



Institut für Zell-und Entwicklungsbiologie  
Direktor: Prof. Dr. Doris Wedlich

# **Alternative Varianten des Transkriptionsfaktors TCF4 in *Xenopus laevis***

## **Diplomarbeit**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DIPLOM BIOLOGE (Dipl. Biol)

Vorgelegt der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften Universität Karlsruhe

von

**Kaga Gomarteli**

Karlsruhe, 18. May 2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie der Karlsruher Institut für Technologie (KIT) vom 08. August 2011 bis zum 18. May 2012 unter Betreuung von PD Dr. habil. Dietmar Gradl angefertigt.

Abgabe der Arbeit: 18. Mai. 2012

Erstprüfer: Dr. habil. Dietmar Gradl  
Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Karlsruhe.

Zweitprüfer: Prof. Dr. Martin Bastmeyer  
Institut für Zell- und Neurobiologie, Universität Karlsruhe.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Diplomarbeit selbständig unter Anleitung verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Karlsruhe, 18. Mai 2012

Kaga Gomarteli

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank an Dr. Dietmar Gradl, dem ehrgeizigen Wissenschaftler und hervorragenden Mentor, für die Überlassung eines so spannenden Diplomprojekts aussprechen. Ohne seine fachliche Kompetenz und persönlichen Fähigkeiten hätte diese Arbeit in vorgelegter Form nicht zustande kommen können.

Frau Prof. Dr. Doris Wedlich danke ich für die Möglichkeit, dass sie es mir ermöglichte den größten Teil meines Diplomstudiums an ihrem Institut anzufertigen.

Ein Dank an Herr Prof. Dr. Martin Bastmeyer für die Übernahme des Koreferats.

Ein Dank gilt auch Herr Prof. Dr. Peter Nick, dass er mir ein Diplomstudium an der Universität Karlsruhe ermöglichte.

Einen weiteren Dank an Dr. Almut Köhler, Dr. Jubin Kashef, Dr. Bianca Kraft, Dr. Dagmar Fichtner, Dr. Martina Schneider, Dr. Susanne Klingel, Dr. Christina Deichmann, Karolin Rahm, Claudia Winter, Veronika Wallkamm, Rauh Langhe, Eria Becker, Laura Krämer, Julia Zeisluff, Isabell Kiefer, Jan Glüsing, Monika Diker, Chaolie Huang, Chorong Kim, Sabine Fuhr und Thomas Steg.

Mein ganz besonderer Dank an Tamuna, Datschi, Ketu, Thea und Angehörigen die mich während des Studiums unterstützt haben.

## Abkürzungen

Neben den verwendeten SI-Einheiten werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

A/P	<i>Anterior/Posterior</i>
Abb.	<i>Abbildung</i>
AP	<i>Alkalische Phosphatase</i>
APBS	<i>Amphibian PBS</i>
Arm	<i>Armadillo (Drosophyla <math>\beta</math>-catenin)</i>
As	<i>Aminosäure</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCBD	<i>Beta-Catenin Bindungsdomäne</i>
BCIP	<i>5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
CaMKII	<i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II</i>
CK1/2	<i>Casein kinase 1/2</i>
CMV	<i>Cytomegalo-Virus</i>
CRD	<i>Context-dependent regulatory domain</i>
CtBP	<i>C-terminal binding protein</i>
DAPI	<i>2-phenylindole-4',6-dicarboximidine dihydrochloride</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonat</i>
DIG	<i>Digoxigenin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dnTCF	<i>dominant-negative TCF</i>
dTCF	<i>drosophyla TCF</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
E	<i>E-tail</i>
<i>E</i>	<i>Extinktion</i>
EDTA	<i>Ethylendiamin-Tetraessigsäure</i>
<i>en2</i>	<i>engrailed 2</i>
<i>ex</i>	<i>exon</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
Fz	<i>Frizzled</i>
GAM	<i>Goat anti maus</i>
GSK-3 $\beta$	<i>Glycogen Synthase Kinase-3<math>\beta</math></i>
H3	<i>Histon 3</i>
HCG	<i>humanes Choriongonadotropin</i>
Hepes	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure</i>
HIC-5	<i>Hydrogen peroxide-induced clone 5</i>
HIPK2	<i>Homeodomain interacting protein kinase 2</i>
HMG	<i>High-Mobility Group</i>
hTCF4	<i>humanes TCF4</i>
HUGO	<i>Human Genome Organisation</i>
IPTG	<i>Isopropyl-<math>\beta</math>-D-thiogalaktopyranosid</i>
ISH	<i>in situ Hybridisierung</i>
<i>lacZ</i>	<i><math>\beta</math>-Galactosidase gene</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
Lrp5/6	<i>Low-density-lipoprotein receptor related protein 5/6</i>
MBSH	<i>Modified Barth's Solution mit HEPES</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>

M-MLV RT	<i>Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
$M_n, L_n$	<i>Midi<sub>nested</sub>, large<sub>nested</sub></i>
MUC1-C	<i>Mucin1-Cytoplasmatischer Domäne</i>
NLK	<i>Nemo like kinase</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>
ODC	<i>Ornithine Decarboxylase</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
p300	<i>Histone acetyltransferase p300</i>
Pax2/5	<i>Paired box gene 2/5</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pen/Strep	<i>Penicillin/Streptomycin</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PIASy	<i>Protein inhibitor of activated STAT protein 4 (PIAS4)</i>
pkl	<i>poliklonal</i>
POP1	<i>C. elegans TCF</i>
pre-mRNA	<i>precursor-messenger-RNA</i>
PTM	<i>Post-Translationale Modifikation</i>
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidon</i>
RAE	<i>Relativen Aktivitäts-Einheiten</i>
RLU	<i>Relative Light Units</i>
RT	<i>Reverse Transkription</i>
S, M, L	<i>small, midi, large</i>
Siam	<i>Siamois</i>
St.	<i>Stadium</i>
STF	<i>Super TOP-Flash</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>TCF bindendes Element</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TCF7L2	<i>Transcription factor 7 like 2</i>
TCR $\alpha$	<i>T-cell-rezeptor-<math>\alpha</math></i>
$T^m$	<i>Schmelztemperatur</i>
TNIK	<i>Traf 2 and Nck-interacting kinase</i>
U (u)	<i>Unit</i>
ÜN	<i>Über Nacht</i>
UV	<i>Ultraviolett</i>
v/v	<i>Volumen-Volumen-Verhältnis</i>
w/v	<i>Gewichts-Volumen-Verhältnis</i>
Wnt	<i>Wingless/Int</i>
WRE	<i>Wnt Response Element</i>
X-Gal	<i>5- Brom-4-chlor-3-indoyl-<math>\beta</math>-D-galaktosid</i>
XTCF	<i>Xenopus TCF</i>
ZNS	<i>Zentralnervensystem</i>
$\beta$ -Gal	<i><math>\beta</math>-Galactosidase</i>
$\Delta$ C-TCF	<i>TCF ohne C-terminus</i>
$\Delta$ N-TCF	<i>TCF ohne N-terminus</i>
$\lambda$	<i>Wellenlänge</i>

# Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	1 - 8
1.1. TCF4 wird alternativ gespleisst .....	1
1.2. Konservierte TCF4 Regionen .....	2
1.3. dnTCF4 Isoformen .....	4
1.4. Alternative Varianten der CRD von TCF4 .....	4
1.5. Alternative Varianten des C-Terminus von TCF4 .....	5
1.6. Post-Translationale Modifikationen von TCF4 .....	7
1.7. Transkriptionales Schaltermodell von TCF4 .....	8
<b>2. Zielsetzung</b> .....	9
<b>3. Material</b> .....	10 - 14
3.1. Antikörper .....	10
3.2. Enzyme .....	10
3.3. Primer .....	10
3.4. Vektoren .....	11
3.5. Lösungen .....	11
3.6. Puffer .....	12
3.7. Chemikalien .....	13
3.8. Kits .....	13
3.9. Medium für Zellkulturen .....	13
3.10 Zellkulturen .....	13
3.11. Geräte .....	14
<b>4. Methoden</b> .....	15 - 30
4.1. Molekularbiologische Methoden .....	15 - 23
4.1.1. Extraktion der gesamt RNA aus <i>X.laevis</i> Embryonen .....	15
4.1.2. Fällung der gesamt RNA .....	15
4.1.3. Aufreinigung der Nukleinsäuren .....	15
4.1.4. Selektive Degradation von Nukleinsäuren .....	15
4.1.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	16
4.1.6. Reverse Transkription von gesamt RNA <i>X.laevis</i> Embryonen .....	16
4.1.7. Analytische Flachbett-Gelelektrophorese .....	16
4.1.8. Präparative Flachbett-Gelelektrophorese .....	17
4.1.9. Restriktionsanalyse von DNA .....	18
4.1.10. Ligation von DNA Fragmente .....	18
4.1.11. Herstellung chemisch kompetenten JM-109 .....	18
4.1.12. Transformation chemisch kompetenten JM-109 .....	18
4.1.13. Selektion und Amplifikation von Plasmid-DNA in JM-109 .....	19
4.1.14. Plasmidpräparation aus JM-109 .....	19
4.1.15. Analytische Polymerase Kettenreaktion ( <i>Taq</i> PCR) .....	19
4.1.16. Präparative Polymerase Kettenreaktion ( <i>Pfu</i> PCR) .....	20
4.1.17. Mega-Primer-Mutagenese PCR .....	21

4.1.18. PCR-Nachweis von unbekanntem XTCF4 mRNA-Sequenzen .....	21
4.1.19. Herstellung DIG-markierter <i>in situ</i> RNA-Sonde .....	22
4.1.20. Herstellung neuer XTCF4-Genkonstrukte .....	22
4.1.21. Sequenzanalyse .....	22
4.1.22. <i>In vitro</i> Transkription .....	23
4.2. Zellbiologische Methoden .....	23 – 25
4.2.1. Zellkultur .....	23
4.2.2. Transiente Transfektion der HEK-293 durch CaPO <sub>4</sub> -Methode .....	24
4.2.3. Ernten und Lyse der HEK-293 .....	25
4.2.4. Kernlokalisationsassay .....	25
4.2.5. Reportergene Assay .....	25
4.3. Entwicklungsbiologische Methoden .....	26 - 29
4.3.1. Tierhaltung .....	26
4.3.2. Eiablage .....	27
4.3.3. Testektomie .....	27
4.3.4. <i>In-vitro</i> -Fertilisation .....	27
4.3.5. Mikroinjektion für Doppelachsen Assay .....	28
4.3.6. Fixierung von <i>X. laevis</i> Embryonen .....	28
4.3.7. Ganzkeim <i>in Situ</i> Hybridisationsassay .....	29
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>30 - 41</b>
5.1. <i>X. laevis</i> exprimiert alternative E-tail-Versionen von XTCF4 .....	30
5.2. Exon-4 wird in XTCF4 alternativ gespleißt .....	32
5.3. Die E-tail und $\Delta$ ex4 XTCF4 werden im Embryogenese zeitgleich mit XTCF4-A, B und C-exprimiert .....	34
5.4. Ganzkeim <i>in situ</i> Nachweis XTCF4-E-tail Isoformen .....	35
5.5. Cystein Klammer und Exon-4 erscheinen separat oder zusammen .....	36
5.6. Die XTCF4C-E-tail- und $\Delta$ ex4-Varianten lokalisieren im Zellkern .....	39
5.7. XTCF4C-E2 $\Delta$ R- und $\Delta$ ex4-Varianten besitzen unterschiedlichen promotoraktivierenden Eigenschaften .....	40
5.8. C-clamp induziert, Exon-4 reprimiert die Induktion einer sekundären Körperachse .....	41
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>43 – 50</b>
6.1. Identifikation neuer XTCF4 Varianten .....	43
6.2. Variationen im TCF4 C-Terminus .....	43
6.3. Variationen in der CRD .....	45
6.4. Alternative XTCF4 mRNA-Varianten .....	45
6.5. Expression von XTCF4 $\Delta$ ex4-CRD und E-tail Varianten .....	46
6.6. Erstellen von neuen XTCF4 Konstrukten zur Funktionsanalyse .....	46
6.7. Funktionsanalysen der neuen XTCF4 Varianten .....	47



<b>7. Zusammenfassung</b> .....	51
<b>8. Literatur</b> .....	52
<b>9. Anhang</b> .....	57 – 65
9.1. Vergleich der XTCF4C-E2 $\Delta$ R und hTCF4-E2 Exon 14 und 17 Fragmente .....	57
9.2. TCF4 CRD-Fragment mit Exon-4 von XTCF4 und hTCF4 .....	58
9.3. Vergleich humaner und Frosch TCF4 und TCF1 Isoformen .....	59
9.4. Herstellung XTCF4 E-tail und $\Delta$ ex4-Genkonstrukte .....	62
9.5. Sequenzen der neuen XTCF4C-Varianten .....	63

# 1. Einleitung

## 1.1. TCF4 wird alternativ gespleisst

Nach heutiger Erkenntnis erfahren etwa 74 % (*Johnson et al. 2003*) der humanen Multi-Exonalen *precursor-messenger-RNAs* (pre-mRNA) alternatives Spleissen. Dadurch entstehen finale mRNAs, welche für alternative Spleiss-Varianten kodieren, die sich in ihrer Aminosäuresequenz und deshalb häufig auch in ihrer Funktion unterscheiden. Auch das Primärtranskript des Transkriptionsfaktors *T-cell factor 4* (*TCF4*), alias *Transcription factor 7 like 2* (*TCF7L2* nach HUGO Nomenklatur\*), wird alternativ gespleißt und liegt beim Menschen in einer Vielzahl alternativer Genprodukte vor (*Duval et al. 2000, Shiina et al. 2003, Howng et al. 2004, Weise et al. 2010*).

TCF4 gehört zu der nuklearen HMG (*High-Mobility Group*) DNA-bindenden TCF/LEF (*T cell factor/Lymphoid enhancer factor*) Protein-Familie. Evertebraten haben nur je ein TCF Gen. Davon sind die am besten untersuchten *Pangolin* (dTCF) aus *D. melanogaster* und *POP1* aus *C. elegans*. Vertebraten besitzen vier TCF/LEF-Gene: *TCF1* (*TCF7*), *LEF1* (*LEF1*)\*, *TCF3* (*TCF7L1*)\* und *TCF4* (*TCF7L2*)\* (*Hoppler und Kavanagh 2007, Arce et al. 2006*). Einzig der Zebrafisch exprimiert ein fünftes Mitglied *TCF3b*, welches durch Duplikation von *TCF3a* entstanden ist (*Dorsky et al. 2003*). Ursprünglich wurde humanes LEF1 (*Lymphoid Enhancer Factor 1*) aus Lymphozyten isoliert, wo es spezifische Sequenzen im T-Zell-Rezeptor- $\alpha$  (TCR $\alpha$ ) Enhancer bindet (*Weterman et al. 1991*). Seit mehr als 15 Jahren stehen LEF/TCFs im Focus der Forschung von Morphogenen-Regulation, weil sie als Effektoren des Wnt Signals bzw.  $\beta$ -Catenins identifiziert wurden (*Behrens et al. 1996, Molenaar et al. 1996, Huber et al. 1996*).

Die sezernierten cysteinreichen Wnt-Glykoproteine (*MacDonald et al. 2009*) binden transmembrane Rezeptoren der Fz (*Frizzled*) und Lrp5/6 (*Low-density-lipoprotein receptor related protein 5/6*) Familien und inhibieren damit die Serin-Threonin-Kinase GSK-3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* ). Damit kann die GSK-3 $\beta$  ihr Substrat  $\beta$ -catenin nicht mehr phosphorylieren und die Ubiquitin-abhängige proteasomale Degradation von  $\beta$ -Catenin wird aufgehoben. Stabilisiertes  $\beta$ -Catenin akkumuliert im Zytoplasma, wandert in den Nukleus, und bindet TCF/LEFs (*Behrens et al. 1996*,

*Daniels & Weis 2005, Hurlstone and Clevers 2002*), darunter TCF4 (*Cho und Dressler 1998, Miravet et al. 2002*).

Die Umfassende Diversität alternativer TCF4-Spleißformen ist eine Voraussetzung für ihre selektive Assoziation zu unterschiedlichen multifaktoriellen expressionsregulatorischen Komplexen (*Weise et al. 2010, Arce et al. 2006, Hoppler and Kavanagh 2007*). Verschiedene TCF4 Isoformen binden selektiv an die Promotoren Wnt regulierter Gene (*Weise et al., 2010*), darunter *Fibronektin* (*Gradl et al., 1999*), *Siamaois* (*Brannon et al. 1997*), *Cyclin D1* (*Tetsu und McCormick 1999, Rajabi et al. 2012*) und *C-myc* (*He et al. 1998*) und aktivieren ihre Transkription in Kooperation mit  $\beta$ -catenin. Ohne  $\beta$ -catenin, kann TCF4 in Abhängigkeit vom Promotorkontext und der Bindung von Co-Repressoren auch die Transkriptionsrepression fördern (*Gradl et al. 2002, Standley et al. 2006, Tang et al. 2008, König et al. 2010, Hikasa et al. 2010*).

TCF4 knock-out führt in der Maus zum Verlust von interstinalen Stammzellen (*Korinek et al., 1998*). Auch im Zebrafisch ist TCF4 in der Darmentwicklung beteiligt (*Faro et al., 2009*). TCF4/ $\beta$ -catenin-Komplex kontrolliert Proliferation und Differentiation in gesunde und maligne intestinale Epithelzellen (*Lee Y. et al. 1999, Van der Wetering et al., 2002*). In *Xenopus* wird Formation von Mittelhirn und Isthmus durch XTCF1 und XTCF4 reguliert (*Van Venrooy et.al. 2008, König et al. 2010*).

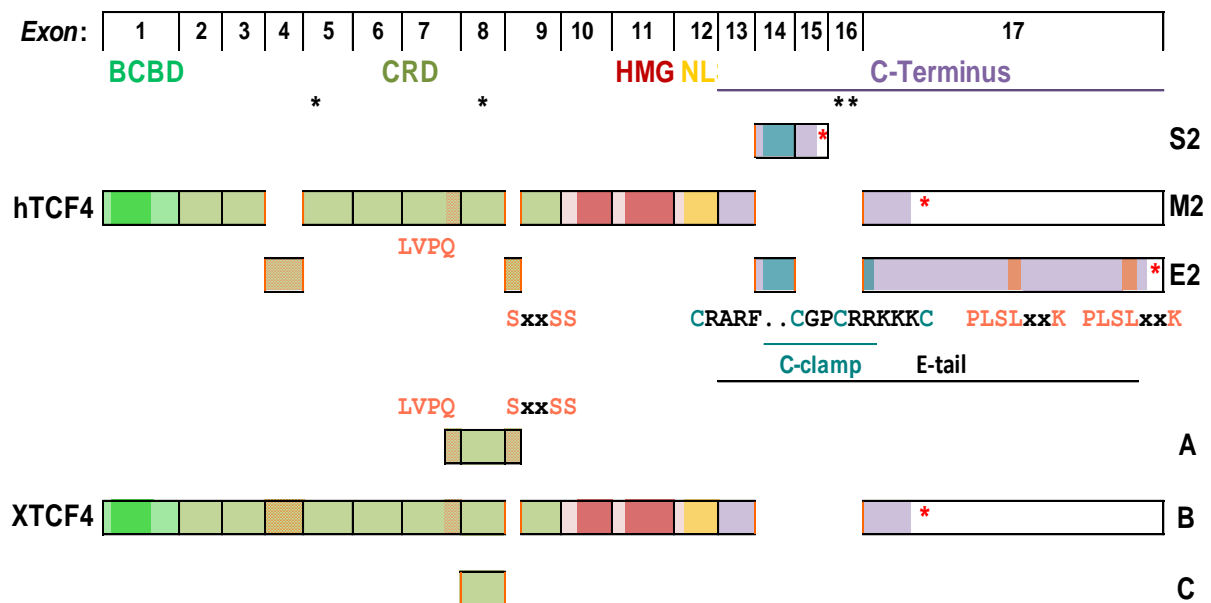
Medizinische Relevanz (*Clevers, 2006*) erhält der Transkriptionsfaktor TCF4 dadurch, dass seine Fehlregulation unter anderem mit Typ-2 Diabetes in Zusammenhang gebracht wird (*Grant et al. 2006*). Desweiteren haben Untersuchungen an Colon-Karzinom Zellen mögliche Tumorsupressor Funktionen von TCF4 bestätigt, (*Tang et al. 2008, Angus-Hill et al. 2011*).

## **1.2. Konservierte TCF4 Regionen**

Der humane *TCF7L2* Locus besitzt 17 Exons (*Weise et al. 2010*). Die TCF/LEF-typischen-Domänen, die Beta-Catenin Bindungsdomäne (BCBD) wird von Exon-1 codiert, die Zentraldomäne (context-derent regulatory domain, CRD) von Exon-2 bis Exon-10. Die DNA-Bindedomäne HMG-Box (*High-Mobility-Group*) mit Kernlokalisationssequenz NLS wird von Exon 10 bis Exon12 codiert der variable C-Terminus von Exon-13 bis Exon-17 (Abb.1). Dabei sind BCBD, HMG und NLS zwischen allen TCF/LEFs hochkonserviert (*Giese et al. 1991, Hurlstone and Clevers 2002, Arce 2006, Hoppler und Kavanagh 2007*). Diese TCF-Basisdomänen kommen ähnlich geordnet in XTCF4 Isoformen vor. Die N-Terminale, die Aminosäuren 1 – 50

umfassende konservierte BCBD bindet mit hohen Affinität an die Armadillo-Wiederholungen 3 bis 10 von  $\beta$ -Catenin (Miravet et al. 2002). Die noch höher konservierte HMG-box erkennt ein CTTTG Motiv auf den Promotoren Wnt regulierter Gene (van de Wetering et al. 1991, Arce 2006). Dieses Motiv wird auch ICF bindendes Element (TBE) oder Wnt Response Element (WRE) genannt (van de Wetering et al. 1992, Atcha et al. 2007). Den dritten hochkonservierten Bereich steht das direkt C-Terminal der HMG box liegende Kernlokalisierungssignal (NLS) dar. Es wird von Exon 12 kodiert und sorgt für den Importin- $\alpha$  abhängigen Kern-Import (Prieve et al. 1998).

### Strukturelle Eigenschaften von hTCF4 und XTCF4 Hauptisoformen



**Abb. 1** hTCF4 pre-mRNA erhält 17 Exons (Zahlen oben). Bereiche alternativer Spleiss Donor -und Akzeptorstellen sind orange markiert. Sterne weisen auf alternative Stop Codons. Die Hauptdomänen BCBD (Exon 1), CRD (Exon 2 – 10), HMG (Exon 10 – 11), NLS (Exon 12) und der variable C-Terminus aus Exon 13 – 17 sind angezeigt. Die hTCF4 Hauptvarianten entstehen durch alternatives Spleissen von Exon-4 und Exon-8 in der CRD, sowie durch AS im C-Terminus. Die Varianten S2, M2 und E2 entstehen durch das Benutzen unterschiedlicher Exons im 3'-Bereich der mRNA: S2 (Exon 13, 14 und unvollständigen Exon 15), M2 (Exon 13 und nur 5' Bereich des Exon 17) und E2 (Exon 13, 14 und lange Exon 17). E-tail (E2) mit vollständige C-clamp der CRARF und RKKKC beinhaltet auch zwei PLSLxxK Bindungsstellen für CtBP. Die XTCF4-Isoformen A (LVPQ, Exon 8 und SxxSS), B (LVPQ und Exon 8) und C (Exon 8) entstehen durch alternativen Nutzen von Spleiss Donor - und Akzeptorstellen um das Exon 8. Die einzige C-Terminus Variante, die diesen Isoformen entspricht, ist die M2 Isoform des hTCF4.

### 1.3. dnTCF4 Isoformen

Die dnTCF/LEFs (*dominant-negative TCF/LEFs*) werden zurzeit als wichtige Regulatoren von Wnt-Signalwege diskutiert (*Behrens et al. 1996, Molenaar 1996, van der Wetering et al. 1996, 1997; Archbold et al. 2011*). Prinzipiell gibt es zwei Variationen dominant negativer TCFs: Zum Einen  $\Delta$ N-TCF-Varianten ohne  $\beta$ -Catenin Bindungsstelle, zum Anderen  $\Delta$ C-TCF-Varianten ohne DNA-Bindedomäne.  $\Delta$ N-TCF-Varianten werden über alternative internale Promotoren generiert und besitzen damit keine  $\beta$ -Catenin Bindestelle. Sie sind weit verbreitet und wurden als dominant negative Varianten von TCF1 (*Roose et al. 1999*), Lef1 (*Hovanes et al. 2001, Najdi et al. 2009, Yokoyama et al. 2010*) und XTCF4 (*Vacik et al. 2011*) beschrieben. Diese  $\Delta$ N-TCFs können an WREs binden und von TCF/ $\beta$ -Catenin Komplexen abschirmen. Die  $\Delta$ C-TCFs, also die Varianten ohne HMG box, können dagegen  $\beta$ -Catenin Moleküle abfangen, ohne sie an Zielgenpromotoren zu rekrutieren. Endogen wurde eine Regulation des Wnt-Signalwegs über diesen Mechanismus noch kaum beschrieben. Einzig für hTCF4 ist ein alternatives Polyadenylationssignal im Intron-4 bekannt, das zu einem verkürzten dnTCF4 bestehend aus Exon 1 - 4 führt (*Locke et al. 2011*). Eine ähnliche dominant negative Variante in murinem TCF4-N entsteht durch Benutzung eines Stop-Kodons in Exon-8 (*Kennel et al. 2003*).

### 1.4. Alternative Varianten der CRD von TCF4

Die Kontext abhängige Regulatorische Domäne von hTCF4 wird von Exon 2 - 9 kodiert (Abb.1). Die hauptsächlichen Spleissvarianten in diesem Bereich gehen durch differentielle Expression der Exons 4 und 8 hervor. Dabei kodiert Exon 4 für ein kleines, bei hTCF4 nur 23 Aminosäuren umfassendes Peptid. Den Hauptisoformen in humanen Zellen und Tumorgewebe (M2, S2 und E2) fehlt dieser Bereich (*Weise et al., 2010*). Die bekannten Varianten des XTCF4, XTCF4 A, B und C enthalten das entsprechende Exon. Hier kodiert es allerdings nur für 19 Aminosäuren (*König et al. 2000*), ohne erkennbare Homologie zum hTCF4 (Abb.13). Erste Analysen zu einer möglichen Funktion dieses Exons zeigten, dass es auf die Promotoren von *Cdx1*, *Siamois*, *Cyclin D* und *Axin2* eher reprimierend wirkt (*Weise et al., 2010*). Diese reprimierende Wirkung wurde durch Überexpressionsstudien von hTCF4 in *X. laevis* bestätigt (*Kappel, 2011*). Der molekulare Mechanismus dieser Regulation ist nicht

bekannt. Exon 8 dagegen, die andere alternativ gespleisste Region innerhalb der CRD, fungiert vermutlich eher als aktivierende Domäne. Innerhalb der CRD fällt dieser Bereich durch eine sehr hohe Konservierung auf. Analysen mit Chimären Konstrukten haben gezeigt, dass dieser Bereich sowohl im Achsenduplikationsassay in *Xenopus* als auch in Reporterstudien die Zielgenaktivierung verstärkt (Gradl et al. 2002). Auch hier ist der molekulare Mechanismus unklar, denn das einzige Protein (HIC-5), das bisher als Bindungspartner dieser Domäne beschrieben wurde, wirkt in oben genannten Versuchen reprimierend (Goghomu et al., 2006).

Eine weitere Vielfalt an Varianten entsteht durch alternative Spleiss-Donor und Spleiss-Akzeptor Stellen flankierend zu Exon 8. Auch diese sind konserviert. Sie finden sich in hTCF4 (Duval et al., 2011) und führen bei XTCF4 zu den drei Varianten XTCF4 A, B und C (Pukrop et al., 2001). Diese Varianten unterscheiden sich nicht nur bezüglich ihrer Aktivität (Pukrop et al., 2001, Standley et al., 2006), sondern sind darüber hinaus auch noch im Mittelhirn sich entwickelnder Embryonen differentiell exprimiert (Kunz et al., 2004).

