEKH
Tcf-4 Mus	AERDLADV	KSSLVNESE	TNQNSS	-----	-----	-----	SDSE-AERRPP--PRSEFRDKS
Tcf-4 Homo	AERDLADV	KSSLVNESE	TNQNSS	-----	-----	-----	SDSE-AERRPP--PRSEFRDKS
Tcf-4 Danio	AERDLADV	KSSLVNESE	TNQNSS	-----	-----	-----	SDSE-AERRPP--PRSEFRDKT
Tcf-4 Xenopus	AERDLADV	KSSLVNESE	TP--HSS	-----	-----	-----	SDSE-TEERRPP--PRSEFRDKS
Tcf-3 Homo	AQRDLDEV	KSSLVNESE	NQ--SSS	-----	-----	-----	SDSE-AERRPQ--PVRDTFQ--KP
Tcf-3 Mus	AQRDLDEV	KSSLVNESE	NQ--SSS	-----	-----	-----	SDSE-AERRPQ--PARDAFQ--KP
Tcf-3 Xenopus	AEGDLADV	KSSLVNESE	NH--SSD	-----	-----	-----	SDSE-VERRP--PPRETFE--KP
Tcf-3 Danio	SERDLDEV	KSSLVNESE	NN--SSS	-----	-----	-----	SDSEQTDRRRPRPRPDLESYE--KQ
Tcf-1 Mus	ERDLAEL	KSSLVNESE	GAAAGAGVPG	PGV	RVHGEA	EAGAPEALGR	EHTSQRFLFPDKL
Tcf-1 Homo	ERDLAEL	KSSLVNESE	GAAAGAGIPGV	PGAGAG	-----	-----	ARGEAALGR--EHAAQRLFPDKL
Tcf-1 Gallus	ERDLADL	KSSLVNESE	GSGSP	-----	-----	-----	AAAADPEAIRR--VQDPQRVYQEKL
Tcf-1 Xenopus	ERDLADL	KSSLVNESE	VASHPR	-----	-----	-----	VPETHPEAIRR--AQDVQVLVYQDKF
Tcf-1 Danio	ESDLADL	KSSLVSETE	ISQSP	-----	-----	-----	AVIRRGQDEQRIYSDKR
Tcf Amphioxus	NDLSDI	KSSLANESE	SS	-----	-----	-----	QSGAVPSEGSK--PPLQSYPRD
Tcf Strongylocentrotus	DSFDHL	NDVKS	SLIDEGESV	SQKG	-----	-----	SSSQRNKRLSSSGYGDHSEKDRHKK
Tcf Hydra	VVNDI	KDDL	NEDGPD	TRK	-----	-----	-----
Tcf Ciona	ELDNI	KGDL	VEEEDRD	PHRRQS	-----	-----	YDHPAKVSSRGHRDSEAHRNNE
Tcf Amphimedon	GDPEL	ATSDE	VKEYCHE	GE	-----	-----	KTEHLNSMDLHDIKTELEKD
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis	EQQL	ADDK	KEAV	MEALD	GAGR	-----	-----
Tcf (Pangolin) Drosophila	HAPSFN	MGYLV	SP-----	YSYANG	SPSGL	PVTMANK	IGLP
Tcf (Pangolin) Tribolium	HTSSFN	MGYLV	SP-----	YSYANG	AAGPI	VPVSM	ASKMGLAPTGHPGAAL
Lef-1 Homo	REHPDD	-GKHPD	G-----	GLYNK	GPSYSS	YSYIM	PNMNDPYMSNGSLSP
Lef-1 Mus	REHPDE	-GKHPD	G-----	GLYNK	GPSYSS	YSYIM	PNMNSDPYMSNGSLSP
Lef-1 Gallus	REHPDE	-GKHPD	G-----	GLYK	GPSYSS	YSYIM	PNMNDPYMNGSLSP
Lef-1 Xenopus	REHPED	AGKHPD	G-----	SLYK	GPSY	TGYP	SYIMPNMNEPYMNGSLSP
Lef-1 Danio	RDPDD	-GKLQD	G-----	LYSK	GHPY	PSY	PGYIMTMNNEPYMNGSLSP