### **1.5. Alternative Varianten des C-Terminus von TCF4**

Beim Menschen werden die Hauptisoformen des TCF4 nach ihren C-Terminus in drei Gruppen S (*small*), M (*midl*) und L (*long* oder E-tail) eingeteilt (Weise et al. 2010). Alle hTCF4S Isoformen beinhalten Exon 14, das unter anderem für die hochkonservierte CRARF Sequenz kodiert. Die Translation der mRNA der S-Varianten endet an Stop Codons im Exon 15 oder 16 (Abb.1). Den hTCF4-M Isoformen fehlen die Exons 14 - 16 und damit auch die konservierte CRARF Sequenz. Hier endet die Translation bereits Nahe am 5' Bereich von Exon17. Durch Leseramen Verschiebung an dem Spleiß Akzeptor und Donor Grenze Exon13/14, entsteht die dritte Gruppe von hTCF4 Isoformen, die E-Varianten mit langem C-terminus (E-tail). Durch Exon 14, 15 und 17 erhält dieser E-tail eine komplette Cystein-Klammer (C-clamp) und weiter C-terminal zwei hochkonservierte PLSLxxK Sequenzmotive, also Bindugstellen für den Co-Repressor *C-terminal binding protein* (CtBP). Das Bindemotiv für CtBP wurde ausser in TCF4 auch TCF3 und dTCF gefunden (Branon et al. 1999, Fang et al. 2006). Die Cystein-Klammer bildet sich aus dem ersten Cystein der CRARF Sequenz, den zwei weiteren aus Exon 14 kodierten CGPCR und dem Cystein im Exon 17 kodierten RKKKCRY Motiv (Abb.1 und 11). Diese vier Cysteine und ihre benachbarten Aminosäuren sind zwischen

TCF1 und TCF4 hochkonserviert (*Atcha et al. 2007*). Die Cystein-Klammer umklammert Chromatin durch C-C Brückenbildung (*Hurlstone and Clevers 2002*). Evolutionär scheint die E-Variante die ursprüngliche Form darzustellen, denn die Cystein-Klammer kommt neben TCF1 und TCF4 auch in den TCFs der Invertebraten *C. elegans*, *Hydra magnipilata* *D. melanogaster* vor. In *Xenopus* dagegen wurde bisher noch kein vollständiges TCF identifiziert, das eine C-clamp besitzt. Einzig N-Terminal trunkeierte dnXTCF4 Isoformen mit kompletter Cystein-Klammer wurden kürzlich beschrieben (*Vacik et al. 2011*). Die XTCF4 Varianten A, B und C dagegen ähneln der M2-Variante.

Ein charakteristisches Merkmal der E-Formen ist, dass sie zur sogenannten dualen DNA-Erkennung fähig sind (*Atcha et al. 2007*). Dieser Begriff bezeichnet die zweifache DNA Bindung der TCF Transkriptionsfaktoren. Neben der Bindung der HMG box an die Konsensus Sequenz 5'-CCTTTGWW-3' (W steht für A oder T) der WRE, erkennt CRARF zusätzlich 5'-RCCG-3' Helfer Elemente. Diese kombinierte Bindung reguliert die Expression distinkter Wnt-Ziel-Gene wie *Cdx1* und *Cyclin D1* (*Weise et al. 2010*). In *Drosophila* scheint die Bindung dieser Helfer-Elemente durch die Cysteinklammer von dTCF für die duale Funktion des dTCF/Armado (Arm) Komplexes als Wnt-abhängiger Aktivator und Repressor verantwortlich zu sein (*Blauwkamp et al., 2008*). Während das CRARF Motiv und die Cystein-Klammer eher für eine starke Aktivierung der Transkription kanonischer Wnt-Zielgene (z.B. *Axin2* oder *Cdx1*) benötigt wird (*Atcha et al. 2007, Weise et al. 2010*), sorgen die nachfolgenden zwei PLSLxxK eher für ihre Reprimierung (*Cuilliere-Dartigues et al. 2006, Valenta et al. 2003*). An diesen Motiven gebundenes CtBP rekrutiert Co-Repressoren wie HDACs (*histone deacetylases*) an Chromatin. Der Deacetylierung von Histon 3 folgt ihre rasche Methylierung und das Verpacken von DNA in Heterochromatin (*Hecht et al. 2000*). Interessanterweise, Antagonismus von CtBP und C-Clamp Seiten in hTCF4 E-tail wird auf Protein-Protein Interaktionsebene zusätzlich weiter konfrontiert. Beispielsweise, in humanen Brustkrebs Zellen bindet MUC1-C (Mucin1-Cytoplasmatischer Domäne) direkt an die beiden Cytseine im CGPCRRRK Motiv der hTCF4 C-clamp. Durch Rekrutierung von H3 Acetyltransferases p300 an den *Cyclin D1* Promotor blockiert MUC1-C die repressive Wirkung von CtBP in Tumorzellen (*Rajabi et al. 2012*). p300 wurde schon mal beschrieben als Transkriptionale Co-Aktivator und Bindungspartner von hTCF4, welche an der Exon 12 bindet (*Hecht and Stemmler 2003*).

## 1.6. Post-Translationale Modifikationen von TCF4

Neben der Expression unterschiedlicher TCF-Varianten entscheidet auch die Post-Translationale Modifikation über die Aktivität der LEF/TCF Transkriptionsfaktoren. Dadurch können ihre subzelluläre Lokalisation, Stabilität und Interaktionsfähigkeiten mit DNA und Co-Faktoren verändert werden. Diese Regulationsmechanismen gehen teilweise Hand in Hand, denn alternatives Spleissen entscheidet, welche potentiellen posttranslational regulierten Bereiche überhaupt exprimiert werden. An Post-Translationale Modifikation der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren sind bisher Phosphorylierungen und Sumoylierungen beschrieben.

Die Sumoylierungen von TCF/LEFs können sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken. Z.B. durch SUMO (*Small ubiquitin-like modifier*) E3-Ligase PIASy (*Protein inhibitor of activated STAT*) vermittelte Sumoylierung von LEF1 inhibiert die Transkription von LEF1 regulierten Gene (*Sachdev et al. 2001*). Dagegen erhöht PIASy TCF4/ $\beta$ -Catenin vermittelten Transkriptions-Aktivierung, hier durch Sumoylierung des von Exon 9 kodierten Lys<sub>297</sub> (*Yamamoto et al. 2003*). Auch XTCF4 Isoformen besitzen das entsprechende Lysin, jedoch wurde seine Funktion bisher noch nicht untersucht. Ebenfalls ist wenig bekannt über die Rolle von PIASy in Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg (*Archbold et al. 2011*).

Die Aktivitäten von TCF/LEFs werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Kinasen beeinflusst. Diese Phosphorylierungsereignisse können dabei aktivierend oder reprimierend sein. In *Xenopus*, fördert beispielsweise NLK (*Nemo like kinase*) vermittelte Phosphorylierung, die Ubiquitinierung und Degradation von TCF4 und LEF1 (*Yamada et al. 2006*). HIPK2 (*Homeodomain interacting protein kinase 2*), phosphoryliert Wnt-Abhängig TCF3, TCF4 und LEF1 und führt so zur Entfernung dieser Transkriptionsfaktoren von Zielgen Promotoren (*Hikasa et al. 2010, Hikasa und Sokol, 2011*). Eine aktivierende Phosphorylierung von TCF4 wurde dagegen bei der Kinase TNIK (*Traf 2 and Nck-interacting kinase*) beobachtet, sowohl in Säugerzellen (*Shitashige et al., 2010*) als auch in *Xenopus* (*Satow et al., 2010*). Auch Phosphorylierungen durch Casein Kinasen CK (*Casein kinase*), können sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken (*Sokol et al. 2011*). Z.B. CK1 $\epsilon$  erhöht durch Phosphorylierung von TCF3 die Affinität zu  $\beta$ -Catenin (*Lee et al. 2001*). Im Gegensatz dazu, beeinflusst CK1 $\delta$  die Bildung von LEF1/ $\beta$ -Catenin Komplexen negativ (*Hammerlein et al. 2005*). Auch CK2 (*Casein kinase 2*) kann in Abhängigkeit



von TCF/LEFs Transkription von Wnt-Target Gene unterschiedlich regulieren. Einerseits begünstigt die CK2 Bindung von LEF1 an das Chromatin, andererseits reduziert es die Assoziation von TCF4 mit Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin) und erhöht die Affinität von TCF4 zu  $\beta$ -Catenin (*Miravet et al. 2002*).

### 1.7. Transkriptionales Schaltermodel von TCF4

Ein Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalnetzwerk spielt über TCF4 wichtige Rolle in der Zellspezifikation entlang der anterior-posterioren (A/P) Achse des zentralen Nervensystem von *Xenopus* (*Niehrs 2010, Kunz et al. 2004, König A. et al. 2000, König S. et al. 2010*). Dabei wird die Expression von XTCF4 präzise über eine autoregulatorische Schleife reguliert. XTCF4 wird als direktes Zielgen von XTCF1, beschränkt im anterioren Mittelhirn exprimiert und ist unentbehrlich für die Musterung von Mittelhirn und Isthmus. Dort wird es durch sein Zielgen *engrailed 2 (en2)* direkt inhibiert. Simultan, abhängig von Pax2/5, aktiviert *en2* die Transkription von XTCF4 im Mittelhirn indirekt über Wnt1 (*König S. et al. 2010*).

In der ZNS (Zentralnervensystem) Entwicklung werden die XTCF4 Isoformen XTCF4-A, B und C subtypspezifisch, räumlich getrennt exprimiert: XTCF4A wird im Mittelhirn exprimiert und dient vorwiegend als Repressor, während der TCF4C am Isthmus lokalisiert ist und aktivierende Eigenschaften besitzt. (*Pukrop et al. 2001; Gradl et al. 2002, Kunz et al. 2004*). Die Differenz in ihrer Wirkungsweise liegt am Vorhandensein/Fehlen von LVPQ und SLVSS, zwei reprimierende Aminosäure-Motive, die an den Flanken von Exon 8 kodiert werden (Abb.1). XTCF4A, enthält diese Motive, XTCF4C dagegen nicht (*Pukrop et al., 2001, Gradl et al. 2002*).

In der frühen Embryonalentwicklung ist XTCF4 notwendig für die Aktivierung von Speman Organisator spezifischen Genen (*Standlay et al. 2006*). Durch weitere ChIP-Experimente und Reportergeren Analysen wurde gezeigt, dass die repressive Bindung von XTCF3 an der *Siamois* Promotor im Spemann Organisator durch nukleäres  $\beta$ -catenin inhibiert wird (*Brannon et al. 1997*). Diese Inhibition erlaubt die Bindung von XTCF4 an dem Promotor (*Hikasa et al. 2010*). Reguliert wird dieser Wechsel an gebundenem Transkriptionsfaktor durch eine  $\beta$ -Catenin induzierte inhibitorische Phosphorylierung über die HIPK2 Kinase. Dadurch löst sich XTCF3 von Wnt responsiven Elementen (*Hikasa et al. 2010*). Gleichzeitig kann  $\beta$ -Catenin an XTCF4 die Kinase TNIK rekrutieren und im Komplex mit XTCF4 Transkription aktivieren (*Satow et al. 2010*).

## 2. Zielsetzung

Ein Schlüssel zur Aufklärung der funktionalen Unterschiede zwischen alternativen XTCF4 mRNA Spleißformen liegt in ihren strukturellen Eigenschaften.

Im Gegensatz zu humanen und murinen LEF/TCF Transkriptionsfaktoren liegen für die entsprechenden Varianten in *Xenopus* nur wenige Daten über alternativ exprimierte Varianten vor. Dies gilt insbesondere für TCF4, den Transkriptionsfaktor, bei dem in Säugern eine sehr hohe Variabilität im C-Terminus beschrieben ist. Insbesondere die Expression eines langen (E-tail) C-Terminus ist zu erwarten, denn die mRNA der bisher bekannten XTCF4 Varianten enthält die Information für diesen langen C-Terminus. Einzig durch ein Stop-Codon im 5'-Bereich von Exon 17 wird diese Information nicht genutzt.

Zielsetzung dieser Arbeit war also, neue XTCF4 Varianten zu identifizieren, insbesondere Variationen im C-Terminus und alternativ gespleißtes Exon 4 in der kontext abhängigen regulatorischen Domäne.

In Überexpressionsstudien und in Reporter-gen-Analysen an transient transfizierten Säugerzellen sollten erste Hinweise über die Funktion der neuen Varianten gewonnen werden.

### 3. Material

#### 3.1. Antikörper

- Anti-Digoxigenin-AP (Roche, Mannheim )
- GAM-Cy3 (Dianova, Hamburg)
- Maus Anti-TCF3/4 (Biomol, Hamburg)

#### 3.2. Enzyme

- Pfu Turbo DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA)
- RNase A (Fermentas, St.Leon-Rot)
- Turbo DNase™ (Life Technologies, Darmstadt)
- DNase I (Promega, Mannheim)
- Restriktionsendonuklesen (Promega, Mannheim)
- GoTaq® DNA-Polymerase (Promega, Mannheim)
- M-MLV RT (Promega, Mannheim)
- T4-DNA-Ligase 1-3 U/μ (Promega, Mannheim)

#### 3.3. Primer

- Die Sternmarkierte Primer (Biotech, Ebersberg)
- Mega-Primer (vorliegende Arbeit)
- Andere Primer (Biomers, Ulm)

##### — Analytische XTCF4-Primer

+1f	5'-ATGCCGCAGTTGAATGGCGGT-3'
ex3f	5'-ATCATGATCCCCGACCTGAGC-3'
Δex4f	5'-CCCACTGCGCGACAGTATCTG-3'
ex4f	5'-GCATTTAGCCTCTTGTTGCAG-3'
ex9f *	5'-CCTCACATGGTGCCGCCTCATC-3'
ex12f	5'-ATGGCAAGAAGAAGAAGAGG-3'
ex12rf	5'-GGGAAAAGCAGCAAGGAGAGGC-3'
ex5r	5'-TACCCTGTAACTTCCAGCCTG-3'
ex8r *	5'-GTGATTGGATAAACGGGCTG-3'
ex10r *	5'-CAGCATGAACGCGTTTAGGGG-3'
ex14r	5'-GCACCAGTTATTCTGCTGATC-3'
ex17nr	5'-GTGGTTTGGAGTCTGATATGG-3'
ex17r	5'-AGGTTGAGTTTGTTCAGTTTG-3'

##### — Primer für Haushaltsgen (ODC)

ODCf	5'-GGAGCTGCAAGTTGGAGA-3'
ODCr	5'-CTCAGTTGCCAGTGTGGT-3'

##### — Primer für PCR-Deletion von XTCF4 Exon-4

5'ex5f	5'-TATCTGCAGATGAAATGGCCC-3'
3'ex3r	5'-CTGTCGCGCAGTCGGGGAGAG-3'

– *XTCF4 mega-Primer*

$\Delta$ ex4-mega-primer f/r	121 bp dsDNA
E2-mega-primer f/r	288 bp dsDNA ( $L_n$ )
E2 $\Delta$ R-mega-primer f/r	285 bp dsDNA

### 3.4. Vektoren

- pGEM<sup>®</sup>-T Vector System I (Promega, Mannheim)
- XTCF4 ex12-ex17 cDNAs (vorliegende Arbeit)
  - S < 215 bp
  - $M_n$  215 bp
  - M 259 bp
  - E2 ( $L_n$ ) 285 bp
  - E2 $\Delta$ R (L) 332 bp
- pCS2 mit *Xenopus* TCF-1 und 4
  - XTCF1-FLAG (Klingel S. und Gradl D., KIT)
  - XTCF4C (König A. und Gradl D., KIT)
  - mycXTCF4C (König A. und Gradl D., KIT)
- pCS2 mit humanen TCF4
  - hTCF4S2 (Hecht A., Uni-Freiburg)
  - hTCF4E2 (Hecht A., Uni-Freiburg)
- pCS2 mit neue XTCF4 ASV-cDNAs (vorliegende Arbeit)
  - XTCF4C- $\Delta$ ex4 (vorliegende Arbeit)
  - mycXTCF4C- $\Delta$ ex4
  - XTCF4C- $\Delta$ ex4-E2 $\Delta$ R
  - mycXTCF4C- $\Delta$ ex4-E2 $\Delta$ R
  - XTCF4C-E2 $\Delta$ R
  - XTCF4C-E2
- Reportervektoren
  - CMV  $\beta$ -Galactosidase (Invitrogen, Karlsruhe)
  - 8 X Super TOP-Flash-*Luciferase* (Ajamete Kaykas, Seattle)
  - pBlue-script Xsiam-*Luciferase* (Brannon et al., 1997)

### 3.5. Lösungen

- 2-Log DNA Ladder (NewEnglandBioLabs, Frankfurt)
- Desoxyribonukleotide (Promega, Mannheim)
- Pen/Strep (PAA Laboratories, Österreich)
- 0,25 % Trypsin 1mM EDTA (Life Technologies, Darmstadt)
- FCS (hitzeinaktiviert) (Invitrogen, Karlsruhe)
- Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml)

- Alcianblau-Färbelösung (1 % Alcianblau in 1 X APBS)
- BMB (5 X BMB: 10 % (w/v) Blockierungsreagenz in 5 X MAB)
- DEPC-H<sub>2</sub>O (1 : 1000)
- GAM-Cy3 Lösung (GAM-Cy3 (1 : 200) in 20 % Pferdeserum/PBS-T)
- PFA-Lösung (37 % PFA in 1 X PBS)
- Magnesium-Lösung (100 X Lösung: 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 4,5 M β-Mercaptoethanol)
- Luziferase-Substratlösung (1 X Lösung: 2,12 mg Coenzym A, 1,32 mg Luziferin und 2,92 mg ATP gelöst in 10 ml Luziferase-Assay Puffer)
- β-Galactosidase-Reaktionsmix (6 µl 100 X Mg Lösung, 132 µl 1 X ONPG, 402 µl 0,1 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5)
- MEMFA (0,1 % (v/v) Tween 20, 3,7 % (v/v) Formaldehyd in 1 X MEM)
- Maus Anti-TCF Lösung (Maus Anti-TCF3/4 (1 : 500) in 20 % Pferdeserum/PBS-T)
- MEM (100 mM MOPS (pH 7.4), 2mM EGTA, 1mM MgSO<sub>4</sub> in DEPC-H<sub>2</sub>O)
- MAB (5 X MAB: 0,5 M Maleinsäure, 0,75 M NaCl, pH 7.5)
- Cysteinlösung (2% (w/v) L-Cystein in 0,1 X MBSH, mit 10 M NaOH, pH 8.2)
- Pferdeserum Blockierungslösung (20 % Pferdeserum und 0,1 % Triton X-100 in 1 X PBS)
- SSC (20 X SSC: 3 M NaCl, 300 mM Na-Zitrat (pH 7.0) in SOB, 0,1 % (v/v) Triton in 1 X PBS)
- Anti-Digoxigenin AK-Lösung (0,02 % (v/v) Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments in Blockierungspuffer)
- Nilblaufärbelösung (Nilblau Sulfat 0,01 % (w/v) in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7.8)
- NBT/BCIP (1,5 µl NBT, 1,5 µl BCIP in 1 ml AP-Puffer)
- HeBS (10 X Lösung: 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 7.1, sterilfiltriert)

### 3.6. Puffer

- Alkalische Lyse-Puffer (200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS)
- APBS (2.7 mM KCl, 0.15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 103 mM NaCl, 0.7 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5)
- AP-Puffer (0,1 mM Tris-HCl pH 9,5, 0,05 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, in DEPC-H<sub>2</sub>O)
- Blockierungspuffer für *in situ* Hybridisierung (2 % BMB (v/v) in 1 X MAB)
- HEBS (0,13 M NaCl, 0,005 M KCl, 0,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 % Glucose, 0,02 M HEPES, pH 7.12)
- Hybridisierungspuffer für *in situ* Sonde (50 % (v/v) deionisiertes Formamid, 5 X 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 1 X Denhardt's Lösung)
- Luziferase Assay Puffer (33,3 mM DTT, 100 mM EDTA, 1,07 mM Mg(CO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Mg(OH)<sub>2</sub> • 5H<sub>2</sub>O, 2,67 mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM Tricine, pH 7.8)
- Luziferase-Lysepuffer (25 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.8, 2 mM CDTA, 2 mM DTT, 10 % Glycerin, 1 % Triton X-100)
- MBSH (1 X Lösung: 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>)
- Orange G Nukleinsäuren Ladepuffer (6 X Lösung: 0,25 % (w/v) Orange G, 40 % (w/v) Saccharose in H<sub>2</sub>O)
- PBS (Carl Roth, Karlsruhe)
- PBST (0,1 % (v/v) Tween 20 in 1 X PBS)
- TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH-Wert 8,3, 1 mM EDTA)

### 3.7. Chemikalien

- Agarose NEEO Ultra-Qualität (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Ammoniumpersulfat (Bio-Rad GmbH, Munchen)
- Chloroform (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- DTT (Dithiothreitol) 0,1 M (Promega GmbH, Mannheim)
- NBT Stocksolution (Roche GmbH, Mannheim)
- BCIP Stocksolution (Roche GmbH, Mannheim)
- Tween 20 (Serva GmbH, Heidelberg)
- L-Cystein (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Midori Green (DNA-/RNA-Farbstoff) (Biozym GmbH, Oldendorf)
- RNAtidy G (AppliChem GmbH, Darmstadt)
- IPTG (Promega GmbH, Mannheim)
- DAPI (Promega GmbH, Mannheim)
- DEPC (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- MOPS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

### 3.8. Kits

- PureYield™ Plasmid Midi-und Miniprep System (Promega, Mannheim)
- mMESSAGe mMACHINE® SP6 Kit (Ambion, Warrington, UK)
- DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, Mannheim)
- ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (GE-Healthcare, München)
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up-System (Promega, Mannheim)
- GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis Kit (Agilent, Waldbronn)

### 3.9. Medium für Zellkulturen

- Hauptkulturmedium für CK JM109 (1 X LB mit 20 mM MgSO<sub>4</sub>)
- LB-Medium (10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 5-10 g NaCl mit H<sub>2</sub>O bis auf 1 L auffüllen, pH 7,5. Autoklaviert)
- SOB (Hefeextrakt 5 g/l, 20 g/l Trypton, 0,6 g/l 10 mM NaCl, 10 g/l 0,25 M KCl, 5 ml 2M MgCl<sub>2</sub> (aus 1 M MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O und 1 M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O), Add. H<sub>2</sub>O 1 l, (pH 6,8 - 7,0). Autoklaviert und sterilfiltriert.
- SOC-Medium (4 g/l Glucose und SOB-Medium)
- TBF-II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 6,5)
- TFB-I (30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl, 15 % Glycerin, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 5,8. Sterilfiltriert)
- DMEM+4,5 g/L D-Glucose (Life Technologies, Darmstadt)

### 3.10. Zellkulturen

- HEK-293 (ATCC# CRL-1573)
- *E.coli* Stamm JM-109 (Genotyp: *endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (rk- mk+) relA1 supE44D (lac-proAB) [F'traD36 proAB lacqZDM 15]*) (Promega, Mannheim)

### 3.11. Geräte

- Binokular Mikroskop, Leica S8AP0 (Leica, Bensheim)
- Biofuge fresco (Kendro, Langenselbold)
- Multifuge 3 s-R (Heraeus Sepatech, Hanau)
- BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
- Brutschrank für Embryologie BK-600 (Heraeus, Hanau)
- Brutschrank für Embryologie, MIR-254 (Sanyo, Japan)
- Brutschrank, APT LineSerie BD/ED/FD (Binder, Tuttlingen)
- Diana II Geldokumentationsanlage, (Raytest, Straubenhardt)
- Digitalkamera Retiga Color 12 bit (QImaging, Burnaby, Kanada)
- EK-1 Membranpumpe MZ2 (Vacuubrand, Wertheim)
- Elektrophoresekammer Model: 40-0787 (PeqLab, Erlangen)
- Flaming/Brown Micropipette Puller P-97 (Sautter Instrument, USA)
- Fluoreszenzmikroskop DMIRE2 (Leica, Bensheim)
- Feinwaage (Sartorius, Göttingen)
- INTAS „Gel Max“ mit 2/3” Cam. (Intas, Göttingen)
- iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, München)
- The CleanSpot A PCR/UV Work Station (COY L.P., USA)
- Inkubator für Zellkulturen (Binder, Tuttlingen)
- Intelli-Mixer Sky-Line (LTF GmbH, Wasserburg)
- Kaltlichtquelle Fiber Optic Light Source (Euromex, Arnhem, NL)
- Kaltlichtquelle, KL 1500 LCD LEICA (Leica, Bensheim)
- Kühlmikrozentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg)
- Mircoflow 2 Advanced Bio Safety (NUNC, Wiesbaden)
- Magnetrührer, RCT Basic (IKA Labortechnik, Staufen)
- Membran Vakuumpumpe MZ2 (Saur-Laborbedarf, Reutlingen)
- Pneumatic Pico-Pump PV 820 (WPI inc., Sarasota, USA)
- pH-Meter, WTW pH 521 (WTW GmbH, Weilheim)
- Präzisionswaage, Scout™ Pro (OHAUS, HJ, USA)
- Schuettelmischgerät Typ 2010 (UNIMAX, Heidolph)
- Sterilbank, Microflow-2 (NUNC, Roskilde, Dänemark)
- Sterile Cycle CO<sub>2</sub> Incubator (Thermo Forma, Marietta, USA)
- Thermoblock TYPE BBA1 (Grant Instruments, GB)
- Thermoschüttler Orbital Shaker (Thermo Forma, Marietta, USA)
- Ultra Turrax® T8 (IKA Labortechnik, Staufen)
- Ultrospec 2100 pro Spectrophotometer (Amersham, Freiburg)
- Vortex-Genie 2 Model G-560E (Scientific Industries, NY, USA)
- Wasserbad Typ WNB7 (Memmert, Schwabach)

## **4. Methoden**

### **4.1. Molekularbiologische Methoden**

#### **4.1.1. Extraktion der gesamt RNA aus *X.laevis* Embryos**

Der Ultra-Turrax T8 wird vor jeder Homogenisierung viermal mit 1 ml H<sub>2</sub>O und zuletzt mit 1 ml RNAtidy G gereinigt. Die 10 -12 Embryonen pro Embryonalstadium (Abb.5) werden jeweils mit 1 ml RNAtidy G versetzt und homogenisiert. Die Lysate werden mit 200 µl Chloroform ausgeschüttelt, 2-3 min bei RT inkubiert und 15 min bei 13 200 rpm abzentrifugiert. Die klare obere Phase, die RNA enthält, wird isoliert, erneut mit 200 µl Chloroform ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die RNA befindet sich auch jetzt in der oberen Phase und wird sauber isoliert.

#### **4.1.2. Fällung der gesamt RNA**

Die RNA-Extrakte aus Embryonen werden mit der doppelten Volumen EtOH-absolut versetzt und üN bei – 80 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden RNAs 30 min bei 4 °C und 13 200 rpm gefällt. RNA-Pellets werden mit eiskaltem 1 ml 70 %-Et-OH gewaschen und wie vorhin erneut gefällt. Nach dem Entfernen des Überstands werden die Alkoholreste bei Raumtemperatur verdunstet und in 15 µl nukleasefreiem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **4.1.3. Aufreinigung der Nukleinsäuren**

Die Aufreinigung von DNA Fragmenten wurde über das „SV Wizard Gel Cleanup System“ (Promega), entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt, wobei die Zentrifugationen mit 13 200 rpm und variablen Elutionsvolumen von 30 µl bis 50 µl erfolgten. Die *in vitro* transkribierte mRNAs und die DIG-Markierte RNA-Sonden wurden mittels Größenausschlusschromatographie über den „ProbeQuant™ G-50 Micro Columns“ (GE-Healthcare) nach den Vorschriften der Hersteller aufgereinigt.

#### **4.1.4. Selektive Degradation von Nukleinsäuren**

Zur Abtrennung methylierter PCR-Matrizen von Amplifikaten wird mit 1 µl *DpnI* (5 u/µl) pro 25 µl PCR-Ansatz für 2 h bei 37 °C verdaut.



RNA-Extrakte aus Embryonalstadien werden durch Inkubtion mit mit 0,5  $\mu\text{l}$  (2 u/ $\mu\text{l}$ ) Turbo DNase<sup>TM</sup> (Life Technologies) pro 5  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung über 15 min bei 37 °C von DNA-Kontaminationen befreit. Das Enzym wird anschließend bei 70 °C über 10 Minuten denaturiert.

#### **4.1.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren werden durch ihre spezifischen Extinktion ( $E$ ) bei  $\lambda 260$  (DNA) oder  $\lambda 280$  nm photometrisch quantifiziert. Dabei entspricht eine  $E_{260}$  von 1 einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  bzw 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  doppelsträngige DNA. Liegt der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  der Lösung zwischen 1,8 und 2,0 kann von einer von proteinfreiem Nukleinsäurenprobe ausgegangen werden. Die Nukleinsäuren Konzentration werden am „BioPhotometer“ (Promega) bestimmt. Dafür wird Jeweils 2  $\mu\text{l}$  RNA oder DNA mit 98  $\mu\text{l}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  gemischt und nach dem Leerwerteinstellung (nur 100  $\mu\text{l}$  Wasser) ihre Konzentration gemessen.

#### **4.1.6. Reverse Transkription von gesamt RNA *X.laevis* Embryonen**

Für die Synthese von cDNA wird pro 1  $\mu\text{g}$  RNA-Matrize mit 1  $\mu\text{g}$  Random-Hexamer Primern (500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und Nuklease freiem  $\text{H}_2\text{O}$  in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  angesetzt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach der Hybridisierung von Primern und RNA-werden die Ansätze auf Eis gekühlt und pro Reaktion mit 9,5  $\mu\text{l}$  des RT-Mastermixes versetzt. Dieser enthält 4  $\mu\text{l}$  5 X M-MLV-RT Puffer, 2  $\mu\text{l}$  10 mM DTT, 1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTPs und 2,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Zu jedem Ansatz werden 0,5  $\mu\text{l}$  der 200 U/ $\mu\text{l}$  M-MLV-Reversen Transkriptase (Promega) zugegeben, bei den Negativkontrollen 0,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Alle Ansätze werden bei 42 °C für 50 min inkubiert. Anschließend wird das Enzym für 10 Minuten bei 70 °C inaktiviert, mit Nuklease freiem Wasser 1 : 3 verdünnt und bei – 20 °C gelagert.

#### **4.1.7. Analytische Flachbett-Gelelektrophorese**

Zur Nachweis und zur Qualitätskontrolle werden die Nukleinsäuren in der Flachbett-Gelelektrophorese analysiert. Für DNA Fragmente bis 1000 bp werden 1,6 % - 2 %-ige und für DNAs über 1000 bp große (einschließlich Restriktionsverdau) sowie für RNA-Elektrophorese 1 % - 1,3 % Agarose/TAE Gele verwendet. Die Agarosegele

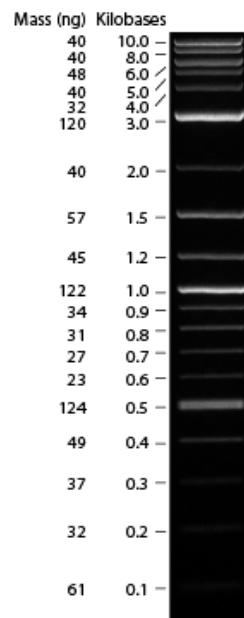
werden nach dem Aufkochen bis etwa 60 °C abgekühlt, mit Midori Green (1 : 20 000) versetzt und in Gelformen gegossen. Midori Green interkaliert in Nukleinsäuren und emittiert ein grünes Licht nach Anregung mit UV ( $\lambda = 312 \text{ nm}$  und  $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).

Etwa 1-3  $\mu\text{g}$  DNA bzw. RNA werden mit Nukleinsäuren versetzt und auf das Gel geladen. Als Größen und Massen-Standard dient der 2-Log DNA-Marker (Abb.2).

In einer elektrischer Feld bei einer Gleichspannung von 60 - 120 V wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren-Fragmente zur Anode und trennen sich voneinander anhand ihrer Grössen. Die Dauer der Auftrennung wird an die Fragmentgröße angepasst. Die Grössen und Massen doppelsträngiger DNA-Fragmente, können im Agarosegel optisch oder densitometrisch mit den Banden des DNA-Markers verglichen werden. Gesamt-RNA wird in der analytischen Flachbett-Gelelektrophorese durch zwei Banden erkannt, welche die in der Zelle am häufigsten vorkommende RNA Populationen, die 18S- und 38,5S rRNA, repräsentieren.

#### 4.1.8. Präparative Flachbett-Gelelektrophorese

DNA Fragmente, die für weitere Ansätze genutzt werden, werden im präparativen Massstab über ein Agarose-Gel aufgetrennt. Nach kurzer Belichtung bei 312 nm werden die DNA-Fragmente schnell ausgeschnitten.



**Abb. 2.** DNA-Größenstandard 2-Log DNA Ladder (0.1–10.0 kb) zum Abschätzen der DNA-Größe und Masse.

#### **4.1.9. Restriktionsanalyse von DNA**

In Experiment verwendete Restriktionsendonukleasen erkennen meist als Palindrom organisierte spezifische DNA-Sequenzen, führen einen Doppelstrang-brüche ein und hinterlassen 5' bzw. 3' Überhänge. Zum analytischen Restriktionsverdau von 1 µg DNA in 1 h, wird 1 U des gewählten Enzyms (bzw. Enzyme-Paar) im vom Hersteller vorgeschlagenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 oder 20 µl angesetzt. Die DNA-Fragmente werden anschließend Mittels analytischen Flachbett-Elektrophorese analysiert. Zur enzymatischen Linearisierung von *in vitro* Transkriptions-Matrizen, wurden Je 32 µl (ca. 0, 2 - 1 µg/µl) der Konstrukte im Expressionsvektor pCS2 mit 4 µl *NotI* und 4 µl versetzt. Die Ansätze werden bei 37 °C üN inkubiert.

#### **4.1.10. Ligation von DNA Fragmente**

DNA-Ligasen katalysieren die Verknüpfen von DNA-Strängen über Phosphodiester-Bindungen zwischen 5'-Phosphat und 3'-Hydroxyl-Gruppen benachbarter Nukleotide. Ein Ligationsansatz in 10 µl besteht aus 25 - 50 ng linearisierter Plasmid-DNA und dem zu insertierenden Fragment im drei- bis siebenfachen molaren Überschuss, 1 µl 10 X Buffer und 10 U T4 DNA Ligase. Die Inkubation erfolgt bei 12 - 13 °C ÜN oder bei Raumtemperatur für 2 - 4 h.

#### **4.1.11. Herstellung chemisch kompetenten JM-109**

200 µl chemisch kompetenten JM 109 werden im 20 ml Vorkultur 1 X LB bei 225 rpm und 37 °C üN inkubiert. 250 ml Hauptkultur 1 X LB werden mit 10 ml dieser Vorkultur angeimpft und bei gleichen Bedingungen bis OD<sub>600</sub> 0,6 – 0,8 inkubiert. Nach 5 min auf Eis werden die Bakterien für 5 min bei 4000 g und 4 °C abzentrifugiert, in 100 ml TFB-I resuspendiert und 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Bakterien werden erneut zentrifugiert, in 10 ml TFB-II aufgenommen, in 50 – 100 µl Porionen aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei – 80 °C gelagert

#### **4.1.12. Transformation chemisch kompetenten JM-109**

Zur Amplifikation von Plasmiden in JM-109 wird die Plasmid-DNAs zuvor in Bakterien eingebracht. 50 -100 µl chemisch kompetenten JM-109 wird auf Eis gestellt, die 1 - 5 µg Plasmid DNA zugemischt und 10 - 20 min inkubiert. Nach einem Hitzeschock für

45 sec bei 42 °C und Inkubation 2 - 5 min auf Eis, wird dem Ansatz 200 - 400 µl SOC-Medium zugegeben und 30 Minuten bei 37 °C und 225 rpm inkubiert.

#### **4.1.13. Selektion und Amplifikation von Plasmide in JM-109**

In dem pGEM-T Vektor befindet sich ein modifiziertes *lacZ*-Gen, welches für den C-terminalen Teil der  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Wird kein DNA-Fragment in das Vektor integriert, wird nach Induktion mit 100 µl IPTG die katalytische Domäne der  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert. IPTG wirkt als Induktor des *Lac*-Operons, indem es an den *Lac*-Repressor bindet. Wurde der *E. coli* Stamm so ausgewählt, dass dieser den  $\alpha$ -Abschnitt der N-terminale Domäne von  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert, kommt es zu der sogenannten  $\alpha$ -Komplementierung, indem die beiden separaten Domänen der  $\beta$ -Galaktosidase sich zu einem funktionellen Enzym ergänzen. Bietet man diesen transformierten und induzierten Bakterien das Substrat 50 µl X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galaktosid) an, so wird dieses zu einem blauen Farbstoff umgewandelt. Wird jedoch ein DNA-Insert in der Polylinker des Vektors eingefügt, unterbricht dies das  $\beta$ -Galaktosidase Gen im Vektor und verhindert damit die  $\alpha$ -Komplementierung. Daher ist eine Kolonie, die kein rekombinantes Insert trägt blau, während eine Kolonie mit Insert weiß bleibt.

#### **4.1.14. Plasmidpräparation aus JM-109**

Präparation von Plasmide aus JM-109 wurde in Mini-oder Midi-Volumen nach Vorschriften des entsprechender Protokoll des „PureYield™ Plasmid Midi-und Miniprep System“ Kits (Roche) durchgeführt mit Ausnahmen von unterschiedlichen Elutionsvolumen und Maximaler Zentrifugationsschritte von 13 200 rpm.

#### **4.1.15. Analytische Polymerase Kettenreaktion (TaqPCR)**

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt eine, durch spezifische Primer-Paar begrenzten DNA-Abschnitt exponentiell zu amplifizieren. Im Thermozykler, nach dem Hitzedenaturierung von dsDNA und abkühlen von Ansatz bis auf spezifischen optimaler Schmelztemperatur von Primer ( $T^m$ ), hybridisieren die an den Komplementären einzelstrangabschnitt des DNA. Anschließend verlängert die thermostabile DNA-Polymerase die Primer von ihre 3'-Ende. Reaktion abläuft im mehreren Zyklen je nach passende Konditionen. Das Standard-Programm im

Thermozykler beginnt mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C (3 - 5 min). Darauf folgen (je nach erwarteten Produktmenge, Matritze und Primerspezifität) zwischen 18 bis 36 Zyklen bestehend aus 1/2 - 1 min bei 94°C, weiteren 30 - 60 sec bei 50 - 60 °C (Primerspezifische  $T^m$ ) und 30 sec pro erwarteten kb Produkt bei 72 °C (für *Taq*Pol). Abschließend, folgen eine 10 min Inkubation entsprechend bei 72 °C Abkühlen von Reaktionen auf 4°C.

Im Experiment wurden Alle PCR-Ansätze in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß in Gesamtvolumen von 25 oder 50 µl angesetzt. Jeder 25 µl *Taq*PCR-Reaktion besteht aus 5 µl 5 X *GoTaq*<sup>TM</sup> Buffer, 0,5 µl dNTP's (jede 10 mM), 25 - 35 ng Matrizen-DNA oder cDNA aus 1 µg gesamt RNA, 0,5 µl Primer Paar (10 pmol/µl jede Primer), 0,25 µl 5 U/µl *GoTaq* DNA Polymerase und H<sub>2</sub>O. Zur Ausschließen von möglichen Kontaminationen wurde parallel zu jedem MM eine H<sub>2</sub>O-Kontrolle (- Matritze) mitamplifiziert. Außerdem, für PCR-Amplifikationen aus cDNA wurden von jeweiligen Stadium die -RT-Kontrollen oder ihre Mischung (-RT-pool) verwendet. Zur Vermeiden unerwarteten Kontaminationen meiste cDNA PCR-Reaktionen wurden unter dem „CleanSpot A PCR/UV Work Station“ angesetzt.

#### **4.1.16. Präparative Polymerase Kettenreaktion (*Pfu*PCR)**

Die *Taq*Pol produziert überwiegend die A-Überhänge im PCR-Produkt, das für T/A-Klonierung (im pGEM-T) günstig, jedoch für präzise Konstruktion von Rekombinanten Expressionsvektoren meist nicht geeignet, besonders wenn die Fehlerrate von diese „schnelle“ Polymerase relativ hoch ist. Im Gegensatz von *Taq*Pol besitzt die *Pfu*-Polymerase (*Pfu*Pol) außer 5'-3' auch die 3'-5' Exonuklease Aktivität (*Proofreading*). Dadurch wird die Fehlerrate im neusynthetisierten DNA-Strang auf Minimum reduziert. Dabei produziert *Pfu*Pol PCR-Produkte mit glatten 5'-3' Enden, die in der Akzeptor-DNA korrekt Integriert werden können. Das Standard-Programm für *Pfu*PCR wurde prinzipiell wie *Taq*PCR gewählt mit Ausnahme von Zyklenanzahl (30 - 34 Zyklen), 1 min Elongationszeit pro kb von der erwarteter Produkts und Temperaturoptimum für *Pfu*-Pol (68 °C).

Jeder 25 µl Standartreaktion für präparativen *Pfu*PCR besteht aus 2,5 µl „10 X Cloned *Pfu* polymerase reaction buffer, 0,5 µl dNTP's (jede 10 mM), 0,5 µl Primer-Paar (10 pmol/µl jede Primer), 0,25 µg DNA-Matritze, 0,5 µl „*PfuTurbo*<sup>®</sup> DNA polymerase“ (2.5 U/ µl) und H<sub>2</sub>O.

#### **4.1.17. Mega-Primer-Mutagenese PCR**

In vorliegende Arbeit sollten die zuvor mittels dem *Taq*PCR und anschließend mit Hilfe von *Pfu*PCR amplifizierten neue XTCF4 cDNA-Mega-Primern im XTCF4C Struktur integriert werden. Die denaturierte Mega-Primer einzelstränge nach der Hybridisierung an der Komplementären Flanken von Matrize, werden von ihren 3'-Enden verlängert und wird nun die zu inserierenden Abschnitt der Mega-Primer in der Mutagenese-PCR-Produkt auftreten. Dadurch können sowohl deletionen als auch die Insertionen von Ziel-DNA erreicht werden. Während  $\Delta$ ex4-Mega-Primer seine Zielsequenz aus dem Matrize deletieren kann, integrieren die XTCF4 C-Terminus Mega-primern mit den neuen XTCF4 cDNAs im TCF4C\_pCS2. Diese Ziel wird durch Mutagenese PCR mittels GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis Kit, nach Vorschriften der Hersteller erreicht.

Pro 50  $\mu$ l Mutagenese-PCR Reaktion wurde als Template jeweils 50 ng XTCF4C-pCS2 Plasmid und 250  $\mu$ g Megaprimern eingesetzt. Das optimale PCR-Programm wurde von Herstellerstandart abweichend eingestellt: Dem Denaturierung von DNA bei 95 °C für 4 min folgen 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95 °C 1 min bei 94°C, weiteren 1 min bei 60 °C und abschließenden 13 min bei 68 °C (DNA-Neusynthese). Zuletzt folgen 10 Minuten Inkubation bei 68 °C und eine abschließende Kühlung bei 4°C.

#### **4.1.18. PCR-Nachweis von unbekanntem XTCF4 mRNA-Sequenzen**

Zur spezifischen Amplifikation von unbekanntem embryonalen XTCF4 CRD -und der C-Terminus cDNA-Sequenzen mit Primerpaare ex3f/ex5r oder ex12f/ex17r wurde analytische *Taq*-PCR durchgeführt. Diese XTCF4 spezifische Primer-Paare, die zu untersuchenden Exon 3-5 und Exon 12-17 Regionen dieses Gens flankieren, sollten aus den embryonalen gesamt cDNAs die Sequenzen bisher nicht bekannten XTCF4-Transkripten amplifizieren. Zur Erweiterung der Suche zwecks Gewinnung mehr Sequenzinformationen der neuen XTCF4 Transkripten, wurden weitere *Taq*-PCRs mit verschiedene Primer Kombinationen durchgeführt. Primerwahl und die PCR-Produktengrößen werden im Ergebnissteil (Kapitel 5.5) besprochen. Zur Nachweis von zeitlichen Expressionsprofils von mRNAs zuerst wurden die RT-Reaktionsprodukte (St/cDNAs) und die – M-MLV RT Negativkontrollen (–RT) als Matrizen für Amplifikation von *ODC*-cDNAs verwendet. Durch mehrere *Taq*PCRs mit

unterschiedlichen Matrizenvolumen und Geldetektion, wurden die ODC-Bandenintensitäten aus alle Stadien-cDNAs miteinander optisch abgeglichen und anschließend mittels „AIDA-ImageAnalyser“-Densitometrie gemessen. Somit wurden die Abweichungen von den densitometrischen Werten zwischen der St/cDNA Banden bis auf 10-15 % reduziert. Diese experimentell ermittelten Volumen wurden als Template-Volumenstandards für Amplifikation der cDNA-Sequenzen und ihre – RT-Kontrollen verwendet.

#### **4.1.19. Herstellung DIG-markierten RNA Sonde für *in situ* Hybridisation**

Die Digoxigenin (DIG)-markierte RNA-Sonde wird mittels DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) nach Herstellervorschriften hergestellt. Als Matrize für Transkription von sense und antisense 329 bp langen DIG-RNAs wurde pGEM-T insert L (Abb. 3A) verwendet. Flankierend zu der MCS enthält pGEM-T *NotI* und *NcoI* Schnittstellen sowie entsprechend die Bindungsstellen für T7 und SP6 RNA-Polymerasen. Durch *NotI* linearisierter Vektor eignet sich dabei für Transkription mit T7-Polymerase und *NcoI* für SP6. Ein 20 µl Reaktionsansatz besteht aus 1 µg linearisiertem Plasmid, 2 µl 10 X DIG-Labeling-Mix, 2 µl passende RNA-Polymerase, 2 µl 10 X Transkriptions Puffer und nukleasefreiem H<sub>2</sub>O. Die Ansätze werden für 2 h bei 37 °C inkubiert, mit Turbo DNase behandelt, über „ProbeQuant™ G-50 Micro Columns“ aufgereinigt im Agarosegel überprüft und bei – 80 °C gelagert.

#### **4.1.20. Herstellung neuer XTCF4-Genkonstrukte**

Zur Herstellung von neuen XTCF4-Genkonstrukte wurde entweder *Pfu*PCR-Deletion von Exon-4 im XTCF4C, Megaprimer Insertion von XTCF4 C-clamp und  $\Delta$ ex4 Sequenzen im XTCF4C und Subklonierung von XTCF4-Fragmente aus einem Quellvektor in den erwünschten Zielvektoren angewendet.

#### **4.1.21. Sequenzen Analyse**

Zur Sequenzierung von neuen DNA-Sequenzen wurde der GATC Biotech AG beauftragt. Zur Sequenzenanalyse, Vergleich und Planung neuer DNA's, wurde ApE Software Anwendungen benutzt.

#### **4.1.22. *In vitro* Transkription**

Für Synthese von Injektions-mRNAs wurde mMMESSAGE mMACHINE SP6 Transkription Kit verwendet. Die *in vitro* Transkriptionsansätze bestehend aus 3 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 2 x NTP/CAP, 2 µl 10 X *Reaction Buffer*, ca. 1 µg durch *NotI* linearisierte pCS2-Plasmid mit verschiedenen Inserts und 2 µl Enzyme-Mix wurden in Gesamtvolumen von 20 µl auf Eis angesetzt (Reihenfolge wird eingehalten). Die Ansätze werden 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend, werden die Matrize DNA durch DNase I verdaut und über den ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (GE Healthcare) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Nach dem Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle durch analytische Flachbett-Gelelektrophorese, werden die synthetisierte mRNAs aliquotiert und bei – 80 °C gelagert.

#### pCS2-Genkonstrukte für *in vitro* Transkription

hTCF4-S2

hTCF4-E2

XTCF1-Flag

XTCF4C

XTCF4C-E2

XTCF4C-E2ΔR

XTCF4C-Δex4

XTCF4C-Δex4-E2ΔR

mycXTCF4C-Δex4

mycXTCF4C-Δex4-E2ΔR

## **4.2. Zellbiologische Methoden**

### **4.2.1. Zellkultur**

Für Reportergergen Analysen wurden humane Nierenepithelzellen der Linie HEK-293 (*Human Embryonic Kidney-293*) benutzt. Die HEK-293 wurden in DMEM-High Glucose-Vollmedium mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mittels 1 ml Trypsin/EDTA vereinzelt. Die proteolytische Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 12 ml Vollmedium inhibiert. Die Zellen wurden in geeigneter Verdünnung in 5 ml Vollmedium in neuen 5 ml Vollmedium ausgesät. Anschließend wurden sie im Brutschrank bei Standardbedingungen für Säugerzelllinien (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Für Kernlokalisations-Assay der 6-Well-Platte, wurde mit 1 X PBS 1 X gewaschen, 3 runde Galssplätchen



jeweils pro Well reingelegt und mit dem Alcianblau-Lösung bei RT beschichtet. Nach 1 h wurde Alcianblau abgesaugt, die Galssplättchen mit PBS gewaschen und Vollmedium vorgelegt. Anschließend wurde Zellsuspension zugegeben (Gesamtvolumen 2,5 ml/Well). Alle HEK-293 Zellen vor der Transfektion wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert.

#### **4.2.2. Transiente Transfektion der HEK-293 durch CaPO<sub>4</sub>-Methode**

Die hypotriploide HEK-293 Zellen enthalten ein 4,5 kb Sequenz des Adenovirus-SV40 Genoms stabil in ihren Erbgut, können osmotische-, Starvations- und pH-Stress überstehen und sind für CaPO<sub>4</sub>-Präzipitation gut geeignet. Etwa 3 - 4 h vor der Transfektion wurde altes Vollmedium entfernt und die Zellen in DMEM ohne FCS inkubiert. Zur Transfektion wurde jeweils 4 - 5 µg Plasmid -DNA mit 1 ml 1 X HEBS - Puffer (pH 7.12) zugegeben, 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> zugemischt und bei RT für 20 bis 30 Minuten inkubiert. Zu Zellen für Reporteragen-Assays wurden die Transfektionsansätze zugegeben und im Brutschrank 3 - 4 h inkubiert. Altes Medium wurde entfernt und die Zellen in Vollmedium für weitere 48 h bei Standard-Bedingungen wachsen gelassen.

Für das Kernlokalisierung-Assay wurden die Zellen durch gleiche Methode direkt in 6-Well-Platten, mit 3 µl Gesamtvolumen pro Well transfiziert. Die Kontroll-Zellen für beide Assays wurden nach gleicher Methodik behandelt, jedoch ohne Plasmid-DNAs. Die in diesen Versuchen transfizierte Plasmide werden wie folgt dargestellt.

#### Plasmide in Reporterogene- und Kernlokalisierung\* Assays:

XTCF1-Flag\_pCS2  
XTCF4C\_pCS2  
mycXTCF4C-E2ΔR\_pCS2  
mycXTCF4C-Δex4-E2ΔR\_pCS2  
XTCF4C-Δex4\_pCS2 \*  
XTCF4C-E2ΔR\_pCS2 \*  
XTCF4C-Δex4-E2ΔR\_pCS2 \*  
CMV β-Galactosidase  
8 X Super TOP-Flash-*Luciferase*  
Blue-script Xsiam-*Luciferase*

#### **4.2.3. Ernten und Lyse der HEK-293**

Von allen Zellkulturflaschen wurde altes Medium entfernt und die Zellen insgesamt in 1,5 ml 1 X PBS/Flasche abgeschabt. Die Zellsuspensionen (900 µl für  $\beta$ -Gal-Assay und 450 µl für Luziferase-Assay) wurden in die Eppis überführt und 5 min bei 4 °C und 5 000 rpm pelletiert. Die Zellpellets wurden in eiskalten Luci-Lysepuffer oder Tris-Lysepuffer (für  $\beta$ -Gal Assay) resuspendiert und mit 1 ml Injektionsspritze und 0,4 mm Diameter Kanüle homogenisiert. Alle Zellproben wurden 5 min bei 4° C und 13 000 rpm Zentrifugiert, Überstände in neuen Eppis überführt und auf Eis gestellt.

#### **4.2.4. Kernlokalisierung Assay**

Der Nachweis von Kernlokalisierung von neu Hergestellten XTCF4C-Isoformen nach dem Transfektion in HEK-293 sollte durch Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Die Glasplättchen mit Zellen wurden mit  $\text{Ca}^{2+}$ /PBS 3 X 5 min gewaschen und im Feuchtkammer überführt. Zellen wurden mit PFA 10 min lang fixiert und 3 X 5 min mit PBS gewaschen. Die Zellmembranen wurden mit 1 % PBS-T 5 min lang permeabilisiert und mit 0,1 % PBS-T 3 X 5 min gewaschen. Proben wurden im 20 % Pferdeserum für 1/2 h bei raumtemperatur blockiert, Primäre Antikörper mkl Maus  $\alpha$ -TCF3/4 (1 : 500 in 20 % Pferdeserum/PBS-T, 100 µl/Glasplättchen) gegeben und über Nacht im Dunkel bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit 0,1 % PBS-T 3 X 5 min gewaschen und zusammen mit Sekundären Antikörper pkl GAM-Cy3 (1 : 200 in 20 % Pferdeserum /PBS-T, 100 µl pro Plättchen), bei 37 °C, 1 h inkubiert. Die Proben wurden mit 0,1 % PBS-T 3 X 5 min gewaschen, 2 min mit DAPI (1 : 10 000) bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3 X 5 min mit 1 X PBS gewaschen. Auf den Objektträgern wurde jeweils ein Tropfen Moviol platziert, die Glasplättchen umgedreht, mit Zellen auf dem Moviol, eingebettet und über Nacht bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Anschließend wurden die Proben mittels inverser Fluoreszenzmikroskop von Leica in 40 000 fachen Vergrößerung detektiert und mit Hilfe von OpenLab Software dokumentiert.

#### **4.2.5. Reportergene Assay**

In Reportergene-Assay wurde eine Kombination von  *$\beta$ -Galactosidase*-und *Luciferase*-Reporter benutzt. In diese enzymatische Assay überführt die  $\beta$ -

Galactosidase ihre farblose Substrat Galactoside in einem gelblichen Produkt, das durch Spektralphotometrischen Messung registriert werden kann. Während der Biolumineszenz-Assay durch die Luciferase oxidierte Luciferin emittiert Licht, welche durch Luminometer gemessen wird.

Die an das Super TOP-Flash (STF) mit 8 X CCCCCTTTGATCTT-WREs oder der Xsiamois Promotorfragmente (Siam) gesteuerte *Luciferase* Gen sollte in HEK-293 Auskunft über aktivierenden Eigenschaften von TCFs liefern. Hierfür, wurde jeweils 20 µl des zellularen Proteinextrakts 100 µl Luciferase-Assay-Reagenz zugegeben und die RLU (*Relative Light Units*) mittels Luminometer gemessen (Linearen Bereich liegt zwischen 0,2 - 0,8 OD). Der konstitutiv exprimierende CMV- $\beta$ -Gal wurde als Normierungs-Reporter zusammen mit jeder TCF-Isoform und negativkontrollen transfiziert. Jeweils 20 µl aus  $\beta$ -Gal-Lysate wurden mit der  $\beta$ -Gal-Reaktionsansatz bis auf 540 µl aufgefüllt und zusammen mit einem 540 µl Reaktions-Ansatz (als Null-Wert ohne Proteinextrakt) bei 37 °C in Wärmebad inkubiert, bis eine leichte Gelbfärbung entstanden ist (ca. ½ h). Danach wurde mit 1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (1 ml/Ansatz) die Reaktion gestoppt und ihre OD( $\lambda=420$  nm) mittels Photometer gemessen. Zur Berechnung der Relativen Aktivitäts-Einheiten (RAE) sollten die Luciferin-RLU-Werte von den einzelnen Proben durch entsprechende OD-Werte den  $\beta$ -Gal-Ansätze dividiert werden. Diese quantitativen Ergebnisse sollten nun Statistisch ausgewertet werden.

### **4.3. Entwicklungsbiologische Methoden**

#### **4.3.1. Tierhaltung**

In Aquarien bei einer Wassertemperatur von 18 - 29 °C werden die geschlechtsreife *Xenopus laevis* nach Geschlechtern getrennt im ca. 5 L Wasser pro Tier gehalten. Das Wasser zirkuliert zwischen Aquarien und UV-Entkeimungsanlage über einer Bakterienfilter. Die Räumen für Tierhaltung werden 14 h pro Tag hell belichtet. Die Frosche werden hauptsächlich mit Fertigfutter ernährt. Zusätzlich bekommen sie gehacktes Rinderherz einmal in die Woche. Frosche, die Aquarien verlassen haben und für Eiablage benutzt wurden, werden vor dem zurücksetzen in Aquarien aus hygienischen Gründen über Nacht im 0,3 % Meeressalzlösung gehalten. Die Leger werden bis zum nächsten Eiablage für mindestens zwei Monaten in Ruhe gelassen.