Tcf-4 Homo RESLEEAAK-RQD-----GGLFKGPPYPGY-P-FIMIPDLTS-PYLPNGSLSP-TAR-----  
 Tcf-4 Danio RESLEEAAK-RQD-----GGLFKSPPYPGY-P-FIMIPDLTS-PYLPNGSLSP-TAR-----  
 Tcf-4 Xenopus RDSLEDAAK-RPD-----GGLFKGPTYGGYP-FIMIPDLSS-PYLPNGSLSP-TARQCVN  
 Tcf-3 Homo RDYFAEVR-RPQ-----SAFFKGGPPYPGY-P-FLMIPDLSS-PYLSNGPLSPGGAR----  
 Tcf-3 Mus RDYFAEVR-RPQ-----GAFFKGGAYPGYP-FLMIPDLSS-PYLSNGPLSPGGAR----  
 Tcf-3 Xenopus RDYLSEAFRRQD-----AAFFKGGPPYAGYP-FLMIPDLGG-HYLPNGALSP-SAR-----  
 Tcf-3 Danio REYFAEALRRQD-----GGFFKGGPPYAGYP-FLMIPDITN-PYLSNGSLSP-STR-----  
 Tcf-1 Mus PESLEDG-LKAPEC---ASGMYKETVYSAFN-LLMP----YPP--ASGAGQH-----  
 Tcf-1 Homo PEPLEDG-LKAPEC---TSGMYKETVYSAFN-LLMH----YPP--PSGAGQH-----  
 Tcf-1 Gallus PDHMDDAGMKHQD-----PGMYKGSAYS GYP-FLML----SDPYLPNGSMSP-----  
 Tcf-1 Xenopus SAHMEDG-IKHQD----EGMYKGSYYPGY-P-FLML----SDPYLSNGSVSA-----  
 Tcf-1 Danio -EHLDDV-PKHHD----GGMYKAP-YS GYP-FLML----PEPYLPNGPVSP-----  
 Tcf Amphioxus SRRGDEGSKAESV----PVVSRGPAYLTPG-GVIVSNMGVYPH-PNGSLAA-----  
 Tcf Strongylocentrotus LHSVSDGSKLDHIARFTPYSSLAFIANAGYPNGSMVGGPGITPKCGVNPVFP-----  
 Tcf Hydra ---PNDDMYHGDSMRYGKSEVGHG IYGSPA AVIVTPQNR YIEQHQSYRHG-----  
 Tcf Ciona RDLPNDISSSRRTTFPYLQODIGAALAOQSLLSNVGLPSSSQVPYNPYAYH-----  
 Tcf Amphimedon AEESEPTTSSNN-----NPAATFNTSPSTTVINHTLQFRPTVVOQMVYA-----  
 Tcf (Pop-1) Caenorhabditis -NPSIDVLKSAFP-----KVPEMSPSFP-----  
  
 Tcf (Pangolin) Drosophila -----PFFCHNADPLSTPP  
 Tcf (Pangolin) Tribolium -----PFFCHNGDPLSQPP  
 Lef-1 Homo -----PIPRTSNKVPVQPS  
 Lef-1 Mus -----PIPRTSNKVPVQPS  
 Lef-1 Gallus -----PIPRTSNKVPVQPS  
 Lef-1 Xenopus -----PIPRTSNKVPVQPS  
 Lef-1 Danio -----PIPRTSNKVPVQPS  
 Tcf-4 Mus -----TYLQMKWPLLDVQAGSLQSRQTLKDARSPSPAHIVSNKVPVQHP  
 Tcf-4 Homo -----TYLQMKWPLLDVQAGSLQSRQALKDARSPSPAHIVSNKVPVQHP  
 Tcf-4 Danio -----TYLQMKWPLLDVQAGSLQSRQALKDARSPSPAHIVSNKVPVQHP  
 Tcf-4 Xenopus VPLDLHLASCCSPFMQYLMKWPLLDVQAGSLQGRQGMKDRSPSPAHIVSNKVPVQHP  
 Tcf-3 Homo -----TYLQMKWPLLDVPS-----SATVKDTRSPSPAHLS-NKVPVQHP  
 Tcf-3 Mus -----TYLQMKWPLLDVPS-----SATVKDTRSPSPAHLS-NKVPVQHP  
 Tcf-3 Xenopus -----AYLQMKWPLLDSPS-----TAGLKDARSPSPAHLS-NKVPVQHP  
 Tcf-3 Danio -----TYLQMKWPLLDVPA-----SAALKDSRSPTPGHLS-NKVPVQHP  
 Tcf-1 Mus -----PQPQPPLHKNP  
 Tcf-1 Homo -----PQPQPPLH-KA  
 Tcf-1 Gallus -----LSNKVPVQPS  
 Tcf-1 Xenopus -----LSNKVPVQPS  
 Tcf-1 Danio -----PSNKVSVVQ--  
 Tcf Amphioxus -----SATSNKVSVVHGP  
 Tcf Strongylocentrotus -----SPLRLGEGQKMPVLHFG  
 Tcf Hydra -----NTANSQPYANPF  
 Tcf Ciona -----HLLYGTSP-SD  
 Tcf Amphimedon -----ANGFMPFATGT  
 Tcf (Pop-1) Caenorhabditis -----GLMSHFSPG  
  
 Tcf (Pangolin) Drosophila PAHCGIPPYQLDPK---MGLTRPALYPFAGGQYPYPMSSDMSQVAS-WHTPSVYSASS  
 Tcf (Pangolin) Tribolium PAHMGIPPYQLDSKTAGSMGLTRPPMYPPFAGQYPYPILSPEMSQVAASWHTPSMYPLSP  
 Lef-1 Homo HAVHPLTPLITYSDEHFS--PGSHPSHIP----SDVNSKQ-GMSRHPPAPDIPTFYPLSP  
 Lef-1 Mus HAVHPLTPLITYSDEHFS--PGSHPSHIP----SDVNSKQ-GMSRHPPAPEIPTFYPLSP  
 Lef-1 Gallus HAVHPLTPLITYSDEHFS--PGSHPSHIP----SDVSSKQ-GMSRHPPAPDIPTFYPLSP  
 Lef-1 Xenopus HAVHPLTPLITYSDEHFA--PGAHPSHLP----SDVNTKQ-GMHRHQGPDLP TFYPLSP  
 Lef-1 Danio HAVHPLTPLITYSDEHFA--PGPHSGHHP----QDVNPKQAGMPRHHPGPDIPNFYPLSP  
 Tcf-4 Mus HHVHPLTPLITYSNEHFT--PGNPPHLP----ADV-DPKTGIPRPPHPDIPSYPLSP  
 Tcf-4 Homo HHVHPLTPLITYSNEHFT--PGNPPHLP----ADV-DPKTGIPRPPHPDIPSYPLSP  
 Tcf-4 Danio HHVHPLTPLITYSNEHFT--PGNPPHLP----GDV-DPKTGIPRPPHPDIPSYPLSP  
 Tcf-4 Xenopus HHVHPLTPLITYSNEHFT--PGNPPHLP----ADV-DPKTGIPRPPHPDIPSYPLSP  
 Tcf-3 Homo HHMHPLTPLITYSNDHFS--PASPPHLS----PEI-DPKTGIPRPPHPSELSPYPLSP  
 Tcf-3 Mus HHMHPLTPLITYSNDHFS--PASPPHLS----PEI-DPKTGIPRPPHPSELSPYPLSP  
 Tcf-3 Xenopus HHMHPLTPLITYSNEHFS--PGTTPGHLS----PEI-DPKTGIPRPPHPSELSPYPLSP  
 Tcf-3 Danio HHVHPLTPLITYSNEHFS--PGTTPSHLS----PEILDPKTGIPRTPHPSELSPYPLSP  
 Tcf-1 Mus GQPPHGVPLQSLPLYEHFS--S-PHPTPAP----ADI-SQKQGVHRPLQTPDLSGFYSLTS  
 Tcf-1 Homo NQPPHGVPLQSL-LYEHFN--S-PHPTPAP----ADI-SQKQ-VHRPLQTPDLSGFYSLTS  
 Tcf-1 Gallus HGVHPLTPLIPYSNDHFS--HGSHSPLP----ADI-SQKQAVHRPSQTSIDIPGFYPLPP  
 Tcf-1 Xenopus HGVH---PLIPYNSEFS--HGSHSPLP----VDL-NQKQGVHRPSQTPDVPTFYPLSP