### **4.3.2. Eiablage**

Eireifung bei *Xenopus* wird durch subkutanen Injektion der HCG (humanes Choriongonadotropin), welche vom Follikel­epithel in Progesteron umgesetzt wird in der dorsalen Lymphsack injiziert. Etwa 14 - 16 h vor der Eiablage wird 600 u HCG verabreicht. Vor 20 - 22 h wird zunächst 50 u HCG injiziert und anschliessend vor 6 - 8 h vor dem Eiablage mit 600 u ergänzt. Die Frosche werden mit bestimmten Handgriff (Hynterbeine sollen fixiert sein) aus dem Wasser entnommen und die zur Eiablage mit leichtem Massieren von anteriorem zu posteriorer Richtung stimuliert. Die Eier werden im 10 cm Petrischalen gesammelt.

### **4.3.3. Testektomie**

Die maskuline *X. laevis* wird im kaltem 0,25 % Aminobenzo­esäure-Ethylester Lösung bis zum aufheben von mechanischen Reflexen (ca. 1/2 h) betäubt und das Tier durch Durchschneiden der Halswirbelsäule getötet. Die Bauchhölle wird mit dem Schere geöffnet und die Hoden-Paar, die sich anatomisch in dorsalen Fettgewebe, ventral von den Nieren befinden, werden von benachbarten Geweben freigelegt, entnommen und in 1 X MBSH bei 4 °C gelagert. Die Qualität nimmt mit der Zeit ab und maximale Lagerungszeitraum kann nur 4 - 5 Tagen betragen.

### **4.3.4. In-vitro-Fertilisation**

Etwa 1/4 - 1/3 Testis wird in ca. 1ml 1 X MBSH mit dem Skalpell mazeriert. Frische Gelege wird 100 µl dieser Suspension zugegeben, mit 900 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und verrührt. In wenigen Minuten werden die Zygoten an ihren pigmentierten animalen Polen erkannt, da während der „Cortical Rotation“ die vegetale Seiten nach Schalenboden positioniert werden. Zur Separation der Embryos voneinander wird Gelege nach 1 h Befruchtungszeit mit 2 % Cysteinlösung 5 - 10 min überschichtet und wieder mit 0,1 X MBSH ausgewaschen. Die synchron entwickelnden Embryos teilen sich zweimal versetzt meridional und erreichen bei Raumtemperatur in ca. 2 – 2 ½ h nach der Fertilisation Vierzellstadium. Durch niedrigere Temperaturen (12-14 °C im Inkubator) kann die Furchungsgeschwindigkeit verlangsamt werden.

#### 4.3.5. Mikroinjektion für Doppelachsen Assay

Das Injektionsvolumen werden über einen der Injektionsnadel an der 4 nl Gitter eingestellt. Zur Injektion wurden die Glaskapillare mit 4 - 6 µl jeweiligen synthetischer mRNA befüllt und mittels pneumatischer Mikroinjektionsanlage über N<sub>2</sub>-Gasdruck eine definierte Menge des Injektionslösungs in die Zellen eingebracht. Im vorliegenden Versuche wurde immer 500 pg mRNA in 4 nl pro Zelle injiziert.

#### Synthetische mRNAs für Mikroinjektion (Abb. 10)

hTCF4-S2  
hTCF4-E2  
XTCF1-Flag  
XTCF4C  
XTCF4C-E2  
XTCF4C-E2ΔR  
XTCF4C-Δex4  
XTCF4C-Δex4-E2ΔR  
mycXTCF4C-Δex4  
mycXTCF4C-Δex4-E2ΔR

Für Erzeugung ektopischen Körperachsen im *X. laevis* werden die Vier-Zell-Stadium Embryos in zwei Ventralen Blastomeren Mrginalzonen in die Nähe von ihren Furchungsspalte injiziert und bis Neurulastadien (manschmal auch alter) bei 12 - 14 °C in der Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden die Phänotypen visuell ausgewertet, im MEMFA-fixiert und mit Hilfe von Leica Binokularmikroskop und OpenLab Software dokumentiert.

#### 4.3.6. Fixierung von *X. laevis* Embryonen

Jeweils 10 – 12 Embryos unterschiedlicher Embryonalstadien werden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei – 80 °C gelagert. Für *in situ* Assay wird die Vitelinhülle von Embryonen entfernt und werden sie dann im MEMFA 1 h fixiert. Danach werden die fixierte Embryonen durch waschen in aufsteigender MetOH Konzentrationsreihe dehydriert und in 100 % MetOH 4 °C bis – 20 °C gelagert. Die Embryos in Doppelachsen-Assay werden auch enthüllt, in MEMFA fixiert und bei 4 °C für mehrere Tage aufgehoben.

#### 4.3.7. Ganzkeim *in Situ* Hybridisation Assay

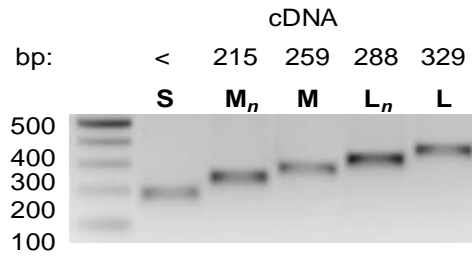
Mittels *in Situ* Hybridisation (ISH) lässt sich die Lokalisation von mRNA in Geweben darstellen. Die Detektion erfolgt durch an den Anti-DIG-Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase (AP), welche BCIP in einen indigoblauen Farbstoff überführt. NBT dient als Oxidationsmittel, welches bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff abreagiert und farbverstärkend wirkt. Die Negativkontrolle (*Sense*) kann nicht an die mRNA binden und wird ausgewaschen. Die *X. laevis* -Embryos werden in MEMFA bei RT° für 1 h fixiert und über eine absteigende Alkoholreihe, bestehend aus 3 X 5 min 100 % und nachfolgenden 70, 50 und 25 % (v/v) MetOH je 5 min, rehydratisiert. Zur Blockierung von unspezifischen RNA-Bindungsstellen und gleichzeitigen spezifischen Hybridisierung von DIG-markierten RNA-Proben werden die Embryonen 4 h im Hybridisations-Puffer, versetzt mit je ca. 1 µg/µl DIG-RNA Sonde, bei 62-65°C inkubiert. Die Sonden werden nun entfernt und die Embryonen werden bei 62 – 65 °C in vier Schritten (Jeweils 10 min) mit den Waschlösungen 1, 2, 3 und 4 und erneut 10 min mit Lösung 4 gewaschen. Im Anschluss werden die Embryonen 2 X 5 min mit PTW und ebenfalls zweimal fünf Minuten mit MAB bei RT° gewaschen und 2 h in MAB-BMB 2% inkubiert, um unspezifisches Binden des Antikörpers zu vermeiden. Anschließend werden die Embryonen mit dem Anti-DIG-Antikörper (150U/200µl) in MAB – BMB 2 % (1 : 3000) für 4h bei RT° inkubiert. Die Antikörperlösung wird durch 1 X MAB ersetzt und die Embryonen werden bei 4 °C üN gewaschen. Nach weitere fünfminütigen Waschschrte mit einmal MAB und AP-Puffer werden die Embryonen mit NTB/BCIP (1,5µl NTB + 1,5µl BCIP pro 1ml AP) 3,5 h gefärbt. Nach dem Bildung des blauen Niederschlags wird die Färbereaktion durch H<sub>2</sub>O abgestoppt. Nachfolgende Dehydratation wird durch eine absteigende MetOH-Konzentrationsreihe aus zweimal MetOH-absolut und jeweils einmal mit 70, 50 und 25 % (v/v) erreicht. Dabei entfernt der Alkohol überschüssigen Farbstoff. Abschließend werden die Embryonen in MEMFA bei RT ° für 1 h fixiert und bei 4°C gelagert. Die Dokumentation von Embryos erfolgte durch Leica Binokularmikroskop und Openlab Software.

## 5. Ergebnisse

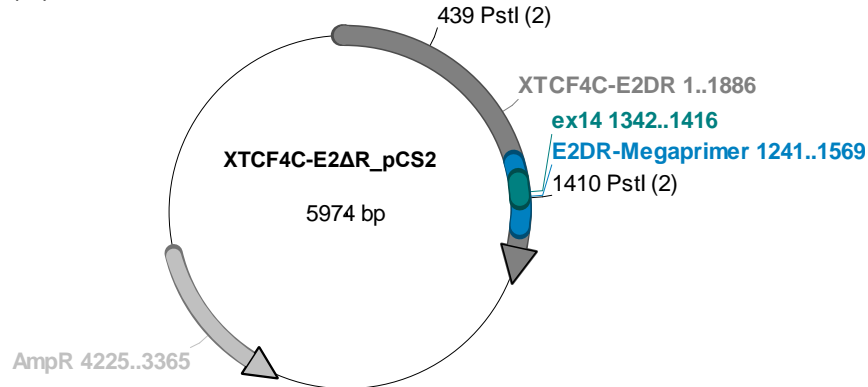
### 5.1. *X. laevis* exprimiert alternative E-tail-Versionen von XTCF4

Sowohl bei Mensch als auch bei *X. laevis* enthalten die TCF4-Gene Sequenzen für die Translation eines langen, C-clamp enthaltenden C-Terminus (E-tail). Zum Nachweis der Expression dieser XTCF4-E-tail Isoformen während der Embryogenese in Frosch wurde der entsprechende Bereich aus cDNA der Stadien 19 und 25 mit spezifischen Primern amplifiziert. Es entstanden Amplifikate in drei unterschiedlichen Größen (Abb.3A). Entsprechend humaner TCF4 Varianten (Weise, et al. 2011), wurden diese cDNAs als S (*small*), M (*medium*) und L (*large*) sortiert. Nach Insertion in den Vektor pGEM-T und Amplifikation in Bakterien, wurden diese Fragmente sequenziert. Die L (E2) und L<sub>n</sub> (E2ΔR) Fragmente von XTCF4-cDNA wurden nach der Amplifikation durch *Pfu*PCR aus pGEM-T in XTCF4C\_pCS2 mittels Mega-Primer-Mutagenese-PCR integriert, in JM-109 vermehrt und durch spezifischen Restriktionsverdau mit *Pst*I überprüft (Abb.3B-B'). Anschliessend, wurden die neuen XTCF4 E2 und E2ΔR cDNAs mehrmals von ihren 3' und 5' Seiten sequenziert. Die Analyse zeigte, dass die mittelgroßen 259 bp (M) und 215 bp (M') Fragmente (Abb.3A) durch Sequenzen entsprechend der humanen Exons 12, 13 und 17 zusammengesetzt sind. Dieses Exonkomposition ist für die XTCF4 Isoformen A, B und C charakteristisch (Pukrop et al. 2001) und entspricht der humanen M-Form. Dagegen, beinhalten die großen 329 bp (L) und 288 bp (L<sub>n</sub>) Fragmente zusätzlich noch Exon 14, inklusive einer für die Aminosäuren CRARF kodierenden Sequenz, entsprechend also der humanen L-Isoform E2 (Abb.3B-C). Wie im humanen TCF4E2 (Weise et al. 2010) führt auch bei beiden XTCF4 L-Fragmenten das Erscheinen des Exon 14 zu einer Verschiebung des Leserasters an der Exon13-Exon17 Spleissgrenze, so dass nachfolgend eine vollständige Cystein-Klammer (C-clamp) translatiert wird (Abb.3C-D), und weiter C-Terminal auch potentielle Bindestellen für CtBP entstehen (Abb.7A, Abb.14). Auf DNA-Ebene, unterscheidet sich die XTCF4 Exon-14 vom seiner humanen Homolog kaum. Die sieben Basen-Austausche im C-clamp kodierenden Bereich verändern die Translation nicht, sodass die Aminosäuren Abfolge identisch bleibt (Abb.3C-D, Abb.11, Abb.12). Interessanterweise wurden hier zwei unterschiedliche L-Isoformen identifiziert. Während eine der Varianten eine zu hTCF4-E2 identische C-clamp besitzt, fehlt der zweiten Variante am 5'-Ende von Exon-17 ein AGA-Triplett und damit das Arginin R<sub>472</sub>.

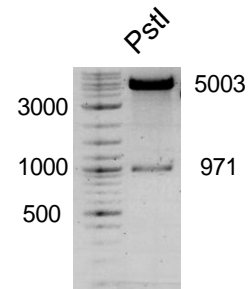
(A)



(B)



(B)'



(C)

			— Ex13 — // ————— Ex14 —————	
XTCF4C-E2	L <sub>n</sub>	1335 >	GATCACAGACCTGAGCGCTCCTAAGAAATGTCGAGCGCGCTTTGGCCTT	
XTCF4C-E2ΔR	L	1335 >	GATCACAGACCTGAGCGCTCCTAAGAAATGTCGAGCGCGCTTTGGCATT	
XTCF4-A, B, C	M	1335 >	GATCACAGA-----	
			----- // ----- Ex17 -----	
XTCF4C-E2	L <sub>n</sub>		GATCAGCAGAATAACTGGTGC GG TCCCTGCAGAAGGAAAAAGAAGTGCA > 1432	
XTCF4C-E2ΔR	L		GATCAGCAGAATAACTGGTGC GG TCCCTGC-----AGGAAAAAGAAGTGCA > 1429	
XTCF4-A, B, C	M		-----AGAAGGAAAAAGAAGTGCA > 1359	

(D)

			Ex13//—————Ex14—————//Ex17—	
XTCF4C-E2	L <sub>n</sub>	446 >	ITDLSAPKKCRARFGLDQNNWCGPCRRKKKC > 477	
XTCF4C-E2ΔR	L	446 >	ITDLSAPKKCRARFGIDQNNWCGPCR-KKKC > 476	
hTCF4E2	L	432 >	ITDLSAPKKCRARFGLDQNNWCGPCRRKKKC > 463	
TCF4C	M	446 >	ITE-----GKRSA > 453	
			—————C-clamp—————	

**Abb. 3.** Nachweis von XTCF4 E-tail Spleissvarianten: A) Amplifikationen von cDNA aus Schwanzknospenstadien mit Primern in Exon-13 und Exon-17 ergaben Produkte unterschiedlicher Größe. Das cDNA-Fragment S (konnte nicht sequenziert werden), M (259 bp) und L (329 bp) sowie die *nested*-PCR-Produkte M<sub>n</sub> (215) und L<sub>n</sub> (288 bp) wurden über pGEM-T in pCS2 insertiert (B) und durch *Pst*I-Verdau überprüft, XTCF4C-E2ΔR-pCS2 (B'). (C). Der Vergleich der E2 XTCF4-Isoformen mit hTCF4E2 zeigt, dass die Aminosäuren-Zusammensetzung der C-clamp (hellblau) zwischen Frosch und Mensch identisch ist. (D) Der Variante E2ΔR fehlt jedoch das Arginin R<sub>472</sub> an der Grenze von Exon-14 und Exon-17.



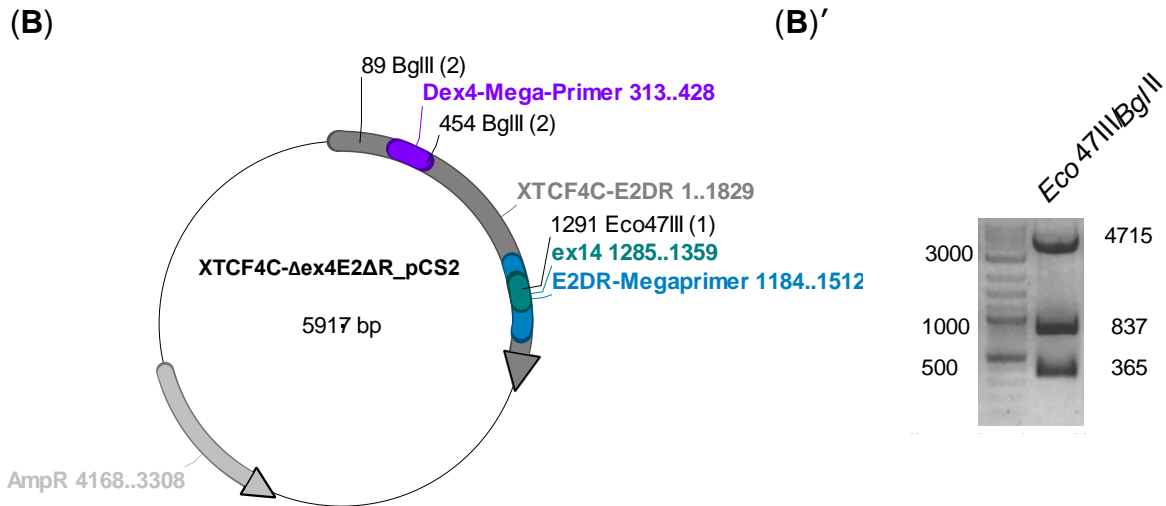
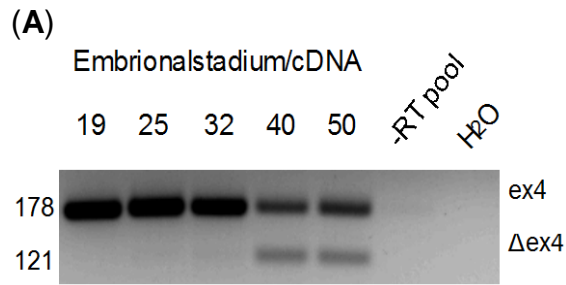
Außerdem ist durch C/A-Inversion am Position 1381 Ley-461 durch Ile ersetzt (Abb.3C-D, Abb.12).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in *X. laevis* XTCF4 C-clamp Versionen (E2) vorkommen, die mit ihrem humanen Homolog nahezu identisch sind. Darüber hinaus, wird hier zum ersten Mal die Existenz von  $\Delta R_{472}$ -Version (E2 $\Delta R$ ) des E-tails im Frosch gezeigt, die bis jetzt beim Menschen nicht identifiziert wurde.

## 5.2. Exon-4 wird in XTCF4 alternativ gespleisst

Neben Variationen im C-Terminus findet alternatives Spleissen von TCF4 hauptsächlich in der CRD statt. Hier entstehen bei XTCF4 unter Ausnutzung alternativer Spleiss-Donor und Spleiss-Akzeptor Stellen die Varianten XTCF4-A, B und C (Pukrop et al, 2001, Gradl et al. 2002). Das Primärtranskript des humanen TCF4 kann durch alternative RNA-Spleißen zusätzlich das Exon4 verlieren, was dem entsprechenden Transkriptionsfaktor aktivierende Eigenschaften verleiht (Weise et al. 2010). Solche Spleissmuster der CRD von XTCF4 wurden bis jetzt nicht beschrieben.

Die Exon4-Sequenzen von hTCF4 und XTCF4 unterscheiden sich voneinander auf DNA-Ebene auffallend, während die flankierenden Sequenzen der Exon-3 und Exon-5 evolutionär hochkonserviert sind (Abb.4C-D, Abb.13). Mittels ex3f und ex5r Primern (5'-Enden: + 313 und + 490 entsprechend in XTCF4) wurde cDNA aus *Xenopus* Embryonal-Stadien über den entsprechenden Bereich der CRD amplifiziert. Dabei entstanden zwei 178 bp und 121 bp große DNA-Produkte (Abb.4A). Das kürzere wurde über Sequenzierungen als XTCF4 Fragment identifiziert, dem das Exon 4 fehlt, das längere entspricht XTCF4 mit Exon-4. Mittels Mega-Primer-Mutagenese-PCR wurde das kürzere Fragment in XTCF4C-E2 $\Delta R$ \_pCS2 (Abb.3B) eingebaut und dadurch Exon-4 entfernt. Das resultierende XTCF4C- $\Delta$ ex4-E2 $\Delta R$ \_pCS2 Konstrukt wurde durch Sequenzierungen verifiziert. Somit wurde hier nachgewiesen, dass im *X. laevis* Exon-4 alternativ gespleisst wird, und es wurde ein Konstrukt hergestellt, durch Überexpressionsstudien die Funktion diese Spleissvariante zu untersuchen. Entsprechende Expressionskonstrukte wurden auch für XTCF4C- $\Delta$ ex4 mit dem M-Form C-terminus und mit dem E2-C-terminus erstellt (Abb.15).



(C)

	Ex3	//	Ex4	
XTCF4C-E2ΔR-ΔEx4	361 >	TCCCCTACTGCGCGACAG	-----	>
XTCF4-A, B, C	361 >	TCCCCACTGCGCGACAGTGC	GTGAATGTACCACTAGATCTGCATT	>
		//	Ex5	
XTCF4C-E2ΔR-ΔEx4		-----	TATCTGCAGATGAAATGGC	> 393
XTCF4-A, B, C		TAGCCTCTTGTTCAGCCCTTT	CATGCAGTATCTGCAGATGAAATGGC	> 454

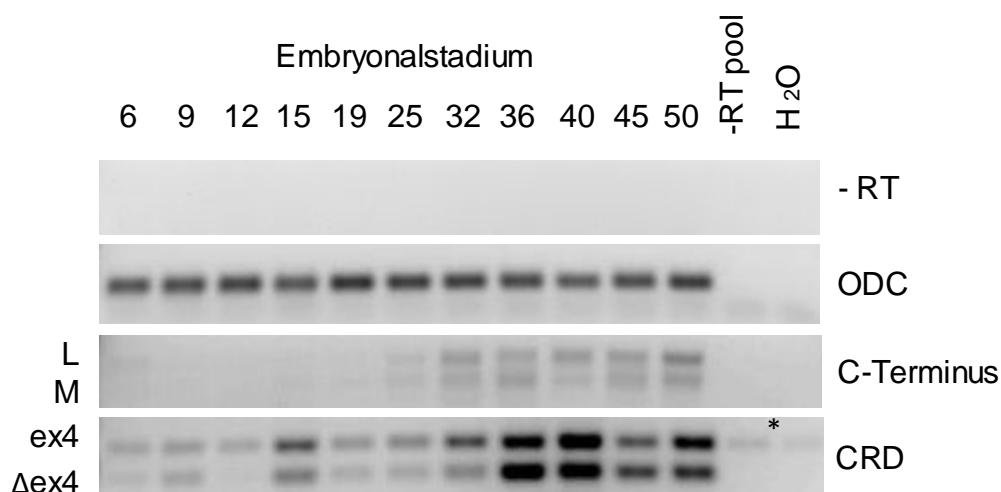
(D)

	-Ex3	//	Ex4	//	Ex5	
XTCF4C-E2ΔR-ΔEx4	121 >	SPTAR	-----	QYLQMKW	>	132
XTCF4-A, B, C	121 >	SPTAR	----QCVN-VPLDL----	HLASCCSPFMQYLQMKW	>	151
hTCF4-E2, S2, M2	122 >	SPTAR	-----	YLQMKW	>	133
hTCF4E2ex4	122 >	SPTAR	LHFQSG-STHY-SAYKTIEH-QIA-V-	QYLQMKW	>	156

**Abb. 4.** In *X. laevis* wird Exon-4 alternativ gespleisst. A) Aus Embryonale cDNA Stadien 40 und 50 wurde durch TaqPCR mit ex3f/ex5r Primer ein Δex4-Fragment amplifiziert und B) im XTCF4C-EΔR\_pCS2 mittels Mega-Primer Mutagenese-PCR eingebaut. Durch Kontroll-Verdau mit Eco47III/BglII (B)' entsteht ein Δex4-spezifisches 365 bp und eine XTCF4 spezifisches 837 bp Fragment. C) Die Sequenzenanalyse des Mutagenese-PCR Produkts zeigte, dass dem neuen Konstrukt im Vergleich zu XTCF4 A, B und C alle 57 bp des Exon-4 fehlen. Die Translation dieser Δex4-mRNA Fragments liefert eine Variante bei der Exon-3 und Exon-5 verknüpft sind und die der entsprechenden Variante aus hTCF4 sehr ähnlich ist (D). Dagegen unterscheidet sich die Aminosäuren-Zusammensetzung innerhalb des Exon-4 zwischen XTCF4 und hTCF4E2ex4 beträchtlich.

### 5.3. Die E-tail und $\Delta$ ex4 XTCF4 werden im Embryogenese zeitgleich mit XTCF4-A, B und C- exprimiert

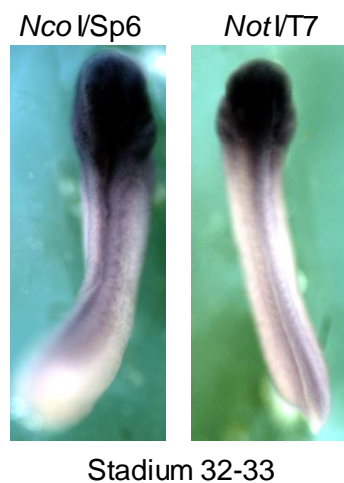
Nächstfolgend wurde die zeitliche Expressionsmuster von C-clamp und  $\Delta$ ex4 XTCF4-Sequenzen in der frühen Embryonalentwicklung mittels TaqPCR überprüft (Abb.5). Zur Normalisierung diente eine Amplifikation des Haushaltsgens *Ornithin Decarboxylase* (ODC). Die Amplifikation mit den Varianten-spezifischen Primerpaaren ergab, dass die L- und M-Isoformen von XTCF4 zeitgleich ab der späten Neurula auftreten. Das Expressionsprofil entspricht dem ursprünglich für XTCF4 gezeigten Profil (König et al. 2000). Auch die Variationen in der CRD durch alternatives Spleissen des Exon-4 scheinen nicht zeitlich reguliert zu sein. Beide Varianten, mit und ohne Exon-4, erscheinen immer zusammen. Dabei ist hier XTCF4, wie bei (Standley et al. 2006) bereits maternal nachweisbar (Abb.5).



**Abb. 5.** Zur Nachweis des Expressionsprofils der L -und  $\Delta$ ex4- XTCF4 Varianten wurde 1  $\mu$ g des jeweiligen embryonalern gesamt RNAs aus *X. laevis* mittels M-MLV-RT revers transkribiert. Die Ansätze ohne M-MLV RT (-RT) und H<sub>2</sub>O (anstatt cDNA) dienen dem Ausschluss möglicher DNA-Kontaminationen. Die Amplifikation des Haushaltsgens ODC zeigt, dass bei allen Stadien vergleichbare cDNA-Mengen eingesetzt wurden. Zur Amplifikation der TCF4 L-cDNAs mit CRARF-Domäne wurde das Primerpaar ex12f/ex17r benutzt. Die M-Variante liefert ca. 260 bp, L-Varianten ca. 330 bp Banden. Mit dem Primerpaar ex3f/ex5r wurde neben dem 178 bp cDNA (XTCF4 mit Exon-4) auch die 121 bp lange Sequenz ohne Exon-4 ( $\Delta$ ex4) amplifiziert. Die Existenz der mindestens einen XTCF4- $\Delta$ ex4 mRNA-Population ist in allen gewählten Entwicklungsstadien von 6 bis 50 zu beobachten. (\*) Zeigt einen Verunreinigung des Gels.

#### 5.4. Ganzkeim *in situ* Nachweis XTCF4-E-tail Isoformen

Durch *in situ* Hybridisation sollte das räumliche Expressionsmuster von XTCF4 E-tail Isoformen geprüft werden. Hierfür wurden sense und antisense Sonden aus dem in pGEM-T-insertierten 288 bp Produkt (Abb.3A) synthetisiert. Dabei zeigten diese beide DIG-markierten RNAs nach der Hybridisierung keinen Unterschied (Abb.6). Somit ist dieses Fragment ungeeignet, die räumliche Expression des Exon 14 und damit des CRARF Motivs aufzuklären.



**Abb. 6.** Ganzkeim *in situ* Hybridisation von DIG-markierter XTCF4-E2ΔR sense-und antisense RNAs an den *X.laevis* Stadium 32-33 Albinos-Embryos: NcoI Sp6 zeigt die Hybridisierung mit sense, Not T7 die Hybridisierung mit antisense Sonde. Es konnte kein Unterschied in Hybridisation von diesen Sequenzen beobachtet werden. Die Unspezifische Bindung wird hier durch Starken Indigofarbige Niederschlag erkannt.

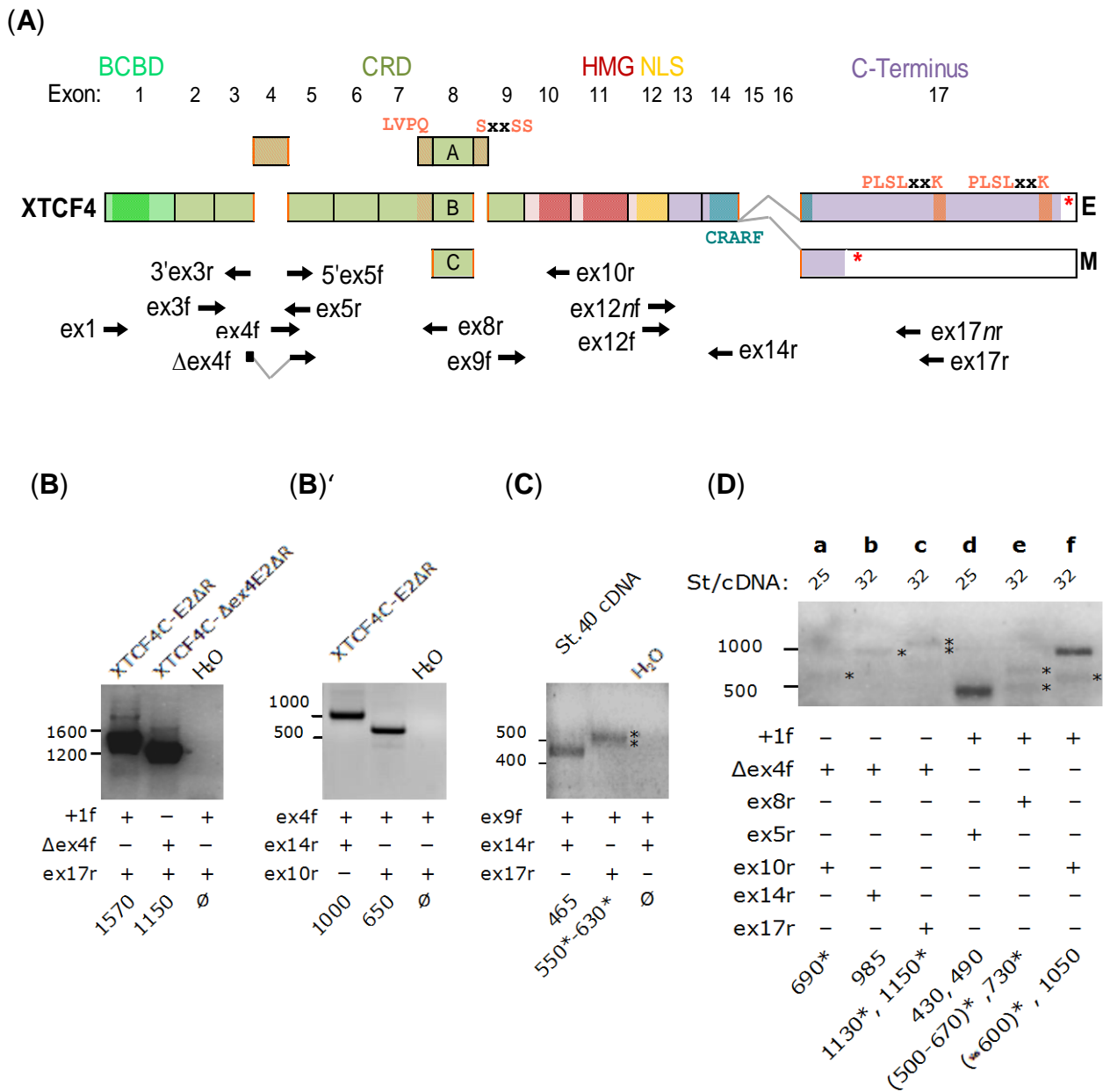
## 5.5. Cystein Klammer und Exon-4 erscheinen separat oder zusammen

Bisher wurde bestätigt, dass sowohl Exon 4 als auch Exon 14 im Frosch alternativ gespleisst werden. Ob jedoch auch XTCF4- Varianten existieren, die Exon 4 und Exon 14 gleichzeitig exprimieren, bzw. keines der beiden Exons, war noch unklar. Die Existenz dieser Varianten wurde versucht mittels analytischer PCR nachzuweisen. Hierfür wurden durch vielzählige Primerkombinationen unterschiedliche Bereiche der XTCF4 cDNA amplifiziert (Abb.7A).

Vor allem war dabei interessant, ob Varianten exprimiert werden, denen Exon 4 fehlt, die aber das CRARF Motiv beinhalten, also Varianten ähnlich den humanen Formen hTCF4 S2 und E2. Die Spezifität der neu synthetisierter Primern ex1f,  $\Delta$ ex4f, ex4f, und ex14r wurde durch Positivkontrollen (XTCF4C-E2 $\Delta$ R und XTCF4C- $\Delta$ ex4-E2 $\Delta$ R Vektoren) überprüft und bestätigt (Abb.7A-B').

Ein XTCF4 cDNA-Fragment, das neben dem Exon-9 auch Exon-10 bis 12 (HMG-NLS) und dazu noch Exon-14 beinhaltet, liefert mit dem Primerpaar ex9f/ex14r eine ca. 465 bp große Bande (Abb.7C). Wird dagegen von Exon-9 bis Exon-17 amplifiziert, entstehen wie erwartet zwei Banden, die sich voneinander durch etwa 80 bp unterscheiden. Diese sind etwa 550 bp für die E-Variante und ca. 630 bp für den M-Form C-Terminus (Abb.7C).

Die  $\Delta$ ex4-TCF4-Varianten, die die HMG-Box enthält, liefert nach Amplifikation mittels  $\Delta$ ex4f/ex10r Primer-Paar ein 690 bp großes Fragment (Abb.7D.a), allerdings gibt es damit noch keine Auskunft ob das entsprechende Transkript auch eine Cystein-Klammer und einen langen E-tail beinhaltet. Deshalb wurde die gleiche forward Primer mit einem Exon 14 (CRARF)-spezifische ex14r Primer kombiniert. Diese PCR sollte ein etwa 985 bp großes Amplifikat liefern. Tatsächlich war dieses Fragment zu sehen (Abb.7D.b). Diese XTCF4-mRNA Kopie kann für XTCF4- $\Delta$ ex4-E, ähnlich wie hTCF4E2, oder für  $\Delta$ ex4-XTCF4 mit unvollständiger Cystein-Klammer kodieren, entsprechend hTCF4E2 oder hTCF4-S2. Die weitere Amplifikation mittels  $\Delta$ ex4f und ex17r-Primern sollte zeigen, ob hier wieder eine Doppelbande entsteht. Diese Banden sind allerdings voneinander nur sehr schlecht zu unterscheiden, weil der Unterschied nicht mehr als etwa 20 bp beträgt. Tatsächlich kann man nicht abschätzen ob es sich dabei um zwei verschiedene  $\Delta$ ex4-Isoformen handelt, davon eine mit M- und eine mit E-teil C-Terminus. Das PCR-Produkt war wie erwartet zwischen 1130 bp bis 1150 bp gross (Abb.7D.c).



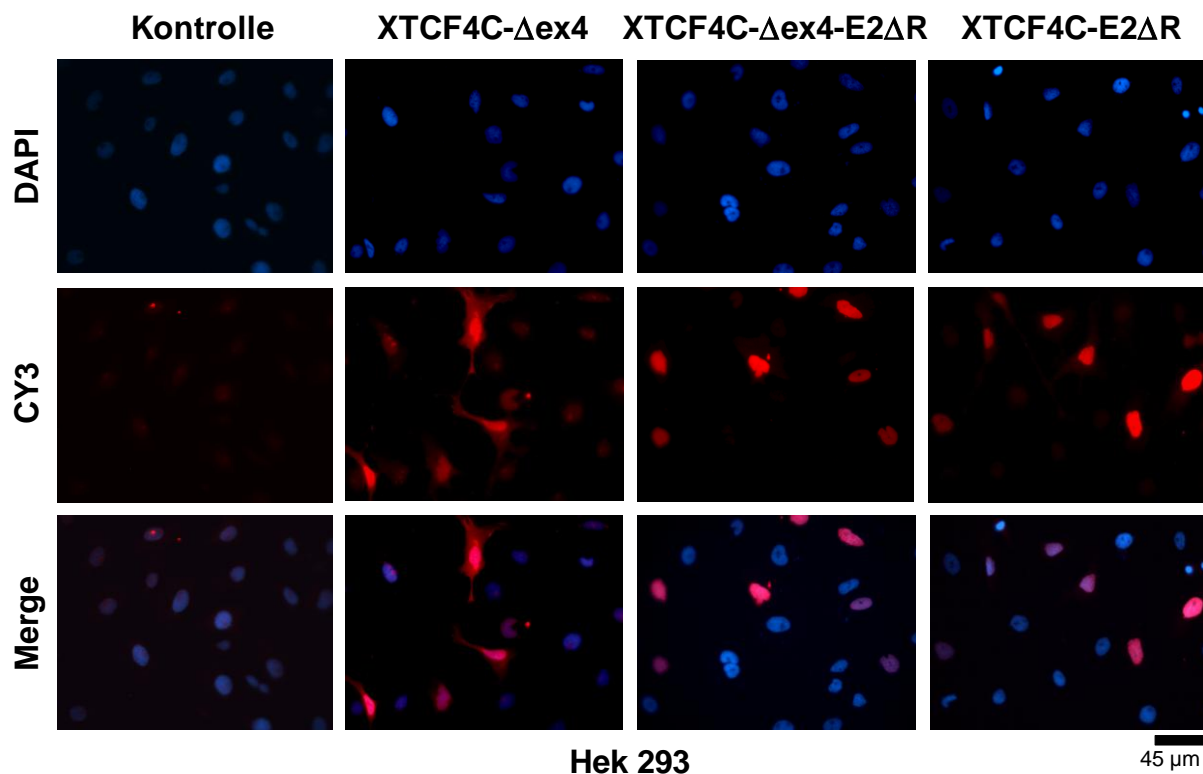
**Abb. 7.** A) PCR-Untersuchung XTCF4-Transkripte unterschiedlicher Embryonalstadien mittels verschiedener Exon-spezifischer Primern. (A) zeigt schematisch die Struktur eines standardisierten XTCF4 und die Lage der verwendeten Primer. (B) und (B)' zeigen ausgewählte Positivkontrollen (pCS2\_XTCF4-Konstrukte) mit den entsprechenden cDNA Sequenzen als Matrize. (C) und (D) zeigen Amplifikationen mit diversen Primerkombinationen aus cDNA unterschiedlicher Embryonalstadien. Die Zahlen unterhalb der Teilabbildungen stellen die erwartete cDNA-Größe dar. Die Sternchen markieren die Lage schwache Banden.

Die alternative Variante welche neben dem Exon-4 auch C-clamp bzw. E-tail besitzt, wurde versucht, über eine Kombination des ex4f Primers sowohl mit ex14r als auch mit ex17nr und ex17r zu identifizieren. Dabei lieferte das ex4f/ex14r-Primer-Paar eine erwartete, allerdings sehr schwache Bande, die wie bei der Positivkontrolle 1000 bp gross ist (nicht gezeigt). Ausserdem wurde versucht, die +1f-Primer mit den C-terminus Primer ex14r und ex17r zu kombinieren Diese PCR lieferte keine Produkte der erwarteten Größe (nicht gezeigt).

Von dem Transkriptionsstart bis Exon-5 beträgt die Nukleotidenzahl ca. 430 bp in  $\Delta$ ex4-TCF4 Isoformen und ca. 490 bp mit Exon-4. Zur Amplifikation diesen cDNA-Sequenzen wurde das Primerpaar +1f/ex5r benutzt. Das Produkt (Abb.7D.d) zeigte die erwartete Größe. Ob es sich um das 490 bp Fragment, das 430 bp Fragment oder eine unzureichend aufgetrennte Doppelbande handelt, ist nicht zu erkennen. Die nächste Amplifikation vom Startcodon bis Exon-8 wurde mit Hilfe von +1f/ex8r-Primerpaar versucht. Von den im Abb.7D.e dargestellten zwei Banden, entspricht die obere dem erwarteten 730 bp bzw 670 bp PCR-Produkt mit, bzw ohne Exon-4. Auch hier ist nicht zu unterscheiden, welche Variante amplifiziert wurde. Die zusätzliche Bande bei 500 bp deutet auf eine weitere, in der CRD verkürzte alternative Variante. Auch die Amplifikation vom Startcodon bis zur HMG-Box (Primer ex10r) lieferte zwei Banden. Auch hier kann nicht entschieden werden, ob das grössere Produkt mit 1050 bp die Variante mit Exon-4 darstellt oder 990 bp die Variante ohne Exon 4 oder beide. Auch hier erscheint mit ca 600 bp ein Fragment, das auf eine zusätzliche in der CRD verkürzte Variante hindeutet.

## 5.6. Die XTCF4C-E-tail-und $\Delta$ ex4-Varianten lokalisieren im Zellkern

Die Kernlokalisierungsfähigkeit neuer XTCF4\_pCS2-Genkonstrukte  $\Delta$ ex4,  $\Delta$ ex4-E2 $\Delta$ R und E2 $\Delta$ R wurde durch Überexpression in HEK-293, indirekter Immunfärbung der fixierten Zellen und anschließender Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Der dabei verwendete Antikörper erkennt endogenes TCF3 und TCF4 (Gradl et al. 2002), sowie die überexprimierten Konstrukte. Da die überexprimierten TCFs in deutlich größeren Mengen vorliegen als die endogenen TCFs erscheinen nach kurzer Belichtungszeit ausschließlich die transient transfizierten Varianten. Endogene TCFs werden erst nach langer Exposition sichtbar (nicht gezeigt). Die Ergebnisse in Abb.8 zeigen, dass alle neuen XTCF4 Isoformen tatsächlich in die Zellkerne lokalisiert waren.

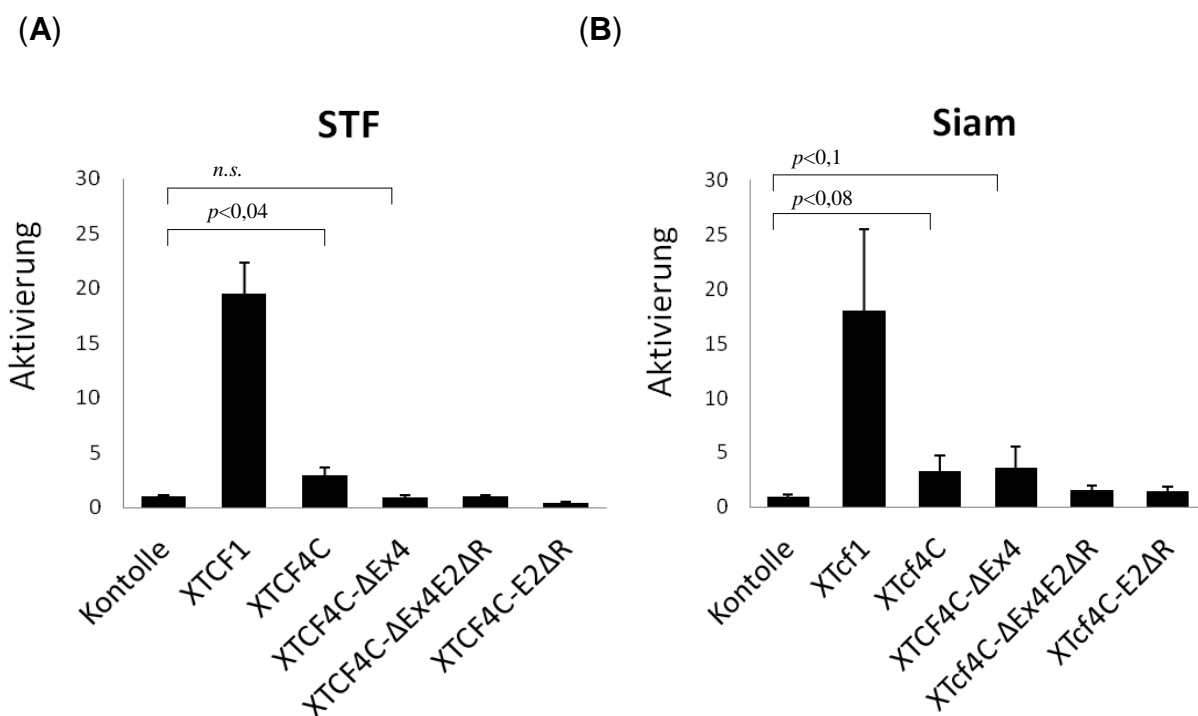


**Abb. 8.** Subzelluläre Lokalisation der XTCF4C:  $\Delta$ ex4,  $\Delta$ ex4-E2 $\Delta$ R und E2 $\Delta$ R Proteine in HEK-293 Zellen. Zellen wurden mit 4  $\mu$ g des entsprechenden Konstrukts transfiziert und bei Standardbedingungen für ca. 48 h inkubiert. Anschliessend wurde HEK-283 mit PFA fixiert, immunhistochemisch über einen murinen  $\alpha$ -TCF3/4 Antikörper markiert und durch einen Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt. Zur Markierung der Kerne wurde DAPI verwendet. Die überexprimierte XTCF4 Proteine zeigen viel höhere Cy3-Emission als nicht-transfizierte Kontrollen. Die nur partielle Überlagerung von DAPI und Cy3 zeigt eine geringe Transfektionseffizienz. Allerdings konnten die alle drei XTCF4 Proteine zuverlässig im Kern nachgewiesen werden.



## 5.7. XTCF4C-E2ΔR- und Δex4-Varianten besitzen Unterschiedlichen promotoraktivierenden Eigenschaften

Im vorliegenden Experiment wurde überprüft, ob die neue XTCF4-Varianten ähnliche Transaktivierungskapazität besitzen wie ihre humane Homologe. Hierfür wurden die 8 X Super Top-Flash (STF) und Siamois (Sia) Promotoren mit *Luciferase* als Reporter gen in transient transfizierten HEK-293 Zellen verwendet. Zur Normierung der Reporteraktivitäten wurden alle Zellen mit CMV-β-*Gal* co-transfiziert. Als Positivkontrolle wurde der starke transkriptionelle Aktivator XTCF1 verwendet, dagegen dient hier XTCF4C als Negativkontrolle. (Abb.9).



**Abb. 9.** Super TopFlash (STF) (A) und Siamois (B) Reporter gen Analysen mit den neuen XTCF4 Isoformen Δex4, Δex4-E2ΔR und E2ΔR sowie den Kontrollen: unbehandelt, XTCF4C und XTCF1. Die Balken zeigen die X-Fache Aktivierung. Die Fehlerindikatoren stellen die Standardfehler dar. Die Signifikanzwerte (*P*) aus *Student t-Tests* sind gezeigt. A) Alle drei neuen XTCF4 Isoformen konnten den STF nicht aktivieren. Die fache Aktivierung der einzelnen Konstrukte war: Δex4 (0,95), Δex4-E2ΔR (1), E2ΔR (0,43) C (2,9) und XTCF1 (19,5). B) Auch der Siamois Promotor (Sia) konnte kaum aktiviert werden: Kontrolle (1), Δex4 (3,59), Δex4-E2ΔR (1,58), E2ΔR (1,45), C (3,34) und XTCF1 (18).

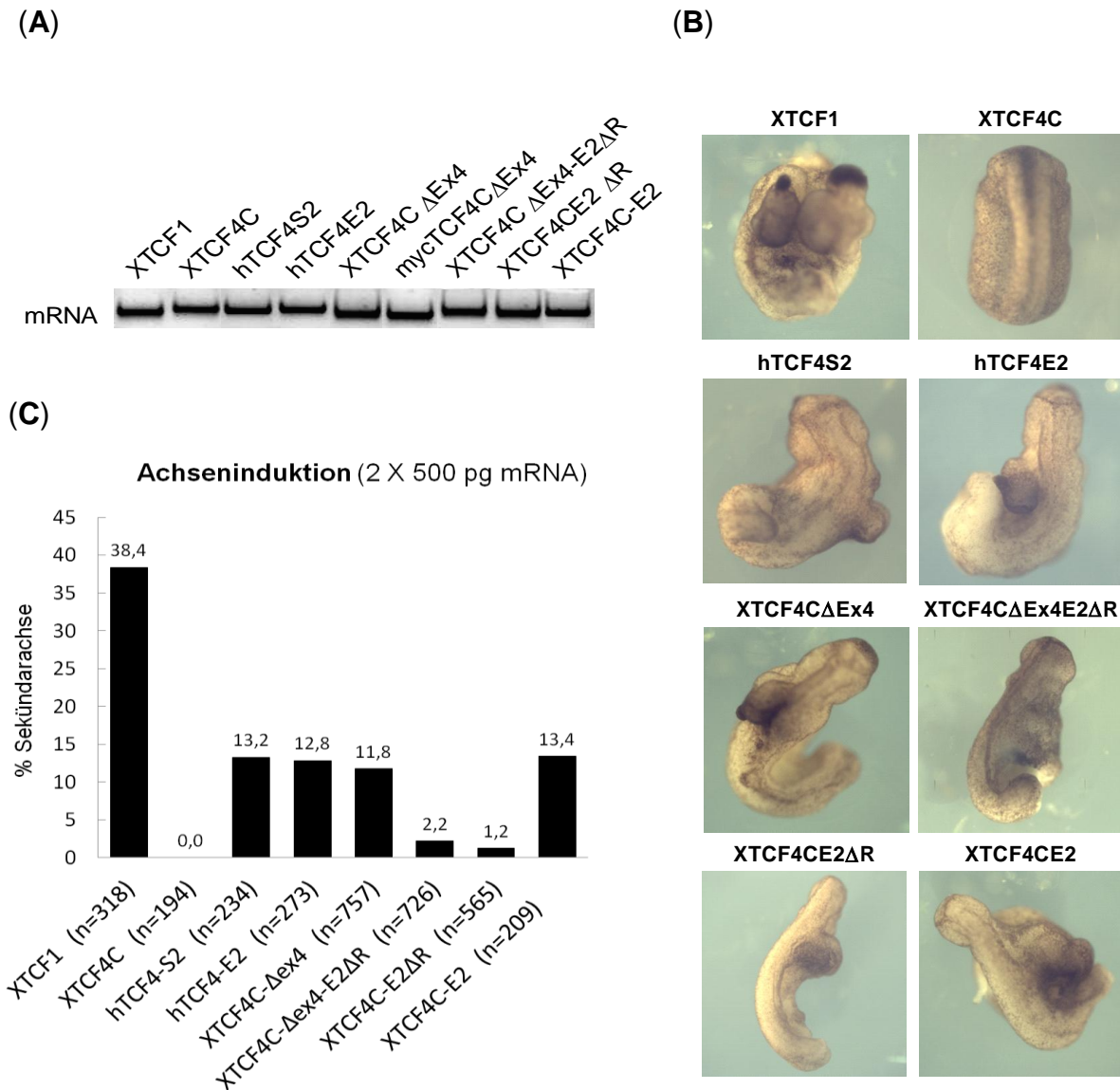
Die Ergebnisse in Abb.9 zeigen, dass alle drei neuen XTCF4 Varianten weder den STF noch den *Siamois* promoter aktivieren konnten. Dabei war auch das Exon-4 bedeutungslos. Die Reaktionen des artifiziellen STF Promoters und des *Siamois*

Promoters auf die transfizierten XTCF4 Konstrukte unterscheiden sich kaum. XTCF4C konnte den *Siamois*-Promoter schwach aktivieren, interessanterweise unabhängig von Exon-4 (Abb.9.B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die neuen XTCF4C- $\Delta$ ex4 ohne exogenes  $\beta$ -catenin den *Siamois*-Promotor ähnlich schwach aktivieren wie hTCF4-M2 (Weise et al. 2010).

### **5.8. C-clamp induziert, Exon-4 reprimiert die Induktion einer sekundären Körperachse**

Nachdem die neuen XTCF4 Varianten in Reporter-gen-Assays an transfizierten Zellkulturzellen inaktiv waren wurde untersucht, inwieweit sie sich im *Xenopus* Achsenduplikationsassay als Aktivatoren erweisen. Hierfür wurden je 500 pg mRNA in die Marginalzone der zwei ventralen Blastomeren im Vier-Zellstadium injiziert. Dabei diente XTCF1 mRNA als Positivkontrolle und XTCF4C als Negativkontrolle, die entsprechenden Varianten des humanen TCF4 dienten als Vergleich. In der späten Neurula läßt sich eine ektopische Körperachse am Y-förmigen Aufspalten des Neuralrohrs erkennen (Abb.10A)

Wie erwartet, führte in der vorliegenden Arbeit die Injektion von XTCF1 bei 38,4 % der injizierten Embryonen zur Ausbildung einer sekundären Körperachse. Die humanen TCF4 Varianten hTCF4-S2 (13,2 %) und hTCF4-E2 (12,8 %) induzierten deutlich weniger ektopische Körperachsen als XTCF1. Dagegen konnte die Injektion von XTCF4-C bei keinem einzigen Embryo eine Doppelachse induzieren (Abb.10C). Ähnlich aktiv wie die humanen TCF4 Varianten war nur XTCF4 Versionen ohne Exon-4 und mit dem M-Form C-Terminus (XTCF4C- $\Delta$ ex4 und mycXTCF4C- $\Delta$ ex4), also ohne CRARF und ohne C-clamp. Dieses Konstrukt, das sich von der Negativkontrolle XTCF4C nur durch das Fehlen des Exon-4 unterscheidet führte bei 11,8 % der injizierten Embryonen zur Ausbildung einer Doppelachse. Überraschenderweise erwies sich das zusätzliche Einfügen von C-clamp Version E2 $\Delta$ R, deutlich reprimierend. Hier bildeten nur 1,2 – 2,2 % der injizierten Embryonen eine zweite Körperachse aus, egal ob Exon-4 vorhanden war oder nicht (Abb.10C). Dagegen war die XTCF4 E-tail Version E2 genauso aktiv wie die  $\Delta$ ex4- Variante mit M-Form C-Terminus. Auch hier bildeten über 10 % der injizierten Embryonen eine sekundäre Körperachse. Effekte von Exon-4 Deletion im XTCF4C-E2 (XTCF4C- $\Delta$ ex4-E2) konnte nicht geprüft werden, theoretisch sollte mehr Doppelachsen induzieren als allein intakter XTCF4-C-clamp (siehe Diskussion).



**Abb. 10.** Doppelachsen Assay neuer XTCF4 und hTCF4 Isoformen in *X.laevis* Embryos. (A) Qualitätskontrolle der injizierten mRNA. Jeweils 3  $\mu$ g mRNA wurden im analytischen Agarosegel visualisiert. (B) *X. laevis* Embryonen nach der ventralen Injektion von 500 pg mRNA: XTCF1 (Positivkontrolle), XTCF4C (Negativkontrolle). *n* zeigt die Summe der auswertbaren Embryonen mRNA. (C) Berechnung der sekundären Achse-Bildung zeigt, dass keiner der XTCF4C-E2 $\Delta$ R im Stande ist, eine ectopische Achse so zu induzieren wie hTCF4-Isoformen. XTCF4C- $\Delta$ ex4 ohne C-clamp induzierte fast gleiche % Doppelachsen wie hTCF4-S2 mit inkomplette C-clamp. Wiederherstellung von Doppelachsen-Bildung konnte durch Austausch von E2 $\Delta$ R durch E2 erreicht werden.