Tcf Amphioxus PHPGPLTQLMMYSNEHFA--PGTPPHIGVPP-NSIEVDPKTGIPRPRHPADLPMPYAIPP  
Tcf Strongylocentrotus AYPPSLAQLMMYQOEYHSHSPGTPPPHVR---GLEVDSKTGILRRSHS-EISPYHPLSP  
Tcf Hydra ISTRP--PLYTRDERPYDHP-----SWALTQP-----DGPPQYPLPY  
Tcf Ciona IDTKPGIPHGARDVPAMYALPQLGQIPHPL--TPWGPTSPTFMCTASAMAGMLRYPYYP  
Tcf Amphimedon SLYRVPKMEVQGTATDWT-----KAAANAAAATQGISIPYGYTG  
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis YSAAALPMFPLFMNYPYAAALRSPSLMFP-----MGAMSPTFMFPSPVYVY

Tcf (Pangolin) Drosophila ---FRTPYPSSLPINTT-LASDFP-----FRFSPS-L  
Tcf (Pangolin) Tribolium GAGFRSPYPSALPISTSSLPDF-----YRFSPTGL  
Lef-1 Homo GGVGQITPPLGWQGPVYP-----ITGGFRQPYSSLSVDTSMS----RFSHH  
Lef-1 Mus GGVGQITPPIGWQGPVYP-----ITGGFRQPYSSLSGDTSMS----RFSHH  
Lef-1 Gallus GGVGQITPPLGW-----FSHH  
Lef-1 Xenopus GSVGQMTPLGW-----YPHH  
Lef-1 Danio GGVGQMTPLGW-----FSHH  
Tcf-4 Mus GTVQGI PHPLGWLVPQQGPVY-----PITGGFRHPYPTALT VNASMS----RFPFH  
Tcf-4 Homo GTVQGI PHPLGWLVPQQGPVY-----PITGGFRHPYPTALT VNASMS----RFPFH  
Tcf-4 Danio GTVQGI PHPLGWLVPQQGPVY-----PITGGFRHPYPTALT VNASMSLLSSRFPPH  
Tcf-4 Xenopus GAVGQI PHPLGWLVPQQGPVY-----PITGGFRHPYPTALT VNASMSFLLSSRFPPH  
Tcf-3 Homo GAVGQI PHPLGWLVPQQGPVY-----SLPPGGFRHPYPTALT VNASMSLLSSRFSPH  
Tcf-3 Mus GAVGQI PHPLGWLVPQQGPVY-----SLPPGGFRHPYPTALT VNASMSLLSSRFSPH  
Tcf-3 Xenopus GAVGQI PHPLGWLVPQQGPVY-----SIPPGGFRHPYPTALT VNASMSLLSSRFSPH  
Tcf-3 Danio GAVGQI PHPLGWLVPQQGPVY-----SIPPGGFRHPYPTALT VNASMSLLSSRFSPH  
Tcf-1 Mus GSMGQLPHTVSWSPPLYPL-----SPSCGYRQHPAPTAAPGAPYPRFTHP  
Tcf-1 Homo GSMGQLPHTVSW-----FTHP  
Tcf-1 Gallus AGVGQITPSMGW-----FTHP  
Tcf-1 Xenopus GGVGQISPSMGW-----FPHH  
Tcf-1 Danio ---GQITPSMNW-----FSHS  
Tcf Amphioxus NQLPQLGPSYKIEEYHSQALWQSQGVYPI SAAGYRHPYPTAI AVNATNMP-----RYP  
Tcf Strongylocentrotus SSLGTHPLEVYNMSWPGQPFYP-----LTSSALRSPYSSSLAVSPAS-----MARL  
Tcf Hydra G---AMQKYFRYP-----PGM  
Tcf Ciona GPQFSSASAMTGITP-----FPM  
Tcf Amphimedon GFVSGLPIDQSLR-----PA  
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis AATAAAAQKHFFEN-----

Tcf (Pangolin) Drosophila LPSVHATSHH--VINAHSAIVGVSSKQECGVQDPTTNNRYPRNLEAKHTSNAQSNESKET  
Tcf (Pangolin) Tribolium IPPHPGLSPHPPHLSHPAIVTPGPKQELPDNLNHLNLTIKKMPIAIVAPFTTIVEPKLN  
Lef-1 Homo MIP-GPPGP-HTTGIPHAI VTPQVKQEHPHDSDLMHVKPKQEHQRKEQEPKR-----  
Lef-1 Mus MIP-GPPGP-HTTGIPHAI VTPQVKQEHPHDSDLMHVKPKQEHQRKEQEPKR-----  
Lef-1 Gallus MIP-GPPGP-HTTGIPHAI VTPQVKQEHPHDSDLMHVKPKQEHQRKEQEPKR-----  
Lef-1 Xenopus MVS-GPPGH-HATGIPHAI VNPQVKQEHPHDNDLMMMKPHHEQRKEQEPKR-----  
Lef-1 Danio MVP-GPPGP-HATGIPHAI VNPQVKQEH---DTDLMMMKPKQEHQRKEQEPKR-----  
Tcf-4 Mus MVP-PHHTL-HTTGIPHAI VTPVKQESSQSDVGLSHSSKHQDQSKKEEKKK-----  
Tcf-4 Homo MVP-PHHTL-HTTGIPHAI VTPVKQESSQSDVGLSHSSKHQDQSKKEEKKK-----  
Tcf-4 Danio MVP-PHSL-HTTGIPHAI VTPNVKQESSHSDIGLSNSSKHQDQSKKEEKKK-----  
Tcf-4 Xenopus MVP-PHSL-HTTGIPHAI VNPVKQESSQSDMGLSHSSKHQDQSKKEEKKK-----  
Tcf-3 Homo MVAPAHPL-PTSGIPHAI VSPIVKQEPAPPSPSLSPAVSVKSPVTVKKEEKK-----  
Tcf-3 Mus MVAPAHPL-PTSGIPHAI VSPIVKQEPAPPSPSLSPAVSAKSPVTVKKEEKK-----  
Tcf-3 Xenopus MVPPPHSL-HTSGIPHAI VSPIVKQEPSSGNISPNLSTKSNVVKKEEKK-----  
Tcf-3 Danio MVPHPHGL-HQTGIPHAI VSPAIVKQEPNGESPSNSTHGKPSVPVVKKEEKK-----  
Tcf-1 Mus SLMLGSGVPGHPAAI PHPAIVPSSGKQELQFYDRNLK---TQAEPKAEKEAKK-----  
Tcf-1 Homo SLMLGSGVPGHPAAI PHPAIVPSSGKQELQFDRNLK---TQAEPKAEKEAKK-----  
Tcf-1 Gallus -LMLGSGM--HTTGIPHAI VPHSGKQEMEHYDRNMK---PQPEPKREKEAKK-----  
Tcf-1 Xenopus -LMLSPSM--HTTGIPHAI IPHSGNKDMDIYERNM---QHSEPKREKEPKK-----  
Tcf-1 Danio -LMLQSGM--HTTGIPHAI VPPSGKQEHDFDRSIYN--KSHAEAKREKEPKK-----  
Tcf Amphioxus VLQHPHHPGMPPTGIPHAI VSPHG---MNLKHDPSQMHQKQDQKKEPEKK-----  
Tcf Strongylocentrotus GPSPIGAGPI PVGSLPHFLMHP IGSQQHDAAQQSNDRHQKEKEKLAQEAANK-----  
Tcf Hydra AGNVPFYSSGYPMAGRSTKEMK-----  
Tcf Ciona VQPHPHVSGMHPTMI PHPAMALPGHLPNGHATSKSNPDKKNYGHEGGPKREKGDKPS--  
Tcf Amphimedon AYPFLMPTGQYVTPMPYQQLATTFGTAAPNAAVQPHS---GITPQKKEK-----  
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis MAPLNMRAHPMNMGMPPYMHPSMAPQNVDRRAQGGGKAKKD-----

Tcf (Pangolin) Drosophila TNDKKKPHIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHEL--REE  
Tcf (Pangolin) Tribolium KHEDLPQDLKMLKSNNDQCLDLSKTETNLEKS--NLNHNEQLRKYLCKNEDETKNHYS  
Lef-1 Homo -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRANVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS--REE  
Lef-1 Mus -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRANVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS--REE

Lef-1 Xenopus -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRANVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Lef-1 Danio -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRANVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf-4 Mus -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf-4 Homo -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf-4 Danio -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf-4 Xenopus -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf-3 Homo -----PHVKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRKWHNLS-REE  
Tcf-3 Mus -----PHVKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRKWHNLS-REE  
Tcf-3 Xenopus -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf-3 Danio -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf-1 Mus -----PVIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf-1 Homo -----PTIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf-1 Gallus -----PTIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf-1 Xenopus -----PAIKKPLN---AFMLYMKEMRANVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf-1 Danio -----PVIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf Amphioxus -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf Strongylocentrotus -----QOHIKKPLN---AFMLYMKEMRASVVKEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf Hydra -----RPHVKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf Ciona -----RPYVKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf Amphimedon -----PHIKKPLN---AFMLYMKEMRAKVVAEC--TLKESAAINQILGRRWHALS-REE  
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis -----DHVKKPLN---AFMWFMKENRKALLEEIGNNEKQSAELNKLGRKWHALS-REE