## 6. Diskussion

### 6.1. Identifikation neuer XTCF4 Varianten

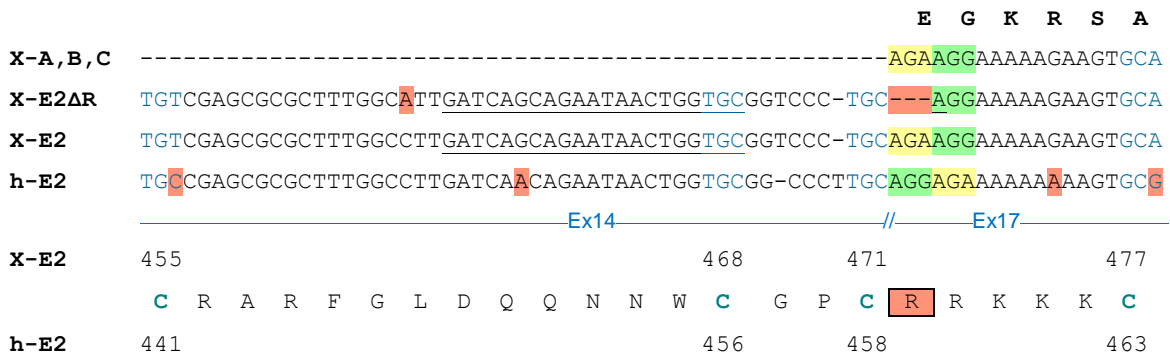
Die bisher bekannten XTCF4 Isoformen A, B und C unterscheiden sich nur durch alternative Spleissdonor und Spleissakzeptor Stellen um Exon 8 (*Pukrop et al, 2001*). Die Proteinstruktur ihrer kurzen C-Termini entsprechen der humanen Isoform hTCF4-M2 (*Pukrop et al. 2001, Weise et al. 2010*). Zwischenzeitlich wurde über dominant negative N-terminal trunkierte XTCF4  $\Delta$ N-Isoformen mit variablen C-Termini berichtet (*Vacik et al. 2011*). Die kürzeste dieser Formen entspricht dem hTCF4-M1, einer Variante, bei der Exon 13 -16 fehlen und ein Stop-Codon 5' in Exon-17 benutzt wird (*Weise et al., 2010*). Die lange Isoform hTCF4-E2 entsteht aus Exon 12, 13, 14 und 17 (*Weise et al., 2010*) und findet seine Entsprechung in der dominant negativen XTCF4 Isoform dnXTCF4  $\Delta$ N-Isoform-3/4 (*Vacik et al. 2011*). Eine XTCF4 Variante mit E-tail und  $\beta$ -Catenin Bindestelle wurde noch nicht beschrieben. Durch PCR-Untersuchung von *X. laevis* cDNA, sowie Klonierung und Sequenzanalyse der Amplifikate wurden in der vorliegenden Arbeit alternative XTCF4- E-tail und  $\Delta$ ex4-CRD -Isoformen nachgewiesen und funktional analysiert.

### 6.2. Variationen im TCF4 C-Terminus

Die Exon-Zusammensetzung von alternativen E-tail-Versionen von XTCF4 entsprechen humanem TCF4-E2. Exon-14 codiert dabei für ein CRARF Motiv, also die ersten fünf Aminosäuren einer Cystein-Klammer. Die äußerste 5'-Base an Exon-14 im XTCF4-E ( $C_{1344}$ , entspricht  $C_{1302}$  in hTCF4-E2 und S2) ergänzt die letzten zwei 3'-Basen von Exon 13 zu AGC, das für Asparaginsäure kodiert, verursacht eine Leserammenverschiebung am Exon-13/Exon-14 Spleissgrenze und führt damit zur Translation eines langen C-Terminus inklusive Cystein-Klammer und CtBP Bindestellen (Abb.3). Interessanterweise unterscheiden sich die beiden E-tail Varianten von XTCF4 ausschliesslich in einer Aminosäure, einem Arginin an Position +472 ( $R_{472}$ ). Diesem entspricht in hTCF4-E2 ein Arginin an Position +459. Im hTCF4 ist dieses Arginin direkt 3' nach dem dritten Cystein der Cysteinklammer ( $C_{458}$ ) durch das erste der beiden für Arginin kodierenden Triplette AGG und AGA kodiert. In XTCF4 ist dies in AGA AGG verändert. In beiden Fällen liegt das erste der beiden Tripletts in Exon-14, das zweite in Exon-17 (Abb.11). Offensichtlich entsteht die

alternative Expression von R<sub>472</sub> also durch alternatives Nutzen von Spleissdonor und Spleissakzeptorstellen. Entsprechende Variationen wurden bei hTCF4 und mTCF4 bisher nicht beobachtet (Weise et al. 2010). Es ist also möglich, dass bei Säugern dieses Spleissmuster nicht existiert. Da *X. laevis* ein pseudotetraploider Organismus ist, könnte die hier beschriebene ΔR<sub>472</sub>-Version im Frosch auch auf genomischen Veränderungen eines Allels beruhen, und nicht aus alternativem Spleissen. Dies ist insofern aber unwahrscheinlich, als Pseudoallele in *Xenopus* auf DNA-Ebene nur zu 96-98% identisch sind und nicht, wie die beiden E-tail Varianten über mehr als 200 bp zu 100% (Gradl, pers. Mitteilung).

Ein andere Aspekt von strukturelle Unterschieds zwischen beiden Versionen langen XTCF4 E-Isoformen und hTCF4 ist, dass diese Orthologe zwischen den zwei CtBP Bindungsstellen im E-tail, anders Translatiert werden (Abb.12). Die „BLAST“-Analyse von diesen AS-Sequenzen zeigte, dass diese DNA-Motive nicht relevant für konservierte Funktionen seien sollten.



**Abb. 11.** Vergleich XTCF4 und *X. laevis* C-clamp Versionen mit M-Form XTCF4. Inversion von RR Kodierende Tripletten gelb und grün markiert. Deletion von R<sub>472</sub> [R] sowie veränderte Basen sind rotmarkiert. As-Sequenz zwischen den E2-Varianten sind identisch. Exon-14/17 Spleissgrenze und R<sub>472</sub> sind markiert. Das Reverse-komplementäre Sequenz von ex14r Primer ist unterstrichen.

### 6.3. Variationen in der CRD

Neben C-terminalen Variationen entscheidet in hTCF4 vor allem auch alternatives Spleissen des Exon-4 in der CRD über die Aktivität des Transkriptionsfaktors (*Weise et al. 2010*). In der Vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch in *Xenopus* das entsprechende Exon alternativ gespleisst wird. Solche XTCF4- $\Delta$ ex4 Varianten haben ähnliche CRDs wie hTCF4-E2, S2 und M2. Durch Sequenzierung von *Xenopus* endogenen 121 bp  $\Delta$ ex4-CRD Fragments (66 bp Exon-3 und 55 bp Exon-5) wurde die Spleissgrenze bzw. Exon-4 Fragment definiert (Abb.4). Vergleich von humanen und *Xenopus*  $\Delta$ ex4-XTCF4 CRD-Sequenzen zeigte, dass die Exon-3 und Exon-5 Sequenzen hochkonserviert sind und Exon-4 Sequenzen weichen stark voneinander sowohl auf DNA als auch auf Aminosäuren Ebene (Abb.13). Allerdings beinhalten diese beiden Sequenzen einzelne Serine (2 im XTCF4 und 3 im hTCF4) im Exon-4, die potenzielle Phosphorylierungssubstrate für diverse Kinasen sein können.

### 6.4. Alternative XTCF4 mRNA-Varianten

Durch weitere RT-Analysen der Frosch-cDNA wurden nachgewiesen, dass XTCF4 Varianten exprimiert werden, bei denen Exon-4 und Exon-14 kombiniert und getrennt alternativ gespleisst vorliegen. Amplifikationen über den Bereich von Exon-9 bis Exon-17 bestätigten die Expression alternativer C-terminaler Varianten. Diese Varianten müssen nicht unbedingt von einer vollständigen funktionalen XTCF4 Version stammen sondern könnten auch dominant negative Varianten darstellen, die durch das Nutzen eines alternativen internale Promotors 5' von Exon-6 her rühren (*Vacik et al. 2011*) kodiert sein. Erst da Amplifikat das mit Primern aus Exon-3 und Exon 14 bewiesen, dass tatsächlich vollständige E-tail Varianten exprimiert werden. Durch geschickte Primerwahl wurde in der vorliegenden Arbeit außerdem nachgewiesen, dass XTCF4 Varianten mit und ohne Exon-4 zumindest die HMG box beinhalten. Ob zusätzlich, wie bei der Maus C-terminal trunkierte Varianten existieren (*Kennel. et al. 2003*), denen durch ein alternatives Stop Kodon im Exon-8 die HMG-box fehlt, bleibt ungewiss.

## 6.5. Expression von XTCF4 $\Delta$ ex4-CRD und E-tail Varianten

Expressionsanalysen über viele Embryonalstadien zeigten, dass die XTCF4 E-tail Varianten immer zusammen mit den bisher bekannten XTCF4 M-Varianten (A, B und C) auftreten (Abb.5). Alternative Spleissen des C-Terminus wird demnach nicht zeitlich reguliert. Ob die Transkripte präferenziell in unterschiedlichen Geweben vorliegen lies sich mit der in vorliegender Arbeit nicht nachweisen, da die Sonde (ein Fragment aus 80 bp Exon-13, 72 bp Exon-14 und 136 bp Exon-17) als sense und antisense Sonde ähnliche Signale lieferte. Vermutlich war diese mit nur 288 Basen sehr kurze Sonde zu unspezifisch. Die Exon-14 und Exon-17 Flanken der Sonden sollten neben den E-tail Varianten auch die M-Isoformen XTCF4A, B und C erkennen. Auch der Nachweis des E-tail XTCF4 durch Anwendung von Oligonukleotid-Sonden erscheint nur bedingt erfolgsentsprechend, denn ein langer C-terminus bzw ein CRARF-Motiv kommen auch in XTCF3 bzw XTCF1 vor.

## 6.6. Erstellen von neuen XTCF4 Konstrukten zur Funktionsanalyse

Die Informationen über natürlich vorkommende XTCF4 Transkripte wurden genutzt, um entsprechende Varianten im eukaryotischem Expressionsvektor pCS2 herzustellen. Dies ist für weiterführende funktionale Untersuchungen unerlässlich. Da unter den bisher beschriebenen XTCF4 Varianten XTCF4 A, B und C, die Variante XTCF4C der potenteste Aktivator war (*Pukrop et al. 2001, Gradl et al. 2002*), wurde diese Variante zur Insertion von Exon-14, und zur Deletion von Exon-4 benutzt. Dies geschah vor allem vor dem Hintergrund, dass die Exon 8- flankierenden repressiven Sequenzen LVPQ und SFLSS, die bei den Varianten XTCF4 A und B vorhanden sind, möglicherweise der Zielgenaktivierung durch das neu hinzugefügte CRARF Motiv entgegen wirken.

## 6.7. Funktionsanalysen der neuen XTCF4 Varianten

In Reporterstudien an transient transfizierten HEK-293-Zellen waren die hier neu erstellten XTCF4 Konstrukte größtenteils inaktiv. Die beiden E-tail Varianten von XTCF4, mit und ohne Exon-4 in der CRD, konnten im HEK-293 weder den STF noch den Siamois Promotor aktivieren. Allerdings fehlte beiden E-tail Varianten im Vergleich zu humanem hTCF4E2 ein für Arginin kodierendes Triplet am 3'-Ende von Exon-14. Die XTCF4C M-Form dagegen konnten beide Promotoren schwach aktivieren, wobei die Exon-4 Deletion hier hatte nur schwache Effekte. Dies ist insofern überraschend, als entsprechende Variationen im hTCF4 die Zielgenpromotoren durchaus unterschiedlich regulierten. So war vor allem das Fehlen von Exon-4 und das Vorhandensein eines E-tail entscheidend für eine starke Aktivierung diverser WREs (*Weise et al. 2010*). Bei XTCF4 dagegen führte weder die Deletion von Exon-4, noch das Einfügen eines E-tails in XTCF4C zu einer verstärkten Reporteraktivierung. Für dieses überraschende Ergebnis bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten an. Zum Einen die Sequenz des Wnt responsiven Elements (WRE) der benutzten Promotoren und zum Anderen vermutlich das Fehlen des Arginin im E-tail unter Beibehalten intakter repressiver CtBP Bindungsstellen. Wie in der Einleitung erwähnt, kann die Cystein Klammer die DNA-Bindestelle der HMG-Box zu den Promotoren orientieren. Dies gilt nur für Promotoren die eine zusätzliche 5'-RCCG-3' Helfer-Sequenz beinhalten (*Arce et al. 2006, Atcha et al. 2007, Hoppler und Kavanagh 2007, Weise et al. 2010*). Der Siamois Promotor besitzt neben dem Konsensus WRE 5'-CTTTGW-3' (W = AC oder TC) auch 5'-ATCAAAG-3' Konsensus WRE Wiederholungen (*Weise et al. 2010*). Der STF beinhaltet die Konsensus CCCCCTTTGATCTT Sequenz achtmal wiederholt vor dem Reporter. Wahrscheinlich haben in den Reporter Analysen in der vorliegenden Arbeit die XTCF4-E2ΔR Varianten deshalb keine Aktivitäten gezeigt, weil beide Promotoren keine 5'-RCCG-3'-Helfer Motive enthalten. Theoretisch könnte hier auch intakte C-clamp XTCF4-E2, also eine Variante, die das Arginin R<sub>472</sub> enthält, keine aktivierende Promotorbindung zeigen. Möglicherweise würden Reporteranalysen mit RCCG-enthaltenden Promotoren wie z.B. *Cdx1* (*Weise et al. 2010*) andere Ergebnisse liefern.

Besonders interessant aber war, wie sich die Konstrukte im Gesamtembryo verhielten. Tatsächlich zeigte sich hier, wie in der Zellkultur, dass die ΔR-Version inaktiv ist, die mit dem R<sub>472</sub> aber Doppelachsen ähnlich wie die entsprechende



humane Variante hTCF4E induziert. Offensichtlich ist das Arginin R<sub>472</sub> also für eine effiziente Zielgenaktivierung entscheidend. Die Wahrscheinlichste Möglichkeit, wie ein einzelnes Arginin die Aktivität eines Transkriptionsfaktors derart beeinflussen kann ist, dass durch das Fehlen dieser Aminosäure die Struktur der Cystein-Klammer verändert wird. Diese Strukturänderung kann daher rühren, dass der Abstand zwischen dem dritten und dem vierten Cystein der Cysteinklammer das Entfernen R<sub>472</sub> von zu einer Umorientierung der Struktur führt. Damit kann diese TCF4 Variante die RCCG- Helfer Motive nicht mehr erkennen. Diese Variante enthält aber immer noch die Bindungsstellen für den Repressor CtBP. Die Repression über induzierte Heterochromatinbildung (*Valenta et al. 2003, Cuilliere-Dartigues et al. 2006*) bliebe dabei erhalten. Ob auch Cystein-Klammer bindende Proteine wie MUC1-C (*Rajabi et al. 2012*) vom Fehlen des R<sub>472</sub> betroffen sind, ist ungewiss.

Der repressive Einfluss eines E-tail C-Terminus mit fehlendem R<sub>472</sub> ist also vermutlich auf eine gestörte Struktur der Cystein-Klammer bei gleichzeitiger Rekrutierung von CtBP zurück zu führen. Dies ist insofern überraschend, als CtBP bisher noch nicht als Repressor im Doppelachsenassay aufgetreten ist. Dies mag vor allem daran liegen, dass unter den Xenopus LEF/TCF- Transkriptionsfaktoren bisher einzig für XTCF3 eine CtBP Bindestelle identifiziert wurde (*Brannon et al. 1999*). Erst mit dieser Arbeit wurden auch für XTCF4 Varianten nachgewiesen, die eine  $\beta$ -Catenin und eine CtBP-Bindestelle beinhalten. Dass sich die entsprechenden XTCF3 und XTCF4 Varianten im Doppelachsenassay unterscheiden ist nicht verwunderlich, denn XTCF3 wirkt bekanntermassen als Repressor (*Brannon et al. 1997, Gradl et al. 2002*), XTCF4 kann dagegen als Aktivator und als Repressor wirken (*Gradl et al. 2002, Kunz et al. 2004, Liu et al. 2006*).

Neben diesen alternativen C-Termini stellte sich im Doppelachsenassay auch Exon-4 als ein für die Funktion relevanter Bereich dar. Rekonstitutionsexperimente und Anwendung von Chimären TCFs haben gezeigt, dass der Schlüssel für die Aufklärung von Subtypspezifität der TCFs in ihrer CRD liegt (*Klingel et al., 2012*). Interessanterweise konnten die hTCF4 Isoformen M2, S2 und E2 in Rekonstitutionsexperimenten XTCF4 ersetzen (*Kappel, 2011*). Durch Injektion eines XTCF4 spezifischen Morpholino antisense Oligonukleotids waren Mittelhirn -und Isthmus spezifische Markergene reduziert, durch co-injektion der hTCF4 Varianten wieder hergestellt, und zwar bei allen hTcf4 Varianten, unabhängig von ihren C-Terminus Design (*Kappel, 2011*).

Das Exon-4 im hTCF4 kann die verschiedenen Wnt-Gen-Promotoren in Zellkulturen reprimieren (Weise et al. 2010). Die hTCF4 S2 und E2 varianten ohne Exon 4 konnten, wie im vorangegangenen Versuchen (Kappel, 2011) so auch in diese Arbeit die Bildung ektoxischer Achsen induzieren. XTCF4C sowie hTCF4M1 und hTCF4E2ex4 konnten weder in dieser Arbeit, noch bei Kappel C. (2011) Doppelachsen hervorrufen. Diese Funde zusammen bestätigen, dass die Deletion von Exon-4 sowohl im humanen TCF4 als auch im XTCF4, tatsächlich hinreichend für die Induktion von ektoxischen Körperachsen ist. Mit etwas mehr als 10 % Doppelachsen war der Anteil dieses Phänotyps etwa gleich gross wie bei wie hTCF4-S2 und E2, aber bei weitem nicht so gross wie bei XTCF1. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete XTCF1 besitzt einen C-Terminus ähnlich wie der hTCF4-S2, Allerdings ist dieser kurze C-Terminus, der das CRARF Motiv enthält, aber keine vollständige Cystein-Klammer, für die Induktion der sekundären Körperachsen notwendig. Ein XTCF1 Konstrukt, dem dieser C-Terminus fehlt, induziert nur noch wenige sekundäre Achsen (Klingel et al., 2012). Im Vergleich zu TCF4 es fehlen die Bereiche, die bei hTCF4 von den Exons 5, 8, 13,15,16 und 17codiert werden (Abb.14) .

Das Primärtranskript des Transkriptionsfaktors TCF4 wird alternativ gespleißt, und erscheint damit in verschiedenen Isoformen. Diese regulieren subtypspezifisch die Transkription unterschiedlicher Wnt/ $\beta$ -catenin Zielgene (Duval et al. 2011, Shiina et al. 2003, Howng et al. 2004, Weise et al. 2010, Vacik 2011, Locke et al. 2011). In den letzten Jahren werden dabei mehrere Mechanismen dieser subtypspezifischen Regulation von Wnt-Zielgenen diskutiert nämlich (1), die Erkennung und Nutzung von unterschiedlichen wnt responsiven Elementen (WRE) (Blauwkamp et al., 2008, Archbold et al., 2011, Arche et al. 2006), (2) posttranslationale Modifikationen der Transkriptionsfaktoren (Hikasa und Sokol 2011, Najdi et al. 2009), (3) epigenetische Regulation der WRE (Wöhrle et al., 2007, Weise et al., 2010) und (4) alternatives Spleissing und subtypspezifische Promotornutzung (Duval et al. 2011, Weise et al. 2010, Archbold et al. 2011). Dazu kommen noch die dnTCF/LEFs, die durch Nutzung von (1) alternativen Promotoren (Roose et al. 1999, Hovanes et al. 2001, Najdi et al.2009, Yokoyama et al. 2010, Vacik et al. 2011), (2) alternativen vorzeitigen Poly-A Signalen (Locke et al. 2011) oder (3) alternativen Stop Kodons (Kennel et al. 2003) entstehen. Zusammenfassend wird die Subtypspezifität von TCFs hauptsächlich durch alternatives Spleissen festgelegt, weil dadurch funktionale

Modulen im CRDs von TCF4 Varianten-spezifisch selektiv auftreten. Vermutlich können diese Domänen je nach Art und Kombinationen können im demselben Protein synergistisch oder antagonistisch wirken.

Insgesamt auffallend erscheint die untergeordnete Rolle der Cystein-Klammer und des E-tail bei der Induktion ektopischer Achsen, sowie in CNS-Entwicklung (vorliegende Arbeit und *Kappel, 2011*), denn in anderen Systemen wurde vor allem der Cystein-Klammer und damit dem Binden zusätzlicher Helfer-Sequenzen eine tragende Rolle bei der Zielgenregulation zugesprochen (*Weise et al. 2010, Archbold 2011*).

Die repressive Funktion von  $\Delta R$ -C-clamp im STF-und Siamois-Reportergene-Assay sowie in Überexpressionsversuchen zeigten, dass das Exon-4 wesentlich für die Aktivität von XTCF4 ist. Fehlt es, so kann TCF4 deutlich besser sekundäre Achsen induzieren als wenn es vorhanden ist. Dies ist unabhängig von der C-ystein-Klammer, bzw E-tail. Fehlt allerdings das Arginin R<sub>472</sub> im XTCF4 E-tail, so werden kaum mehr sekundäre Achsen induziert

Neben den allgemeine  $\beta$ -catenin und TLE/Grg Interaktionsseiten (*Daniels and Weis, 2005*) entstehen durch alternatives spleissen in der CRD und im C-Terminus von XTCF4 verschiedene Sets von regulatorischen Modulen. Vermutlich werden so subtypspezifisch Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren rekrutiert. Dabei könnten durch alternatives Spleissen potentielle Stellen für posttranslationale Modifikationen wie Sumoilierung (*Sachdev et al. 2001, Archbold et al. 2011*) und Phosphorylierung auf distinkte Subtypen beschränkt bleiben. Somit wären die Effekte von SUMO-Ligasen wie PIASy oder Kinasen wie NLK (*Ishitani et al., 1999, Yamada et al., 2006*), JNK (*Nateri et al., 2005, Sancho et al. 2009*), CamKII (*Najdi et al., 2009*), HIPK2 (*Hikasa et al., 2010, Hikasa and Sokol, 2011*), TNIK (*Shitashige et al. 2010*) sowie CK1/2 (*Miravet et al. 2002*) für distinkte Varianten unterschiedlich.

## 7. Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass in *X. laevis* alternative TCF4 Varianten mit deletiertem Exon-4 und mit zwei Cystein-Klammer Versionen vorkommen. Diese werden zeitgleich mit den bisher bekannten XTCF4-M Varianten A, B und C exprimiert. RT-PCR-Experimente zeigten, dass E-tail Varianten mit intaktem N-Terminus exprimiert werden.

Die in den eukaryotischen Expressionsvektor pCS2 eingebrachten neuen XTCF4-Varianten mit  $\Delta$ R-E-tail und/oder deletiertem Exon 4 lokalisieren wie erwartet im Zellkern transfizierter HEK-293 Zellen. Sie konnten weder den SuperTopFlash noch den Siamois Promotoren effizient aktivieren.

In Doppelachsenassay zeigte sich, dass die Deletion von Exon 4 die Induktion sekundärer Körperachsen fördert. Die Deletion von Arginin R<sub>472</sub> in der Cystein-Klammer wirkt dem entgegen. Vermutlich führt diese Deletion zur Zerstörung der Gesamtstruktur der Cystein-Klammer.

## 8. Literatur

- Angus-Hill M.L.**, Elbert K.M., Hidalgo J., Capecchi M.R. (2011). *T-cell factor 4 functions as a tumor suppressor whose disruption modulates colon cell proliferation and tumorigenesis*. PNAS 108. 12, 4914 - 4919.
- Arce L.**, Yokoyama N.N. and 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. (2011). *How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway*. Acta Physiol (Oxf). 204(1):74 -109.
- 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., Waterman M.L. (2007) *A unique DNA binding domain converts T-cell factors into strong Wnt effectors*. Mol. Cell. Biol., 27, 8352 - 8363.
- Behrens J.**, von Kries J.P., Kuhl 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.
- Blauwkamp T.A.**, Chang M.V., Cadigan K.M. (2008). *Novel TCF-binding sites specify transcriptional repression by Wnt signaling*. The EMBO Journal 27, 1436 - 1446.
- 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(14): 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.
- Cho E.A.**, Dressler G.R. (1998) *TCF-4 binds beta-catenin and is expressed in distinct regions of the embryonic brain and limbs*. Mech. Dev. 77, 9 - 18.
- Clevers H.** (2006). *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Cell 127, 469 - 480.
- Cuilliere-Dartigues P.**, El-Bchiri J., Krimi A., Buhard O., Fontanges P., Flejou J.F., Hamelin R., Duval A. (2006). *TCF-4 isoforms absent in TCF-4 mutated MSI-H colorectal cancer cells colocalize with nuclear CtBP and repress TCF-4-mediated transcription*. Oncogene 25, 4441 - 4448.
- Daniels D.L.**, Weis W.I. (2005). *Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation*. Mol. Biol., 12, 364 - 371.
- Dorsky R.I.**, Itoh M., Moon R.T., Chitnis A. (2003). *Two tcf3 genes cooperate to pattern the zebrafish brain*. Development 130, 1937 - 1947.
- Duval A.**, Rolland S., Tubacher E., Bui H., Thomas G., Hamelin R. (2011). *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.
- 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*. The EMBO Journal 25, 2735 - 2745.
- Faro A.**, Boj S.F., Ambrósio R., van den Broek O., Korving J., Clevers H. (2009). *T-cell factor 4 (tcf7l2) is the main effector of Wnt signaling during zebrafish intestine organogenesis*. Zebrafish. (1): 59 - 68.
- Ghogomu S.M.**, van Venrooy S., Ritthaler M., Wedlich D., Gradl D. (2005). *HIC-5 Is a Novel Repressor of Lymphoid Enhancer Factor/T-cell Factor-driven Transcription*. J. Biol. Chem. 281(3), 1755 - 64.

- Giese K.**, Amsterdam A. and Grosschedl R. (1991). *DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1*. *Genes Dev.* 5, 2567 - 2578.
- Gradi D.**, Kühl M., Wedlich D., (1999). *The wnt/wg signal transducer  $\beta$ -catenin controls fibronectin expression*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5576–5587.
- Gradi D.**, König A. and 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.
- Grant S.F.**, Thorleifsson G., Reynisdottir I., Benediktsson R., Manolescu A., Sainz J., Helgason A., Stefansson H., Emilsson V., Helgadóttir A., Styrkarsdóttir U., Magnusson K.P., Walters G.B., Palsdóttir E., Jonsdóttir T., Gudmundsdóttir T., Gylfason A., Saemundsdóttir J., Wilensky R.L., Reilly M.P., Rader D.J., Bagger Y., Christiansen C., Gudnason V., Sigurdsson G., Thorsteinsdóttir U., Gulcher J.R., Kong A., Stefansson K. (2006). *Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes*. *Nat Genet.* 38 (3), 320-323.
- Hammerlein A.**, Weiske J, Huber O. (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 (5), 606 - 618.
- He T.C.**, Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W. (1998). *Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway*. *Science* 281, 1509 - 1512.
- 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.
- Hecht A., Stemmler M.P.** (2003). *Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C-terminus of the Wnt-effector protein TCF4*. *J. Biol. Chem.* 278, 3776 - 3785.
- Hikasa H., Sokol** (2011). *SY. Phosphorylation of TCF proteins by homeodomain-interacting protein kinase 2*. *J Biol Chem.* 286 (14):12093-100.
- 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 (4), 521 - 532.
- Hoppler S., Kavanagh C.L.** (2007). *Wnt signalling: variety at the core*. *J. Cell. Sci.* 120, 385 - 393.
- 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.
- 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 (1): 53-57.
- Howng S.L.**, Huang F.H., Hwang S.L., Lieu A.S., Sy W.D., Wang C., Hong Y.R. (2004). *Differential expression and splicing isoform analysis of human Tcf-4 transcription factor in brain tumors*. *Int. J. Oncol.* 25, 1685 - 1692.
- Hurlstone A., Clevers H.** (2002). *T-cell factors: turn-ons and turn-offs*. *EMBO J.* 21, 2303 - 2311.
- Ishitani T.**, Ninomiya-Tsuji J., Nagai S., Nishita M., Meneghini M., Barker N., Waterman M., Bowerman B., Clevers H., Shibuya H., Matsumoto K. (1999). *The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF*. *Nature* 399 (6738): 798-802.

- Johnson J.M.**, Castle J., Garrett-Engle P., Kan Z., Loerch P.M., Armour C.D., Santos R., Schadt E.E., Stoughton R., Shoemaker D.D. (2003). *Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays*. Science, 302 (5653), 2141 - 2144.
- Kappel C.**, Gradl D. (2011). *C-terminale Tcf-Varianten in der frühen Embryonalentwicklung in Xenopus laevis*. Bachelorarbeit Zi2, nicht publiziert.
- Kennell J.A.**, O'Leary E.E., Gummow B.M., Hammer G.D., MacDougald O.A. (2003) *T-cell factor 4N (TCF-4N), a novel isoform of mouse TCF-4, synergizes with beta-catenin to coactivate C/EBPalpha and steroidogenic factor 1 transcription factors*. Mol. Cell. Biol. 23, 5366 - 5375.
- Klingel S.**, Morath I., Strietz J., Menzel K., Holstein T.W. und Gradl D. (2012). *Subfunctionalization and neofunctionalization of vertebrate Lef/Tcf transcription factors*. Dev. Biol in press.
- 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 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.
- Korinek V.**, Barker N., Moerer P., van Donselaar E., Huls G., Peters P.J., Clevers H. (1998). *Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4*. Nature Genetics 19, 379 - 383.
- Kunz M.**, Herrmann M., Wedlich D., Gradl D. (2004). *Autoregulation of canonical Wnt signaling controls midbrain development*. Dev Biol. 273(2), 390 – 401.
- Lee E.**, Salic A., Kirschner M.W. (2001). *Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon*. J Cell Biol. 154(5), 983 - 993.
- Lee Y.J.**, Swencki B., Shoichet S., Shivdasani R.A. (1999). *A possible role for the high mobility group box transcription factor Tcf-4 in vertebrate gut epithelial cell differentiation*. J. Biol. Chem. 274, 1566 - 1572.
- Liu H.**, Thurig S., Mohamed O., Dufort D. and Wallace V. A. (2006) *Mapping Canonical Wnt Signaling in the Developing and Adult Retina*. Ophthalmol. Vis. Sci. 47 (11): 5088-5097
- Locke J.M.**, Da Silva Xavier G., Rutter G.A., Harries L.W. (2011). *An alternative polyadenylation signal in TCF7L2 generates isoforms that inhibit Tcell factor/lymphoid-enhancer factor (TCF/LEF)-dependent target genes*. Diabetologia, 54(12), 3078 - 3082.
- MacDonald B.T.**, Tamai K., He X. (2009). *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Dev Cell. 17 (1), 9 - 26.
- Miravet S.**, Piedra J., Miro F., Itarte E., de Herreros A.G., Dunach M. (2002). *The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin*. J. Biol. Chem. 277, 1884 – 1891.
- Molenaar M.**, van de Wetering M., Oosterwegel M., Peterson-Maduro J., Godsave S., Korinek V., Roose J., Destree O. and Clevers H. (1996). *XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos*. Cell 86, 391 - 399.
- Najdi R.**, Syed A., Arce L., Theisen H., Ting J.H.T., Atcha F., Nguyen A.V., Martinez B.S., Holcombe R.F., Edwards R.A., Marsh J.L., Waterman M.L. (2009). *A Wnt-kinase network alters nuclear localization of TCF-1 in colon cancer*. Oncogene 28 (47), 4133 - 4146.
- Nateri A.S.**, Spencer-Dene B., Behrens A. (2005). *Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development*. Nature 437 (7056): 281 - 285.
- Niehrs C.** (2010). *On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes*. Development 137, 845-857.

- Nieuwkoop P.D., Faber J. (1967).** *Normal table of Xenopus laevis*. Elsevier North-Holland Biochemical Press, Amsterdam.
- Prieve M.G.,** Guttridge K.L., Munguia J., Waterman L. (1998). *Differential Importin- $\alpha$  Recognition and Nuclear Transport by Nuclear Localization Signals within the High-Mobility-Group DNA Binding Domains of Lymphoid Enhancer Factor 1 and T-Cell Factor 1*. Mol. Cell. Biol. 18 (8), 4819 - 4832.
- Pukrop T.,** Gradl D., Henningfeld K.A., Knochel W., Wedlich D., Kuhl M. (2001). *Identification of two regulatory elements within the high mobility group box transcription factor XTcf-4*. J. Biol. Chem. 276, 8968 - 8978.
- Rajabi H.,** Ahmad R., Jin C., Kosugi M., Alam M., Joshi M. D., Kufe D. (2012). *MUC1-C Oncoprotein Induces TCF7L2 Transcription Factor Activation and Promotes Cyclin D1 Expression in Human Breast Cancer Cells*. J. Biol. Chem. 287, 10703 - 10713.
- Roose J.,** Huls G., van Beest M., Moerer P., van der Horn K., Goldschmeding R., Logtenberg T. and Clevers H. (1999). *Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1*. Science 285, 1923 - 1926.
- 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 (23), 3088 - 3103.
- Sancho R.,** Nateri A.S., Garcia de Vinuesa A., Aguilera C., Nye E., Spencer-Dene B., Behrens A. (2009). *JNK signalling modulates intestinal homeostasis and tumorigenesis in mice*. EMBO J. 28, 1843 – 1854.
- 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 (34), 26289 - 26294.
- Shiina H.,** Igawa M., Breault J., Ribeiro-Filho L., Pookot D., Urakami S., Terashima M., Deguchi M., Yamanaka M., Shirai M. (2003). *The human T-cell factor-4 gene splicing isoforms, Wnt signal pathway, and apoptosis in renal cell carcinoma*. Clin. Cancer Res. 9, 2121 - 2132.
- Shitashige M.,** Satow R., Jigami T., Aoki K., Honda K., Shibata T., Ono M., Hirohashi S., Yamada T. (2010). *Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth*. Cancer Res. 70(12): 5024-5033.
- Standley H.J.,** Destree 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.
- Tang W.,** Dodge M., Gundapaneni D., Michnoff C., Roth M., Lum L. (2008). *A genome-wide RNAi screen for Wnt/ $\beta$ -catenin pathway components identifies unexpected roles for TCF transcription factors in cancer*. PNAS. 105 (28), 9697 - 9702.
- Tetsu O., McCormick F. (1999).**  *$\beta$ -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. Nature 398, 422 - 426.
- Vacik T.,** Stubbs J.L. and Greg Lemke (2011). *A novel mechanism for the transcriptional regulation of Wnt signaling in development*. Genes Dev. 25:1783 - 1795.
- Valenta T.,** Lukas J., Korinek V. (2003). *HMG box transcription factor TCF-4' s interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells*. Nucleic Acids Res. 31, 2369 - 2380.
- Van de Wetering M.,** Sancho E., Verweij C., de Lau W., Oving I., Hurlstone A., van der Horn K., Batlle E., Coudreuse D., Haramis A.P. (2002). *The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells*. Cell. 111 (2), 241 - 250.



**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., Clevers H.** (1992). *Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix.* EMBO J. 11, 3039 - 3044.

**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.

**Waterman M.L.**, W.H. Fischer, K.A. Jones. (1991). *A thymusspecific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor a 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.* Nucl. Acids Res. 38, 1964 - 1981.

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

**Yamada M.**, Ohnishi J., Ohkawara B., Iemura S., Satoh K., Hyodo-Miura J., Kawachi K., Natsume T., Shibuya H. (2006). *NARF, an nemo-like kinase (NLK)-associated ring finger protein regulates the ubiquitylation and degradation of T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF).* J Biol Chem. 281(30): 20749 – 20760.

**Yamamoto H.**, Ihara M., Yoshiharu M., Kikuchi A. (2003). *Sumoylation is involved in  $\beta$ -catenin-dependent activation of Tcf-4.* EMBO J. 22 (9), 2047 - 2059.

**Yokoyama N.N.**, Pate K.T., Sprowl S., L. Waterman M. (2010). *A role for YY1 in repression of dominant negative LEF-1 expression in colon cancer.* Nucleic Acids Research, 38 (19) 6375 – 6388.

## 9. Anhang

### 9.1. Vergleich der XTCF4C-E2ΔR und hTCF4-E2 Exon 14 und 17 Fragmente

D L S A P K K C R A R F G L D Q Q N N W C G P C R K  
GACCTGAGCGCTCCTAAGAAATGTCGAGCGCGCTTTGGCCTTGATCAGCAGAATAACTGGTGCGGTCCC-TGC---AGGAAAA  
GACCTCAGCGCTCCTAAGAAATGCCGAGCGCGCTTTGGCCTTGATCAACAGAATAACTGGTGCGG-CCCTTGCAGGAGAAAA  
D L S A P K K C R A R F G L D Q Q N N W C G P C R R K

K K C I R Y I Q G E G S C V S P P S S D G S L L D S P P  
AGAAGTGCATTTCGCTACATACAAGGTGAAGGCAGCTGCGTTAGCCCGCCTCTTCAGATGGAAGCTTATTAGACTCTCCCTCT  
AAAAGTGCCTTCGCTACATACAAGGTGAAGGCAGCTGCCTCAGCCCACCTCTTCAGATGGAAGCTTACTAGATTTCGCTCC-  
K K C V R Y I Q G E G S C L S P P S S D G S L L D S P P

S S P A M P D S P I S D S K P T Q E Q T Q P L S  
TCTTCT-CCCG--CCATGC-CGGACTCCCCATATC-----AGACTCCAAACCACAACTGAACAACTCAACTCT-T-TCT-  
-CCCCTCCCCGAACC-TGCTAGG-CTCCCC-----TCCCCGAGACGCCAAGTCACAGACTGAGCAGACCCAGCCTCTGTCGCTG  
P S P N L L G S P P R D A K S T Q E Q T Q P L S L

L T L K P D P L T R I C G P T H S L A E S P  
TTAACCTTGAAACCCGACCCCTGA-----CAAGGAT--CTGCGGGACCCATTCACCT-CTG---GCTGAGAGCC-CCG  
T---CCCTGAAGCCCGACCCCTGGCCACCTGTCCATGATGCCTCCGCCACCC--GC-CCTCCTGCTCGCTGAG-GCCACC-  
S L K P D P L A H L S M M P P P P A L L L A E A T

V R R P N T L A A A I C H N G A E L S H P H N S L P S  
TGC-GAAGGCCAAATACACTGGCAGCCGCCAT-TTGCCATAACGGAGCAGAACTCAGTCACCCGCACAATTCCTCTGCCCTCGT  
--CACAAGGCC---T-C-C--GC--CCTC--TGT--CC-CAACGG-G--G--C-----CCTGGAC-----CTGCC-C--  
H K A S A L C P N G A L D L P

S L H S S L H S S L H S S L P Y S L S L T Q P S T S F  
CTCTGCACTCGTCTCTGCA-CTCGT-CTCTGCACTCGTCTCTGCCCTACAGTTTGTCTCTTACACAACCGTCCACCTCGTTC  
--CAGC---CG-CTTTGACAG-C-TGC-C-GC-C-C--C-CT--CCT-CA-----TCAATTGCACAGCCGCTCGACTTC-TTGG  
P A A L Q P A A P S S S I A Q P S T S W

L P S H R S L A V T Q L Q P L S L V T K P L E \*  
TT-CCTTCCCATC-GCTCCTTGTTGCAACTCAACTTCAGCCCCTGTCCCTGGTCACCAAACCTTAGAGTAG  
TTACATTCCCA-CAGCTCCCTGGCCGGGACCCAGCCCCAGCCGCTGTCGCTCGTCACCAAGTCTTTAGAGTAG  
L H S H S S L A G T Q P Q P L S L V T K S L E \*

**Abb. 12.** Vergleich von XTCF4C-E2ΔR (oben) und hTCF4-E2 über den Bereich von Exon 14 bis 17 Dann. Sequenzen mit Translation sind gezeigt. Schattierungen zeigen die unkonservierten Bereiche. Die vier C-clamp Cysteine sind doppelt und CtBP Bindungsstellen einfach unterstrichen.

## 9.2. TCF4 CRD-Fragment mit Exon-4 von XTCF4 und hTCF4

I M I P D L S S P Y L P N G S L S P T A Q C V N V P  
 ATCATGATCCCCGACCTGAGC-AGCCCCTACCTGCCCCAACGGATCCCCTCTCCCCACTGCGCGACAGTGCGTGAATGT---  
 ATCATGATCCCCGACCTGA-CGAGCCCCTACCTCCCCAACGGATCGCTCTCGCCCACCGCCCGA-A--CCCTCCAT-TTTC  
 I M I P D L T S P Y L P K R S V S P T A L H F Q S

L D L H L A S C C S P F M R Q Y L Q M K W  
 A--CC-ACTAG-ATCTGCATTTAGC-CT-C-T-----TG-TTG--CAGCC--CTTTCA-TGCAGTATCTGCAGATGAAAT  
 AGTCCGGC-AGCA-C-ACA-TTA-CTCTGCGTACAAAACGATTGAACA-CCAGATTGCAGTTCAGTATCTCCAGATGAAAT  
G S T H Y S A Y K T I E H Q I A V Q R T Y L Q M K

**Abb. 13.** Vergleich XTCF4 (oben) mit hTCF4 im Bereich von Exon 4. Schattierungen zeigen die nicht konservierten Sequenzen. Exon-4 ist unterschrieben.

### 9.3. Vergleich humaner und Frosch TCF4 und TCF1 Isoformen

	-----Exon-1-----
hTcf4M2	MPQLNGGGG-----DDLGANDELI <b>S</b> FKDEGEREEK <b>SS</b> EN-- <b>SS</b> AERDLADVK <b>SS</b> LVNE <b>SE</b>
hTcf4S2	MPQLNGGGG-----DDLGANDELI <b>S</b> FKDEGEREEK <b>SS</b> EN-- <b>SS</b> AERDLADVK <b>SS</b> LVNE <b>SE</b>
hTcf4E2	MPQLNGGGG-----DDLGANDELI <b>S</b> FKDEGEREEK <b>SS</b> EN-- <b>SS</b> AERDLADVK <b>SS</b> LVNE <b>SE</b>
XTcf4C	MPQLNGGGG-----DDLGANDEMI <b>S</b> FKDEGEQDEKICPI-- <b>SS</b> AERDLADVK <b>SS</b> LVNE <b>SE</b>
XTcf4CΔex4	MPQLNGGGG-----DDLGANDEMI <b>S</b> FKDEGEQDEKICPI-- <b>SS</b> AERDLADVK <b>SS</b> LVNE <b>SE</b>
XTcf4CΔex4E2ΔR	MPQLNGGGG-----DDLGANDEMI <b>S</b> FKDEGEQDEKICPI-- <b>SS</b> AERDLADVK <b>SS</b> LVNE <b>SE</b>
XTcf4CE2	MPQLNGGGG-----DDLGANDEMI <b>S</b> FKDEGEQDEKICPI-- <b>SS</b> AERDLADVK <b>SS</b> LVNE <b>SE</b>
XTcf1	MPQMNSAGE-----DDLGA <b>S</b> DEMISFKDEGDQEEKIREN--GF <b>T</b> ERDLADLK <b>SS</b> LVNE <b>SE</b>
hTcf1B	MPQLD <b>S</b> GGGGAGAGDDL <b>G</b> APDELLAFQDEGEEQDDKNRDS <b>SA</b> VGPERDLAELK <b>SS</b> LVNE <b>SE</b>
hTcf1E	MPQLD <b>S</b> GGGGAGAGDDL <b>G</b> APDELLAFQDEGEEQDDKNRDS <b>SA</b> VGPERDLAELK <b>SS</b> LVNE <b>SE</b>
	//-----Exon-2-----/
hTcf4M2	<b>T</b> NQ <b>N</b> SSSD <b>S</b> EA-----ERRPPPR <b>S</b> ESFRDK <b>S</b> RE-- <b>S</b> LEEA <b>A</b> KRQDG--GLFKG
hTcf4S2	<b>T</b> NQ <b>N</b> SSSD <b>S</b> EA-----ERRPPPR <b>S</b> ESFRDK <b>S</b> RE-- <b>S</b> LEEA <b>A</b> KRQDG--GLFKG
hTcf4E2	<b>T</b> NQ <b>N</b> SSSD <b>S</b> EA-----ERRPPPR <b>S</b> ESFRDK <b>S</b> RE-- <b>S</b> LEEA <b>A</b> KRQDG--GLFKG
XTcf4C	<b>T</b> P-- <b>H</b> SSSD <b>S</b> ET-----ERRPPPR <b>P</b> ESFRDK <b>S</b> RD-- <b>S</b> LEDA <b>A</b> KRPDG--GLFKG
XTcf4CΔex4	<b>T</b> P-- <b>H</b> SSSD <b>S</b> ET-----ERRPPPR <b>P</b> ESFRDK <b>S</b> RD-- <b>S</b> LEDA <b>A</b> KRPDG--GLFKG
XTcf4CΔex4E2ΔR	<b>T</b> P-- <b>H</b> SSSD <b>S</b> ET-----ERRPPPR <b>P</b> ESFRDK <b>S</b> RD-- <b>S</b> LEDA <b>A</b> KRPDG--GLFKG
XTcf4CE2	<b>T</b> P-- <b>H</b> SSSD <b>S</b> ET-----ERRPPPR <b>P</b> ESFRDK <b>S</b> RD-- <b>S</b> LEDA <b>A</b> KRPDG--GLFKG
XTcf1	V <b>A</b> SHPRVP- <b>E</b> TH-----PEAIRRAQDVQLVYQDK <b>F</b> SA <b>H</b> MEDG <b>I</b> KHQDE--GMYKG
hTcf1B	GAAAGAGVPGPGVVRVHG <b>E</b> AG <b>E</b> AP <b>E</b> ALGRE <b>H</b> TSQRLFPDKLP <b>E</b> SLEDGLKA <b>P</b> E <b>C</b> TS <b>G</b> MYKE
hTcf1E	GAAAGAGVPGPGVVRVHG <b>E</b> AG <b>E</b> AP <b>E</b> ALGRE <b>H</b> TSQRLFPDKLP <b>E</b> SLEDGLKA <b>P</b> E <b>C</b> TS <b>G</b> MYKE
	/-----Exon-3-----//-----Exon-4-----//
hTcf4M2	PPYPGYPFIMIPDL <b>T</b> SPYLPNG <b>S</b> LS <b>P</b> TAR----- <b>T</b> YLQMKW <b>P</b> LLDV
hTcf4S2	PPYPGYPFIMIPDL <b>T</b> SPYLPNG <b>S</b> LS <b>P</b> TAR----- <b>T</b> YLQMK- <b>P</b> LLDV
hTcf4E2	PPYPGYPFIMIPDL <b>T</b> SPYLPNG <b>S</b> LS <b>P</b> TAR----- <b>T</b> YLQMKW <b>P</b> LLDV
XTcf4C	P <b>T</b> YGGYPFIMIPDL <b>S</b> SPYLPNG <b>S</b> LS <b>P</b> TARQCVNVPLDLHL <b>A</b> SC <b>S</b> PFMQYLQMKW <b>P</b> LLDV
XTcf4CΔex4	P <b>T</b> YGGYPFIMIPDL <b>S</b> SPYLPNG <b>S</b> LS <b>P</b> TAR-----QYLQMKW <b>P</b> LLDV
XTcf4CΔex4E2ΔR	P <b>T</b> YGGYPFIMIPDL <b>S</b> SPYLPNG <b>S</b> LS <b>P</b> TAR-----QYLQMKW <b>P</b> LLDV
XTcf4CE2	P <b>T</b> YGGYPFIMIPDL <b>S</b> SPYLPNG <b>S</b> LS <b>P</b> TARQCVNVPLDLHL <b>A</b> SC <b>S</b> PFMQYLQMKW <b>P</b> LLDV
XTcf1	<b>S</b> GYPGYPFLM--- <b>L</b> SDPYLSNG <b>S</b> VS-----
hTcf1B	<b>T</b> VY <b>S</b> AFNLLMHYPP <b>P</b> S <b>G</b> AGQHPQP <b>P</b> PLH-----
hTcf1E	<b>T</b> VY <b>S</b> AFNLLMHYPP <b>P</b> S <b>G</b> AGQHPQP <b>P</b> PLH-----
	-----Exon-5-----//-----Exon-6-----
hTcf4M2	QAG <b>S</b> LQ <b>S</b> RQAL <b>K</b> DAR <b>S</b> PS <b>P</b> AHIV <b>S</b> NKVPVVQHP <b>H</b> VH <b>P</b> L <b>T</b> PL <b>I</b> T <b>S</b> NE <b>H</b> FT <b>P</b> GN <b>P</b> PH <b>L</b> P
hTcf4S2	QAG <b>S</b> LQ <b>S</b> RQAL <b>K</b> DAR <b>S</b> PS <b>P</b> AHIV <b>S</b> NKVPVVQHP <b>H</b> VH <b>P</b> L <b>T</b> PL <b>I</b> T <b>S</b> NE <b>H</b> FT <b>P</b> GN <b>P</b> PH <b>L</b> P
hTcf4E2	QAG <b>S</b> LQ <b>S</b> RQAL <b>K</b> DAR <b>S</b> PS <b>P</b> AHIV <b>S</b> NKVPVVQHP <b>H</b> VH <b>P</b> L <b>T</b> PL <b>I</b> T <b>S</b> NE <b>H</b> FT <b>P</b> GN <b>P</b> PH <b>L</b> P
XTcf4C	QAG <b>S</b> LQ <b>R</b> Q <b>R</b> G <b>M</b> KD <b>T</b> RS <b>P</b> SPAHIV <b>S</b> NKVPVVQHP <b>H</b> VH <b>P</b> L <b>T</b> PL <b>I</b> T <b>S</b> NE <b>H</b> FT <b>P</b> GN <b>P</b> PH <b>L</b> Q
XTcf4CΔex4	QAG <b>S</b> LQ <b>R</b> Q <b>R</b> G <b>M</b> KD <b>T</b> RS <b>P</b> SPAHIV <b>S</b> NKVPVVQHP <b>H</b> VH <b>P</b> L <b>T</b> PL <b>I</b> T <b>S</b> NE <b>H</b> FT <b>P</b> GN <b>P</b> PH <b>L</b> Q
XTcf4CΔex4E2ΔR	QAG <b>S</b> LQ <b>R</b> Q <b>R</b> G <b>M</b> KD <b>T</b> RS <b>P</b> SPAHIV <b>S</b> NKVPVVQHP <b>H</b> VH <b>P</b> L <b>T</b> PL <b>I</b> T <b>S</b> NE <b>H</b> FT <b>P</b> GN <b>P</b> PH <b>L</b> Q
XTcf4CE2	QAG <b>S</b> LQ <b>R</b> Q <b>R</b> G <b>M</b> KD <b>T</b> RS <b>P</b> SPAHIV <b>S</b> NKVPVVQHP <b>H</b> VH <b>P</b> L <b>T</b> PL <b>I</b> T <b>S</b> NE <b>H</b> FT <b>P</b> GN <b>P</b> PH <b>L</b> Q
XTcf1	----- <b>A</b> LSNKVPVVQ <b>P</b> SHGV <b>H</b> PL <b>I</b> P <b>N</b> SE <b>S</b> --- <b>F</b> SH <b>G</b> SH <b>S</b> PH <b>L</b> P
hTcf1B	-----KANQPPHG <b>V</b> P <b>Q</b> L <b>S</b> LYEH <b>F</b> NS <b>P</b> HP <b>T</b> PA----- <b>P</b>
hTcf1E	-----KANQPPHG <b>V</b> P <b>Q</b> L <b>S</b> LYEH <b>F</b> NS <b>P</b> HP <b>T</b> PA----- <b>P</b>

//-----Exon-7-----//-----Exon-8-----

hTcf4M2           ADVDPK**T**GIPRPPHPPDIS**P**YYPL**S**PG**T**VGQIPHPLGWLVPQQGQPVYPI**T**TGGFRHPYP  
hTcf4S2           ADVDPK**T**GIPRPPHPPDIS**P**YYPL**S**PG**T**VGQIPHPLGWLVPQQGQPVYPI**T**TGGFRHPYP  
hTcf4E2           ADVDPK**T**GIPRPPHPPDIS**P**YYPL**S**PG**T**VGQIPHPLGWLVPQQGQPVYPI**T**TGGFRHPYP

XTcf4C            ADVDPK**T**GIPRPPHPPDIS**P**YYPL**S**PG**T**MGQIPHPLGW----QGQPVYPI**T**TGGFRHPYP  
XTcf4CΔex4        ADVDPK**T**GIPRPPHPPDIS**P**YYPL**S**PG**T**MGQIPHPLGW----QGQPVYPI**T**TGGFRHPYP  
XTcf4CΔex4E2      ADVDPK**T**GIPRPPHPPDIS**P**YYPL**S**PGAVGQIPHPLGW----QGQPVYPI**T**TGGFRHPYP  
XTcf4CE2          ADVDPK**T**GIPRPPHPPDIS**P**YYPL**S**PG**T**MGQIPHPLGW----QGQPVYPI**T**TGGFRHPYP

XTcf1             VDLNQKQGVHRP**S**Q**T**PDV**P**TFY**P**L**P**SGGVGQ**I**S**P**SMGW-----  
hTcf1B            AD**I**SQKQ-VHRPLQ**T**PDLSGFY**S**L**T**SGSMGQLPH**T**VS**W**-----  
hTcf1E            AD**I**SQKQ-VHRPLQ**T**PDLSGFY**S**L**T**SGSMGQLPH**T**VS**W**-----

//-----Exon-9-----//

hTcf4M2           **T**AL**T**VNAS**M**SRFPPH**M**VPPH**H**T**L**HT**T**GIPHPAIV**T**P**T**VKQ**E**SS**S**QSDV**G**SL**H**SS**K**HQ**D**SK**K**  
hTcf4S2           **T**AL**T**VNAS**-**SRFPPH**M**VPPH**H**T**L**HT**T**GIPHPAIV**T**P**T**VKQ**E**SS**S**QSDV**G**SL**H**SS**K**HQ**D**SK**K**  
hTcf4E2           **T**AL**T**VNAS**M**SRFPPH**M**VPPH**H**T**L**HT**T**GIPHPAIV**T**P**T**VKQ**E**SS**S**QSDV**G**SL**H**SS**K**HQ**D**SK**K**

XTcf4C            **T**AL**T**VNAS**M**SRFPPH**M**VPPH**S**L**H**HT**T**GIPHPAIV**A**P**T**VKQ**E**SS**S**H**S**DM**G**SL**H**SS**K**HQ**D**SK**K**  
XTcf4CΔex4        **T**AL**T**VNAS**M**SRFPPH**M**VPPH**S**L**H**HT**T**GIPHPAIV**A**P**T**VKQ**E**SS**S**H**S**DM**G**SL**H**SS**K**HQ**D**SK**K**  
XTcf4CΔex4E2ΔR   **T**AL**T**VNAS**M**SRFPPH**M**VPPH**S**L**H**HT**T**GIPHPAIV**N**P**T**VKQ**E**SS**S**Q**S**DM**G**SL**H**SS**K**HQ**D**SK**K**  
XTcf4CE2          **T**AL**T**VNAS**M**SRFPPH**M**VPPH**S**L**H**HT**T**GIPHPAIV**A**P**T**VKQ**E**SS**S**H**S**DM**G**SL**H**SS**K**HQ**D**SK**K**

XTcf-1            -----F**P**HP-L**M**L**S**P--**S**M**H**HT**T**GIPHPA**I**IP**H**SG**N**K**D**M**D**I**Y**ERN---M**K**Q**H**S**E**P**K**R  
hTcf1B            -----F**T**HP**S**L**M**L**G**SG**V**PG**H**PA**A**IP**H**PAIV**P**P**S**G**K**Q**E**L**Q**P**F**DRN---L**K**T**Q**A**E**S**K**A  
hTcf1E            -----F**T**HP**S**L**M**L**G**SG**V**PG**H**PA**A**IP**H**PAIV**P**P**S**G**K**Q**E**L**Q**P**F**DRN---L**K**T**Q**A**E**S**K**A

-----Exon-10-----//

hTcf4M2           EEEK**K**K**P**H**I**K**K**PL**N**A**F**M**L**Y**M**K**E**M**R**A**K**V**V**A**E**C**T**L**K**E**S**A**A**I**N**Q**I**L**G**R**R**W**H**A**L**S**R**E**E**Q**A**K**Y**Y**E**  
hTcf4S2           EEEK**K**K**P**H**I**K**K**PL**N**A**F**M**L**Y**M**K**E**M**R**A**K**V**V**A**E**C**T**L**K**E**S**A**A**I**N**Q**I**L**G**R**R**W**H**A**L**S**R**E**E**Q**A**K**Y**Y**E**  
hTcf4E2           EEEK**K**K**P**H**I**K**K**PL**N**A**F**M**L**Y**M**K**E**M**R**A**K**V**V**A**E**C**T**L**K**E**S**A**A**I**N**Q**I**L**G**R**R**W**H**A**L**S**R**E**E**Q**A**K**Y**Y**E**