Tcf (Pangolin) Drosophila QSKYYEKARQERQLHMLYPGWSARDNYG-YVSKKKRKRDRSTTDSGNN-----  
Tcf (Pangolin) Tribolium KNTYNEQGNLADLYKSLGP-DSVYSFIN-NLTRKLLSAWYMTVLGHQN-----  
Lef-1 Homo QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Lef-1 Mus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESTSGTG-----  
Lef-1 Gallus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Lef-1 Xenopus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESTSGAGP-----  
Lef-1 Danio QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-4 Mus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-4 Homo QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-4 Danio QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-4 Xenopus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-3 Homo QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-3 Mus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-3 Xenopus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-3 Danio QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-1 Mus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-1 Homo QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-1 Gallus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-1 Xenopus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf-1 Danio QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf Amphioxus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf Strongylocentrotus QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf Hydra QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf Ciona QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf Amphimedon QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----  
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis QAKYYELARKERQLHMLYPGWSARDNY---GKKKKRKRKLEQESASGTG-----

Tcf (Pangolin) Drosophila -----MKKCRARFGLDQSQWCKPCRK---KKCIRYME  
Tcf (Pangolin) Tribolium -----PYLALPKTDSDDNRLLNLLDKKPYSTYKPTNFD  
Lef-1 Homo -----PRMTAAYI-----  
Lef-1 Mus -----PRMTAAYI-----  
Lef-1 Gallus -----PRMTAAYI-----  
Lef-1 Xenopus -----PRMTAAYI-----  
Lef-1 Danio -----QRMKTAYI-----  
Tcf-4 Mus -----FLNPCLSLPPI TD--LSAPKKCRARFGLDQNNWCGPCRKCKCVR  
Tcf-4 Homo -----FLNPCLSLPPI TD--LSAPKKCRARFGLDQNNWCGPCRKCKCVR  
Tcf-4 Danio -----FPNPCLSLPPI TD--LSAPKKCRARFGLDQNNWCGPC  
Tcf-4 Xenopus -----YLNPCSLPPI TEGKRSAFATYKVKAAALRPLQMEAY  
Tcf-3 Homo -----VQEAEGALASKSK--KPCVQYLPPEKPCDSPASSHGSM  
Tcf-3 Mus -----IQEAEGALASKSK--KPCIQYLPPEKPCDSPASSHGSA  
Tcf-3 Xenopus -----YTKTK--KMCVQHFPSDKSCDSPASSHGSM  
Tcf-3 Danio -----FSPQPK--KQCVPYLSSEKMCDSPTSSHGSM  
Tcf-1 Mus -----RNAFGTYPEKAAA-PAPFLPMTVL-----

```

Tcf-1 Gallus -----PKKCRARFGLNQOTDWCGPCSFLQOQFQLLSKYLFE
Tcf-1 Xenopus -----PKKCRARFGLNQOTDWCGPCR-----
Tcf-1 Danio -----PKKCRARFGLNQOTDWCGPCR-----
Tcf Amphioxus -----PKKCRARFGLDQQQAWCKPCRYGADEWR-----
Tcf Strongylocentrotus -----TPKKCRARFVGDQDFWCKPCRRKKKCIR-----
Tcf Hydra -----KCRARYGLDRQEQWCKPCRRKKKCIRFIIGADG
Tcf Ciona -----KCRAVFGLQEQQLWCAPCRRKKKCIRYQHDDDE
Tcf Amphimedon EDANKSTEEPPLKKVLRVEDNNLDSPRKCRARFGMDQQQMWCPCRRKKKCIR-----
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis -----CRARFVGNNTMWCCKCRKKKCEYATDRS--

Tcf (Pangolin) Drosophila ALNNGNGPAED--GSCFDEHGSQSLSDDEDDYDDDKLGGSCGSADETNIKIEDEDESLSNQS
Tcf (Pangolin) Tribolium ALIVNEMRSEKPEKSKKDKKGSQVDHKNLGD SKNNQDGNNGEKKPHIKKPLNAFMLYMK
Lef-1 Homo -----
Lef-1 Mus -----
Lef-1 Gallus -----
Lef-1 Xenopus -----
Lef-1 Danio -----
Tcf-4 Mus YIQEGSCLSPSSDGSLLDSPPSPHLLGSPPODAKSQTEQTQPLSLSLKPDPLAHLMS
Tcf-4 Homo YIQEGSCLSPSSDGSLLDSPPSPNLLGSPPRDAKSQTEQTQPLSLSLKPDPLAHLMS
Tcf-4 Danio -----SPNLLS-----
Tcf-4 Xenopus -----
Tcf-3 Homo -----LDSPATPSAALASPAAPAATHSEQAQPLSLTTKPETRAQLAL
Tcf-3 Mus -----LDSPATPSAALASPAAPAATHSEQAQPLSLTTKPEARALAL
Tcf-3 Xenopus -----LDSPATPSAALASPAAPAATHSEQAQPLSLTTKPEARALS--
Tcf-3 Danio -----LDSPATPSAALASPAAPAATHSEQAQPLSLTTKPEGRAHNN--
Tcf-1 Mus -----
Tcf-1 Homo -----
Tcf-1 Gallus FLKPL-----
Tcf-1 Xenopus -----
Tcf-1 Danio -----
Tcf Amphioxus -----ESPILFCFCLPVWNGGFKAQALPNGSVV-----
Tcf Strongylocentrotus -----YISSDENDHGRNDDMDDDDSSLSRRKSWLKHGGTQH--
Tcf Hydra EATEVPEK--DQRSDSDDNQDKSDESFSKEHLHGLANITTLSSD-----
Tcf Ciona DDSDDSDSLQYQTS PGDNIGPNYDDPSVTSQLSSSSAVSANNQSGSHTTGGYSPNRGPI
Tcf Amphimedon -----VEDDGSRDSTELDDIQTEQSINDNS-----
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis -----GGSDITDSQDGRGTSGAYSSSSSESPSPKANAGIALTTQQQQA

Tcf (Pangolin) Drosophila MPSPGCLSGLSSLQSPSTTMSLASPLNMNANSATNVIFPASSN-----ALLIVGADOPT
Tcf (Pangolin) Tribolium EMRAKVVAECTLKESAAINQILGRRWALGREEQAKYVELARREROLHMQLYPDWSSRAN
Lef-1 Homo -----
Lef-1 Mus -----
Lef-1 Gallus -----
Lef-1 Xenopus -----
Lef-1 Danio -----
Tcf-4 Mus MPPPPALLLAEAAHGKASALCPNGALDLPPAALQPSMVPSSSLAQP---STSSLHSHNSL
Tcf-4 Homo MPPPPALLLAEATH-KASALCPNGALDLPPAALQP-AAPSSSIAQP---STSSLHSHSSL
Tcf-4 Danio -----FCSN-----TSSL-----
Tcf-4 Xenopus -----
Tcf-3 Homo HSA AFLSAKAAASS--SGQMSQP--PLLSRPLPLGSMPTALLASP-PSFPATLHAHQAL
Tcf-3 Mus HSA AFLSAKAAASN--SSQMSQP--PLLSRPLPLGSMPTALLTSP-PTFPATLHAHQAL
Tcf-3 Xenopus HSA AFLASKSPSSSSLSGHLPSVGSPLLSRPIPLTSS---ILSPP-GVFPS---ALQAL
Tcf-3 Danio HPHFPLPGKSSGSGS-GSSMALHS----LSRPIPTSLPPLLGNPSPFHQAALHSHHAL
Tcf-1 Mus -----
Tcf-1 Homo -----
Tcf-1 Gallus -----
Tcf-1 Xenopus -----
Tcf-1 Danio -----
Tcf Amphioxus -----
Tcf Strongylocentrotus -----
Tcf Hydra --NHVNNNTLILIDENIKDERHS-----TPPTSKSSSLVTNSNRDL
Tcf Ciona PCDRIKQEKSPPLTHEVSGQHPSPAPGSEFESTSESHSVDRAPCAKRPTSESSAAKSF
Tcf Amphimedon -----
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis AMMHTMLMQMRLGSTTGASTHVSPPLASSSAGRSPLDANASDESSEVVEEEDQIDPTVM

Tcf (Pangolin) Drosophila AQQRPTLVSTSGSSSGSTSSISTTPNTSSTVSPVTCMTG-PCLGSSQERAMMLGNRFSHL

```

Tcf (Pangolin) Tribolium	ATRGGKKRKRKQDPADGGNSMKKCRARYGLDQONQWCKPCRPREQLTWRRNFHGHRLAAR
Lef-1 Homo	-----
Lef-1 Mus	-----
Lef-1 Gallus	-----
Lef-1 Xenopus	-----
Lef-1 Danio	-----
Tcf-4 Mus	AGTQPQPLSLVTKSLE-----
Tcf-4 Homo	AGTQPQPLSLVTKSLE-----
Tcf-4 Danio	-----
Tcf-4 Xenopus	-----
Tcf-3 Homo	PVLQAQPLSLVTKSAH-----
Tcf-3 Mus	PVLQAQPLSLVTKSAH-----
Tcf-3 Xenopus	PLLQAQPLSLVTRSSD-----
Tcf-3 Danio	--LQTQPLSLVTKSVE-----
Tcf-1 Mus	-----
Tcf-1 Homo	-----
Tcf-1 Gallus	-----
Tcf-1 Xenopus	-----
Tcf-1 Danio	-----
Tcf Amphioxus	-----
Tcf Strongylocentrotus	-----
Tcf Hydra	PQVCSYS---ERTLPTLQAIETR-----
Tcf Ciona	PDVSRSSGITGGKTQPDLRNRRSNSFGNSPMPQSHLNNGGNLFSPTVLSGPRSPIGGLSS
Tcf Amphimedon	-----
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis	QQTHDMLMQESMCTI-----
Tcf (Pangolin) Drosophila	GMGLSPPVVSTSTSKSEPPFKPHPTVCNNPIFALP-SIGNCS---LNISSMPNTRSNNPIG
Tcf (Pangolin) Tribolium	SRRCYHAVAPGTDIRQSIALSRKKKCI RYMEAGDGDNDGNQSDNGLGSCGSMGDAHTPPE
Lef-1 Homo	-----
Lef-1 Mus	-----
Lef-1 Gallus	-----
Lef-1 Xenopus	-----
Lef-1 Danio	-----
Tcf-4 Mus	-----
Tcf-4 Homo	-----
Tcf-4 Danio	-----
Tcf-4 Xenopus	-----
Tcf-3 Homo	-----
Tcf-3 Mus	-----
Tcf-3 Xenopus	-----
Tcf-3 Danio	-----
Tcf-1 Mus	-----
Tcf-1 Homo	-----
Tcf-1 Gallus	-----
Tcf-1 Xenopus	-----
Tcf-1 Danio	-----
Tcf Amphioxus	-----
Tcf Strongylocentrotus	-----
Tcf Hydra	-----
Tcf Ciona	PHSNFFPHLQPYLQMSLTLAGLPPSPPLGGFMGLPGFKGISSPMGLGGAVSTGAPGEGHPG
Tcf Amphimedon	-----
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis	-----
Tcf (Pangolin) Drosophila	ANPRDINNPLSIN-QLTKRREYKNVELIEASESKTIVAHAATSI IQHVAVNGYHANHSL
Tcf (Pangolin) Tribolium	DDAESLNQSISSPGALSGLSSLTSPGGMVLPSPTSVASPSVSVASPYMLQSPLTPHEAF
Lef-1 Homo	-----
Lef-1 Mus	-----
Lef-1 Gallus	-----
Lef-1 Xenopus	-----
Lef-1 Danio	-----
Tcf-4 Mus	-----
Tcf-4 Homo	-----
Tcf-4 Danio	-----
Tcf-4 Xenopus	-----
Tcf-3 Homo	-----

```

Tcf-3 Xenopus -----
Tcf-3 Danio -----
Tcf-1 Mus -----
Tcf-1 Homo -----
Tcf-1 Gallus -----
Tcf-1 Xenopus -----
Tcf-1 Danio -----
Tcf Amphioxus -----
Tcf Strongylocentrotus -----
Tcf Hydra -----
Tcf Ciona SNASRRATSALEGKS-----
Tcf Amphimedon -----
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis -----

Tcf (Pangolin) Drosophila NSNLGHLHQLNNRTEPNRSEQTMLSVSNHVSNSSECHKESDSQAIVSSNPPNAGSSDN
Tcf (Pangolin) Tribolium DVKLPPPPPHHQP RNP-----VGTNPHDINNPLSVNQLTGQCVRNDSSDTNGKETR
Lef-1 Homo -----
Lef-1 Mus -----
Lef-1 Gallus -----
Lef-1 Xenopus -----
Lef-1 Danio -----
Tcf-4 Mus -----
Tcf-4 Homo -----
Tcf-4 Danio -----
Tcf-4 Xenopus -----
Tcf-3 Homo -----
Tcf-3 Mus -----
Tcf-3 Xenopus -----
Tcf-3 Danio -----
Tcf-1 Mus -----
Tcf-1 Homo -----
Tcf-1 Gallus -----
Tcf-1 Xenopus -----
Tcf-1 Danio -----