XTcf4C            EEEK**K**K**P**H**I**K**K**PL**N**A**F**M**L**Y**M**K**E**M**R**A**K**V**V**A**E**C**T**L**K**E**S**A**A**I**N**Q**I**L**G**R**R**W**H**A**L**S**R**E**E**Q**A**K**Y**Y**E**  
XTcf4CΔex4        EEEK**K**K**P**H**I**K**K**PL**N**A**F**M**L**Y**M**K**E**M**R**A**K**V**V**A**E**C**T**L**K**E**S**A**A**I**N**Q**I**L**G**R**R**W**H**A**L**S**R**E**E**Q**A**K**Y**Y**E**  
XTcf4CΔex4E2ΔR   EEEK**K**K**P**H**I**K**K**PL**N**A**F**M**L**Y**M**K**E**M**R**A**K**V**V**A**E**C**T**L**K**E**S**A**A**I**N**Q**I**L**G**R**R**W**H**A**L**S**R**E**E**Q**A**K**Y**Y**E**  
XTcf4CE2          EEEK**K**K**P**H**I**K**K**PL**N**A**F**M**L**Y**M**K**E**M**R**A**K**V**V**A**E**C**T**L**K**E**S**A**A**I**N**Q**I**L**G**R**R**W**H**A**L**S**R**E**E**Q**A**K**Y**Y**E**

XTcf-1            E**K**E**P**K**K**P**A**I**K**K**P**L**N**A**F**M**L**Y**M**K**E**M**R**A**N**V**I**A**E**C**T**L**K**E**S**A**A**I**N**Q**I**L**G**R**R**W**H**A**L**S**R**E**E**Q**S**K**Y**Y**E**  
hTcf1B            E**K**E**A**K**K**P**T**I**K**K**P**L**N**A**F**M**L**Y**M**K**E**M**R**A**K**V**I**A**E**C**T**L**K**E**S**A**A**I**N**Q**I**L**G**R**R**W**H**A**L**S**R**E**E**Q**A**K**Y**Y**E**  
hTcf1E            E**K**E**A**K**K**P**T**I**K**K**P**L**N**A**F**M**L**Y**M**K**E**M**R**A**K**V**I**A**E**C**T**L**K**E**S**A**A**I**N**Q**I**L**G**R**R**W**H**A**L**S**R**E**E**Q**A**K**Y**Y**E**

-----Exon-11-----//-----Exon-12-----//-----Exon-13-----//

hTcf4M2           L**A**R**K**E**R**Q**L**H**M**Q**L**Y**P**G**W**S**A**R**D**N**Y**G**K**K**K**R**K**R**D**K**Q**P**G**E**T**N**E**H**S**E**C**F**L**N**P**C**L**S**L**P**P**I**T**-----  
hTcf4S2           L**A**R**K**E**R**Q**L**H**M**Q**L**Y**P**G**W**S**A**R**D**N**Y**G**K**K**K**R**K**R**D**K**Q**P**G**E**T**N**E**H**S**E**C**F**L**N**P**C**L**S**L**P**P**I**T**D**L**S**A**P  
hTcf4E2           L**A**R**K**E**R**Q**L**H**M**Q**L**Y**P**G**W**S**A**R**D**N**Y**G**K**K**K**R**K**R**D**K**Q**P**G**E**T**N**E**H**S**E**C**F**L**N**P**C**L**S**L**P**P**I**T**D**L**S**A**P

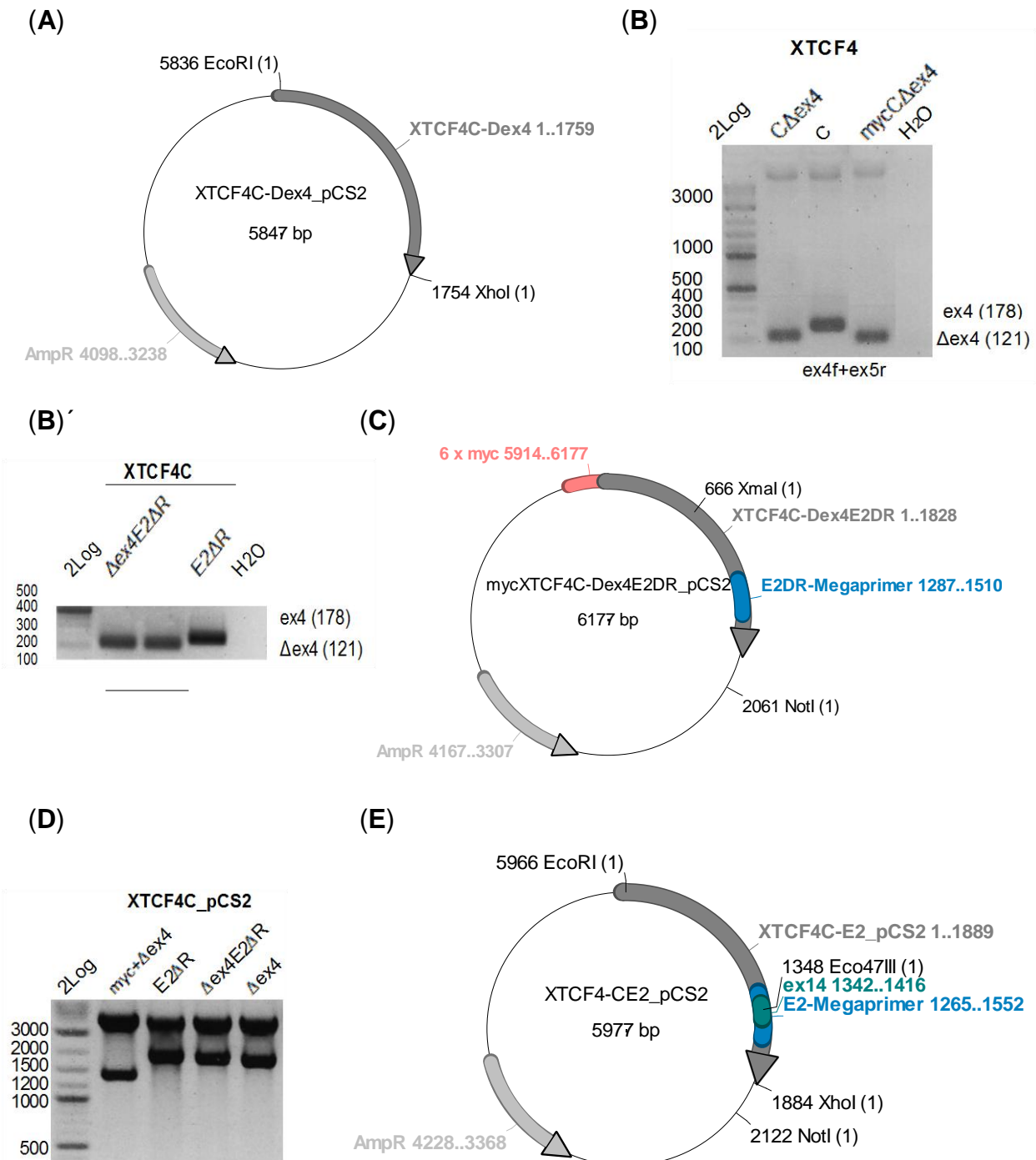
XTcf4C            L**A**R**K**E**R**Q**L**H**M**Q**L**Y**P**G**W**S**A**R**D**N**Y**G**K**K**K**R**K**R**E**K**Q**Q**G**E**A**N**E**H**S**E**C**Y**L**N**P**C**L**S**L**P**P**I**T**-----  
XTcf4CΔex4        L**A**R**K**E**R**Q**L**H**M**Q**L**Y**P**G**W**S**A**R**D**N**Y**G**K**K**K**R**K**R**E**K**Q**Q**G**E**A**N**E**H**S**E**C**Y**L**N**P**C**L**S**L**P**P**I**T**-----  
XTcf4CΔex4E2ΔR   L**A**R**K**E**R**Q**L**H**M**Q**L**Y**P**G**W**S**A**R**D**N**Y**G**K**K**K**R**K**W**E**K**Q**Q**G**E**A**N**E**H**S**E**C**Y**L**N**P**C**L**S**L**P**P**I**T**D**L**S**A**P  
Tcf4CE2           L**A**R**K**E**R**Q**L**H**M**Q**L**Y**P**G**W**S**A**R**D**N**Y**G**K**K**K**R**K**W**E**K**Q**Q**G**E**A**N**E**H**S**E**C**Y**L**N**P**C**L**S**L**P**P**I**T**D**L**S**A**P

XTcf1             L**A**R**K**E**R**Q**L**H**M**Q**L**Y**P**G**W**S**A**R**D**N**Y**G**K**R**K**R**R****T**R**E**K**H**Q**D**S**S**S-----D**P**G**S**P  
hTcf1B            L**A**R**K**E**R**Q**L**H**M**Q**L**Y**P**G**W**S**A**R**D**N**Y**G**K**K**R**R**S**R**E**K**H**Q**E**S**T**T**G**-----  
hTcf1E            L**A**R**K**E**R**Q**L**H**M**Q**L**Y**P**G**W**S**A**R**D**N**Y**G**K**K**R**R**S**R**E**K**H**Q**E**S**T**T-----D**P**G**S**P

	-----Exon-14-----//-----Exon-17-----
hTcf4M2	-----EGKKS <b>SAFATY</b> KVKAAA <b>SAH</b> PLQMEAY*-----
hTcf4S2	KKCRARFGLDQQNNW <b>CGPCR</b> -----
hTcf4E2	KKCRARFGLDQQNNW <b>CGPCR</b> RRKKK <b>CVRYIQEGSCLSPSSDGSLLDSPPSPNLLGSPP</b>
XTcf4C	-----EGKRS <b>SAFATY</b> KVKAAALARPLQMEAY*-----
XTcf4CΔex4	-----EGKRS <b>SAFATY</b> KVKAAALARPLQMEAY*-----
XTcf4CΔex4E2ΔR	KKCRARFGLDQQNNW <b>CGPCR</b> -RKKK <b>CIRYIQEGSCVSPSSDGSLLDSPPSPAMPDSPI</b>
XTcf4CE2	KKCRARFGLDQQNNW <b>CGPCR</b> RRKKK <b>CIRYIQEGSCVSPSSDGSLLDSPPSPAMPDSPI</b>
XTcf1	KKCRARFGLNQQ <b>TDW</b> CGPCR-----
hTcf1B	-----GKR <b>NAFG</b> -----
hTcf1E	KKCRARFGLNQQ <b>TDW</b> CGPCR <b>RRKKKCIRYLPGEGRCPSPVPSDDSA</b> LGCPG <b>SPSPAE</b> P <b>APT</b>
	-----Exon-17-----
hTcf4M2	-----
hTcf4S2	-----
hTcf4E2	RDAK <b>SQTEQTQPLSL</b> SLKPDPLAHL <b>SMMPPP</b> ALLLAE <b>ATHKASAL</b> -CPNGALDLPPAAL
XTcf4C	-----
XTcf4CΔex4	-----
XTcf4CΔex4E2ΔR	<b>SDSKPQTEQTQPLSL</b> TLKPDPL <b>TRICGTHSPLAES</b> PVRRPNTLAAAI <b>CHNGAELSHPHNS</b>
XTcf4CE2	<b>SDSKPQTEQTQPLSL</b> TLKPDPL <b>TRICGTHSPLAES</b> PVRRPNTLAAAI <b>CHNGAELSHPHNS</b>
XTcf-1	-----
hTcf1B	-----
hTcf1E	<b>SPGLSTALS</b> LP <b>TPGPPQ</b> APR-----
	-----Exon-17-----
	-----Exon-15-----
hTcf4M2	-----
hTcf4S2	-----CKYS <b>SKEVSGTVRA</b> *-----
hTcf4E2	QPAAP <b>SSSIAQPSTSWLHSHSS</b> LAGTQP-----QPLSLV <b>TKSLE</b> *-----
XTcf4C	-----
XTcf4CΔex4	-----
XTcf4CΔex4E2ΔR	LP <b>SSLHSSLHSSLHSSL</b> PYL- <b>SLSLTQPSTSF</b> LP <b>SHRSLVAT</b> -QLQPLSLV <b>TKPLE</b> *-----
XTcf4CE2	LP <b>SSLHSSLHSSLHSSL</b> PYL- <b>SLSLTQPSTSF</b> LP <b>SHRSLVAT</b> -QLQPLSLV <b>TKPLE</b> *-----
XTcf1	-----
hTcf1B	----- <b>T</b> -YPEKAAA <b>PAPFLPMT</b> VLHR-----
hTcf1E	-----APQD <b>SPSYHLLPRFPTELLTSTLQSTQVQQQES</b> QRQVAHR-----

**Abb. 14.** Vergleich der Aminosäuren von humanen (h) und Xenopus (X) TCF4-Isoformen mit XTcf1 und humanen TCF1-Varianten ohne (B) und mit (E) Cystein-Klammer. Schattierungen zeigen unterschiedliche Sequenzen.

## 9.4. Herstellung XTCF4 E-tail und $\Delta$ ex4-Genkonstrukte



**Abb.15.** Die XTCF4C Genkonstrukte: (A) XTCF4C- $\Delta$ ex4 kloniert in pCS2 zwischen *EcoRI*/*XhoI* Schnittstellen; (B) Analytische ex3f/ex5r- PCR der XTCF4C- $\Delta$ ex4 (121 bp), mycXTCF4C- $\Delta$ ex4 (178 bp) und XTCF4C- $\Delta$ ex4E2 $\Delta$ R (B)´; (C) Vektorkarte nach *XmaI*/*NotI*-Subklonierung von E2 $\Delta$ R aus XTCF4C-E2 $\Delta$ R\_pCS2 im mycXTCF4C- $\Delta$ ex4; (D) *EcoRI*/*XhoI* Doppelverdau neuer XTCF4C-pCS2-Klone und *Eco47III*/*NotI*-Subklonierung von E2-Megaprimer aus mutierter XTCF4C-E2\_pCS2 (E).

## 9.5. Sequenzen der neuen XTCF4C-Varianten

```

      *           *           *           *           *           *
1  ATCCCGCAGTTGAATGGCGGTGGGGGGGACGATCTGGGGGCGAATGACGAGATGATTTTCG 60
1  ATCCCGCAGTTGAATGGCGGTGGGGGGGACGATCTGGGGGCGAATGACGAGATGATTTTCG 60
1  ATCCCGCAGTTGAATGGCGGTGGGGGGGACGATCTGGGGGCGAATGACGAGATGATTTTCG 60

      *           *           *           *           *           *
61  TTTAAGGACGAGGGGGAACAAGACGAGAAGATCTGTCCGATCAGTTCGGCCGAGCGGGAC 120
61  TTTAAGGACGAGGGGGAACAAGACGAGAAGATCTGTCCGATCAGTTCGGCCGAGCGGGAC 120
61  TTTAAGGACGAGGGGGAACAAGACGAGAAGATCTGTCCGATCAGTTCGGCCGAGCGGGAC 120

      *           *           *           *           *           *
121 CTGGCGGACGTCAAGTCTTCTCTGGTCAATGAGTCCGAGACCCCCACAGCTCGTCCGAC 180
121 CTGGCGGACGTCAAGTCTTCTCTGGTCAATGAGTCCGAGACCCCCACAGCTCGTCCGAC 180
121 CTGGCGGACGTCAAGTCTTCTCTGGTCAATGAGTCCGAGACCCCCACAGCTCGTCCGAC 180

      *           *           *           *           *           *
181 TCCGAGACCGAGCGGCGACCCCCTCCCAGGCCGAGAGTTTCCGGGACAAGAGTCGGGAC 240
181 TCCGAGACCGAGCGGCGACCCCCTCCCAGGCCGAGAGTTTCCGGGACAAGAGTCGGGAC 240
181 TCCGAGACCGAGCGGCGACCCCCTCCCAGGCCGAGAGTTTCCGGGACAAGAGTCGGGAC 240

      *           *           *           *           *           *
241 AGCCTGGAGGACGCTGCTAAAAGACCTGACGGAGGATTATTTAAAGGGCCGACATATGGG 300
241 AGCCTGGAGGACGCTGCTAAAAGACCTGACGGAGGATTATTTAAAGGGCCGACATATGGG 300
241 AGCCTGGAGGACGCTGCTAAAAGACCTGACGGAGGATTATTTAAAGGGCCGACATATGGG 300

      *           *           *           *           *           *
301 GGTTACCCCTTCATCATGATCCCCGACCTGAGCAGCCCCACCTGCCCAACGGATCCCTC 360
301 GGTTACCCCTTCATCATGATCCCCGACCTGAGCAGCCCCACCTGCCCAACGGATCCCTC 360
301 GGTTACCCCTTCATCATGATCCCCGACCTGAGCAGCCCCACCTGCCCAACGGATCCCTC 360

      *           *           *           *           *           *
361 TCCCCCACTGCGCGACAGTGCCTGAATGTACCACTAGATCTGCATTTAGCCTCTTGTTGC 420
361 TCCCCCACTGCGCGACAGT----- 379
361 TCCCCCACTGCGCGACAGT----- 387

      *           *           *           *           *           *
421 AGCCCTTTCATGCAGTATCTGCAGATGAAATGGCCCCCTGCTGGATGTTTCAGGCTGGAAGT 480
380 -----ATCTGCAGATGAAATGGCCCCCTGCTGGATGTTTCAGGCTGGAAGT 423
388 -----ATCTGCAAAATGAAATGGCCCCCTGCTGGATGTTTCAGGCTGGAAGT 423

      *           *           *           *           *           *
481 TTACAGGGTAGACAAGGAATGAAGGACACCAGATCTCCATCCCCGGCTCACATTGTTTCT 540
424 TTACAGGGTAGACAAGGAATGAAGGACACCAGATCTCCATCCCCGGCTCACATTGTTTCT 483
424 TTACAGGGTAGACAAGGAATGAAGGACACCAGATCTCCATCCCCGGCTCACATTGTTTCT 483

      *           *           *           *           *           *
541 AACAAAGGTGCCCGTTGTACAGCACCCCTCACCATGTCCACCCCCTCACGCCGCTCATTACC 600
484 AACAAAGGTGCCCGTTGTACAGCACCCCTCACCATGTCCACCCCCTCACGCCGCTCATTACC 543
484 AACAAAGGTGCCCGTTGTACAGCACCCCTCACCATGTCCACCCCCTCACGCCGCTCATTACC 543

      *           *           *           *           *           *
601 TACAGCAACGAGCACTTTACCCAGGGAACCCCCACCGCACTTACAGGCAGACGTGGAC 660
544 TACAGCAACGAGCACTTTACCCAGGGAACCCCCACCGCACTTACAGGCAGACGTGGAC 603
544 TACAGCAACGAGCACTTTACCCAGGGAACCCCCACCGCACTTACAGGCAGACGTGGAC 603

      *           *           *           *           *           *
661 CAAAAACAGGAATCCCAAGGCCTCCACACCCTCCAGACATTTCCCCGTATTACCCTTTA 720
604 CAAAAACAGGAATCCCAAGGCCTCCACACCCTCCAGACATTTCCCCGTATTACCCTTTA 663
604 CAAAAACAGGAATCCCAAGGCCTCCACACCCTCCAGACATTTCCCCGTATTACCCTTTA 663

      *           *           *           *           *           *
721 TCCCCGGGCGCCGTCGGACAGATCCCCCATCCGCTAGGATGGCAAGGTCAGCCCCTTTAT 780
664 TCCCCGGGCGCCGTCGGACAGATCCCCCATCCGCTAGGATGGCAAGGTCAGCCCCTTTAT 723
664 TCCCCGGGCAACCATGGGACAGATCCCCCATCCGCTAGGATGGCAAGGTCAGCCCCTTTAT 723
      *           *           *           *           *           *

```



```

781 CCAATCACAACGGGGGGCTTCAGGCACCCCTACCCACAGCCCTTACCGTCAATGCTTCC 840
724 CCAATCACAACGGGGGGCTTCAGGCACCCCTACCCACAGCCCTTACCGTCAATGCTTCC 783
724 CCAATCACAACGGGGGGCTTCGGGCACCCCTACCCACAGCCCTCACCGTCAATGCTTCC 783

      *           *           *           *           *           *
841 ATGTCAAGATTCCCTCCTCACATGGTGGCGCCTCATCACAGTTTGCACACAACCTGGAATC 900
784 ATGTCAAGATTCCCTCCTCACATGGTGGCGCCTCATCACAGTTTGCACACAACCTGGAATC 843
784 ATGTCAAGATTCCCTCCCACATGGTGGCGCCTCATCACAGTTTGCACACAACGGGAATC 843

      *           *           *           *           *           *
901 CCTCACCCCGCCATAGTCAACCCTACTGTCAAGCAGGAGTCTTCCCAGAGTGACATGGGA 960
844 CCTCACCCCGCCATAGTCAACCCTACTGTCAAGCAGGAGTCTTCCCAGAGTGACATGGGA 903
844 CCTCACCCCGCCATAGTCCGCCCTACTGTCAAACAGGAGTCTTCCCACAGTGACATGGGA 903

      *           *           *           *           *           *
961 TCCCTCCACAGCTCGAAACATCAGGATTCCAAAAAAGAAGAAGAAAAGAAAAGCCGCAC 1020
904 TCCCTCCACAGCTCGAAACATCAGGATTCCAAAAAAGAAGAAGAAAAGAAAAGCCGCAC 963
904 TCCCTCCACAGCTCGAAACATCAGGATTCCAAAAAAGAAGAAGAAAAGAAAAGCCGCAC 963

      *           *           *           *           *           *
1021 ATAAAGAAACCCCTAAACGCGTTTCATGCTGTACATGAAGGAGATGAGGGCAAAAGTTGTC 1080
964 ATAAAGAAACCCCTAAACGCGTTTCATGCTGTACATGAAGGAGATGAGGGCAAAAGTTGTC 1023
964 ATAAAGAAACCCCTAAACGCGTTTCATGCTGTACATGAAGGAGATGAGGGCAAAAGTTGTC 1023

      *           *           *           *           *           *
1081 GCCGAGTGCACGTTAAAAGAAAGCGCGGCCATCAATCAGATCCTTGGTTCGGAGGTGGCAC 1140
1024 GCCGAGTGCACGTTAAAAGAAAGCGCGGCCATCAATCAGATCCTTGGTTCGGAGGTGGCAC 1083
1024 GCCGAGTGCACGTTAAAAGAAAGCGCGGCCATCAATCAGATCCTTGGTTCGGAGGTGGCAC 1083

      *           *           *           *           *           *
1141 GCCTTATCCAGGGAAGAGCAAGCGAAATACTATGAGCTGGCGAGGAAGGAGAGGCAACTC 1200
1084 GCCTTATCCAGGGAAGAGCAAGCGAAATACTATGAGCTGGCGAGGAAGGAGAGGCAACTC 1143
1084 GCCTTATCCAGGGAAGAGCAAGCGAAATACTATGAGCTGGCGAGGAAGGAGAGGCAACTC 1143

      *           *           *           *           *           *
1201 CACATGCAGCTTTACCCCGGATGGTTCGGCACGGGATAACTATGGCAAGAAGAAGAAGAGG 1260
1144 CACATGCAGCTTTACCCCGGATGGTTCGGCACGGGATAACTATGGCAAGAAGAAGAAGAGG 1203
1144 CACATGCAGCTTTACCCCGGATGGTTCGGCACGGGATAACTATGGCAAGAAGAAGAAGAGG 1203

      *           *           *           *           *           *
1261 AAAAGGGAAAAGCAGCAAGGAGAGGCCAATGAACACAGCGAATGTTACCTAAATCCTTGC 1320
1204 AAAAGGGAAAAGCAGCAAGGAGAGGCCAATGAACACAGCGAATGTTACCTAAATCCTTGC 1263
1204 AAAAGGGAAAAGCAGCAAGGAGAGGCCAATGAACACAGCGAATGTTACCTAAATCCTTGC 1263

      *           *           *           *           *           *
1321 CTTTCTCTCCTCCGATCACAGACCTGAGCGCTCCTAAGAAATGTCGAGCGCGCTTTGGC 1380
1264 CTTTCTCTCCTCCGATCACAGACCTGAGCGCTCCTAAGAAATGTCGAGCGCGCTTTGGC 1323
1264 CTTTCTCTCCTCCGATCACAGA----- 1286

      *           *           *           *           *           *
1381 CTTGATCAGCAGAATAACTGGTGCGGTCCCTGCAGAAGGAAAAAGAAGTGCATTGCTAC 1440
1324 CTTGATCAGCAGAATAACTGGTGCGGTCCCTGCAGAAGGAAAAAGAAGTGCATTGCTAC 1383
1287 -----AGGAAAAAGAAGTGCATTGCTAC 1310

      *           *           *           *           *           *
1441 ATACAAGTGAAGGCAGCTGCGTTAGCCCGCCCTCTTCAGATGGAAGCTTATTAGACTCT 1500
1384 ATACAAGTGAAGGCAGCTGCGTTAGCCCGCCCTCTTCAGATGGAAGCTTATTAGACTCT 1443
1311 ATACAAGTGAAGGCAGCTGCGTTAGCCCGCCCTCTTCAGATGGAAGCTTATTAGACTCT 1370

      *           *           *           *           *           *
1501 CCTCCTTCTTCTCCCGCCATGCCGACTCCCCATATCAGACTCCAAACCACAAACTGAA 1560
1444 CCTCCTTCTTCTCCCGCCATGCCGACTCCCCATATCAGACTCCAAACCACAAACTGAA 1503
1371 CCTCCTTCTTCTCCCGCCATGCCGACTCCCCATATCAGACTCCAAACCACAAACTGAA 1430

      *           *           *           *           *           *
1561 CAAACTCAACCTCTTTCTTTAACCTTGAACCCGACCCCTGACAAGGATCTGCGGGACC 1620
1504 CAAACTCAACCTCTTTCTTTAACCTTGAACCCGACCCCTGACAAGGATCTGCGGGACC 1563
1431 CAAACTCAACCTCTTTCTTTAACCTTGAACCCGACCCCTGACAAGGATCTGCGGGACC>1490

```

```

      *           *           *           *           *           *
1621 CATTACCTCTGGCTGAGAGCCCCGTGCGAAGGCCAAATACACTGGCAGCCGCCATTTGC 1680
1564 CATTACCTCTGGCTGAGAGCCCCGTGCGAAGGCCAAATACACTGGCAGCCGCCATTTGC 1623
1491 CATTACCTCTGGCTGAGAGCCCCGTGCGAAGGCCAAATACACTGGCAGCCGCCATTTGC 1550

      *           *           *           *           *           *
1681 CATAACGGAGCAGAACTCAGTCACCCGCACAATTCTCTGCCCTCGTCTCTGCACTCGTCT 1740
1624 CATAACGGAGCAGAACTCAGTCACCCGCACAATTCTCTGCCCTCGTCTCTGCACTCGTCT 1683
1551 CATAACGGAGCAGAACTCAGTCACCCGCACAATTCTCTGCCCTCGTCTCTGCACTCGTCT 1610

      *           *           *           *           *           *
1741 CTGCACTCGTCTCTGCACTCGTCTCTGCCCTACAGTTTGTCTCTTACACAACCGTCCACC 1800
1684 CTGCACTCGTCTCTGCACTCGTCTCTGCCCTACAGTTTGTCTCTTACACAACCGTCCACC 1743
1611 CTGCACTCGTCTCTGCACTCGTCTCTGCCCTACAGTTTGTCTCTTACACAACCGTCCACC 1670

      *           *           *           *           *           *
1801 TCGTTCCTTCCTTCCCATCGCTCCTTGGTTGCAACTCAACTTCAGCCCCTGTCCCTGGTC 1860
1744 TCGTTCCTTCCTTCCCATCGCTCCTTGGTTGCAACTCAACTTCAGCCCCTGTCCCTGGTC 1803
1671 TCGTTCCTTCCTTCCCATCGCTCCTTGGTTGCAACTCAACTTCAGCCCCTGTCCCTGGTC 1730

      *           *
1861 ACCAAACCCTTAGAGTAGAACCCCTCGAG 1889
1804 ACCAAACCCTTAGAGTAGAACCCCTCGAG 1832
1731 ACCAAACCCTTAGAGTAGAACCCCTCGAG 1759

```

**Abb.16.** Vergleich von XTCF4C-E2ΔR (oben), XTCF4C-Δex4-E2Δ4 (mitte) und XTCF4C-Δex4. Einzelne Basenunterschiede sind schattiert. Alle drei Sequenzen stammen aus den in pCS2 insertierten Fragmenten.