Tcf Amphioxus -----
Tcf Strongylocentrotus -----
Tcf Hydra -----
Tcf Ciona -----
Tcf Amphimedon -----
Tcf (Pop-1) Caenorhabditis -----

Tcf (Pangolin) Drosophila GVISVS
Tcf (Pangolin) Tribolium SIISVT
Lef-1 Homo -----
Lef-1 Mus -----
Lef-1 Gallus -----
Lef-1 Xenopus -----
Lef-1 Danio -----
Tcf-4 Mus -----
Tcf-4 Homo -----
Tcf-4 Danio -----
Tcf-4 Xenopus -----
Tcf-3 Homo -----
Tcf-3 Mus -----
Tcf-3 Xenopus -----
Tcf-3 Danio -----
Tcf-1 Mus -----
Tcf-1 Homo -----
Tcf-1 Gallus -----
Tcf-1 Xenopus -----
Tcf-1 Danio -----
Tcf Amphioxus -----
Tcf Strongylocentrotus -----
Tcf Hydra -----
Tcf Ciona -----

Tcf (Pop-1) Caenorhabditis -----

```

**Abbildung 8.1: Anlagerung der Aminosäuresequenzen verschiedener Lef/Tcfs.** Diese Anlagerung wurde von T.W. Holstein (Heidelberg) mit Hilfe des Programms ClustalW erstellt. Folgende Sequenzen wurden verwendet:

Tcf (Pangolin) *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*) gi|4033457|sp|P91943.1,  
Tcf (Pangolin) *Tribolium* (*Tribolium castaneum*) gi|86515330|ref|NP\_001034490.1,  
Lef-1 Homo (*Homo sapiens*) gi|7705917|ref|NP\_057353.1,

Lef-1 *Mus (Mus musculus)* gi|27735019|ref|NP\_034833.2,  
Lef-1 *Gallus (Gallus gallus)* gi|45384346|ref|NP\_990344.1,  
Lef-1 *Xenopus (Xenopus laevis)* gi|14279980|gb|AAK58834.1|AF287148\_1,  
Lef-1 *Danio (Danio rerio)* gi|18858965|ref|NP\_571501.1,  
Tcf-4 *Mus (Mus musculus)* gi|3123638|emb|CAA11070.1,  
Tcf-4 *Homo (Homo sapiens)* gi|170014696|ref|NP\_110383.2,  
Tcf-4 *Danio (Danio rerio)* gi|40538762|ref|NP\_571334.1,  
Tcf-4 *Xenopus (Xenopus laevis)* gi|148236191|ref|NP\_001083866.1,  
Tcf-3 *Homo (Homo sapiens)* gi|13786123|ref|NP\_112573.1,  
Tcf-3 *Mus (Mus musculus)* gi|3123638|emb|CAA11070.1,  
Tcf-3 *Xenopus (Xenopus laevis)* gi|14279982|gb|AAK58835.1|AF287149\_1,  
Tcf-3 *Danio (Danio rerio)* gi|82225333|sp|Q9YHE8.1,  
Tcf-1 *Mus (Mus musculus)* gi|148701673|gb|EDL33620.1,  
Tcf-1 *Homo (Homo sapiens)* gi|28981371|gb|AAH48769.1gi|28981371|gb|AAH48769.1,  
Tcf-1 *Gallus (Gallus gallus)* gi|21666820|gb|AAM73851.1|AF454504\_1HMG,  
Tcf-1 *Xenopus (Xenopus laevis)* gi|395061|gb|AAO23662,  
Tcf-1 *Danio (Danio rerio)* gi|59933276|ref|NP\_001012389.1,  
Tcf *Amphioxus (Branchiostoma floridae)* gi|73537138|gb|AAZ77711.1,  
Tcf *Strongylocentrotus (Strongylocentrotus purpuratus)* gi|NP\_999640.1. NM\_214475.2.,  
Tcf *Hydra (Hydra magnipapillata)* gi|10178639|gb|AAG13664.1|AF271696\_1,  
Tcf *Ciona (Ciona savignyi)* gi|15706332|dbj|BAB68354.1,  
Tcf *Amphimedon (Amphimedon queenslandica)* gi|308194267|gb|ADO16566.1,  
Tcf (Pop-1) *Caenorhabditis (Caenorhabditis elegans)* gi|71992624|ref|NP\_491053.3.

## **Danksagung**

Zuallererst danke ich Frau Prof. Dr. Wedlich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit, für ihre Unterstützung, Förderung und konstruktive Kritik.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. Dietmar Gradl für die Bereitstellung des interessanten Themas. Ohne seinen unerschütterlichen Optimismus, seine Motivation und sein Engagement wäre diese Arbeit so nicht zustande gekommen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Holger Puchta für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Meiner Mitstreiterin Dagmar Fichtner danke ich für die netten Püschchen und ganz besonders für all ihre Hilfe in allen Lebens-, Arbeits- und Gefühlslagen.

Martina Schneider, Sinem Engin, Barbara Jung, Christina Deichmann, Bianca Kraft, Veronika Wallkamm, Karolin Rahm, Monika Dicker, Claudia Winter, danke ich für die netten Gespräche, unterhaltsamen Pausen und den Mädels im Besonderen für die schnelle Aufnahme in ihren GGC Club. Ohne euch wäre es nur Arbeit gewesen.

Ein großes Dankeschön gilt meinem Mann und meiner Familie für ihre Unterstützung, den Zuspruch und die offenen Ohren.

Und natürlich danke ich meiner stets treuen Weggefährtin Jasmin fürs immer da sein, immer helfen und immer zuhören.

---

## Publikationen

### I. Veröffentlichungen

König, S.F., **Brentle, S.**, Hamdi, K., Fichtner, D., Wedlich, D., Gradl, D. (2010). En2, Pax2/5 and Tcf-4 transcription factors cooperate in patterning the Xenopus brain. *Dev. Biol.* **340**, 318-28.

**Klingel, S.**, Morath, I., Strietz, J., Menzel, K., Holstein, T.W., Gradl, D. (2012). Subfunctionalization and neofunctionalization of vertebrate Lef/Tcf transcription factors. *Dev. Biol.* revised version eingereicht.

### II. Poster

**Brentle, S.**, Gradl, D. "Conserved and non-conserved functions of the Lef/Tcf transcription factors" Mechanisms, functions and evolution of Wnt-signaling pathways, 1st FOR 1036 Retreat, Mossautal-Güttersbach, Germany. (2009)

**Klingel, S.**, Gradl, D. "Conserved and non-conserved functions of the Lef/Tcf transcription factors" 1st Wnt Symposium, FOR 1036 *Mechanisms, functions and evolution of Wnt-signaling pathways*, Heidelberg, Germany. (2010)

**Klingel, S.**, Gradl, D. "Conserved and non-conserved functions of the Lef/Tcf transcription factors" 2nd Wnt Symposium, FOR 1036 *Mechanisms, functions and evolution of Wnt-signaling pathways*, Rastatt, Germany. (2011)

**Klingel, S.**, Gradl, D. "Conserved and non-conserved functions of the Lef/Tcf transcription factors" Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists, Dresden, Germany. (2011)

### III. Vorträge

**Brentle, S.**, Gradl, D. "Conserved and non-conserved functions of the Lef/Tcf transcription factors" Mechanisms, functions and evolution of Wnt-signaling pathways, 1st FOR 1036 Retreat, Mossautal-Güttersbach, Germany. (2009)

**Klingel, S.**, Gradl, D. "Conserved and non-conserved functions of the Lef/Tcf transcription factors" 1st Wnt Symposium, FOR 1036 *Mechanisms, functions and evolution of Wnt-signaling pathways*, Heidelberg, Germany. (2010)

## **Lebenslauf**

### **I. Persönliche Daten**

Name: Susanne Klingel (geborene Brentle)  
Geburtsdatum: 03.11.1983  
Geburtsort: Pforzheim  
Familienstand: verheiratet

### **II. Schulausbildung**

1990-1994 Tannberg-Grundschule, Unterreichenbach  
1994-2000 Hebel-Gymnasium, Pforzheim  
2000-2003 Johanna-Wittum-Schule, Pforzheim

### **III. Studium**

10/2003-02/2009

Studiengang Diplom-Biologie, Universität Hohenheim

Hauptfach: Genetik

Nebenfächer: Medizinische Mikrobiologie und Virologie

Diplomarbeit

06/2008-02/2009

„Molekulare Analyse zum Aufbau des Repressor- bzw. Aktivatorkomplexes bei der Notch- Signaltransduktion“

Institut für Genetik (240), Universität Hohenheim

### **IV. Promotion**

Seit 03/2009

„Konservierte und nicht-konservierte Funktionen der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren“

Zoologisches Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Campus Süd