Universität Ulm
Institut für Biochemie
Prof. Dr. Dr. W. Knöchel

Isolierung und Charakterisierung von Forkhead Transkriptionsfaktoren der Subklasse P in Xenopus laevis

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Angela Wochnik
aus Osnabrück
2009

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Walter Knöchel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Donald Bunjes
Tag der Promotion:	06.11.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1

1.1 Der Modellorganismus Xenopus laevis 1

1.2 Die embryonale Entwicklung von Xenopus laevis 2

1.3 Die Regulation der Transkription 5

1.4 Transkriptionsfaktoren in der Embryonalentwicklung 8

1.4.1 Die Forkhead Transkriptionsfaktoren 9

1.4.2 Die Forkhead Transkriptionsfaktoren der Subklasse P 15

1.5 Zielsetzung der Arbeit 17

2. Material und Methoden 18

2.1 Chemikalien, Lösungen und Geräte 18

2.1.1 Chemikalien 18

2.1.2 Puffer und Stammlösungen 20

2.1.3 Nährmedien und Zusätze 26

2.1.4 Reaktionssysteme (Kits) 27

2.1.5 Enzyme 28

2.1.6 Antikörper 28

2.1.7 Radioisotope 28

2.1.8 Nukleinsäuren 29

2.1.9 Geräte 31

2.1.10 Software 31

2.1.11 Sonstiges 33

2.2 Biologisches Material 33

2.2.1 Bakterienstämme 33

2.2.2 Phagen 34

2.2.3 Versuchstiere 34

2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren 35

2.3.1 Arbeiten mit DNA 35

2.3.2 Arbeiten mit RNA 47

2.3.3 Arbeiten mit Proteinen 50

2.4 Arbeiten mit Organismen 53

2.4.1 Arbeiten mit Bakterien 53

3.4.2 Arbeiten mit Phagen 55

2.4.3 Arbeiten mit *Xenopus laevis* 59

2.4.4 Immunhistochemische und histologische Methoden 62

3. Ergebnisse 66

3.1 Isolierung vollständiger cDNA Klone der Xenopus laevis FoxP-Subfamilie 66

3.2 Genomische Organisation der Xenopus Gene FoxP1, FoxP2 und FoxP4 67

3.3 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Xenopus laevis FoxP1, FoxP2 und FoxP4 Proteine 69

3.4 Phylogenetische Analyse der FoxP1, FoxP2 und FoxP4 Proteine in verschiedenen Spezies 71

3.5 Charakterisierung der FoxP1 Subfamilie in Xenopus laevis 72

3.6 Charakterisierung der FoxP2 Subfamilie in Xenopus laevis 77

3.7 Charakterisierung der FoxP4 Subfamilie in Xenopus laevis 81

4. Diskussion 85

4.1 Die FoxP Subklasse 85

4.2 FoxP1 86

4.3 FoxP2 90

4.4 FoxP3 94

4.5 FoxP4 95

4.6 Aussichten 97

5. Zusammenfassung 98

6. Literaturverzeichnis 100

Anhang 113

Danksagung 126

Curriculum Vitae 127

Erklärung 129

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APBS	amphibian phosphate buffered saline
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-Indoyl-Phosphat-p-Tuloidinsalz
Bl.	Blastomere
bHLH	basic helix-loop-helix
BMP	*Bone morphogenetic protein*
bp	base pairs (Basenpaare)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy DNA
CDTA	trans-1,2-Diamino-cyclohexan-N-N,N´,N´-tetraacetat
CHAPS	3-3-Cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propansulfonat
CIP	calf intestine phosphatase
Co-MO	Control-Mo (Kontrollmorpholino-Oligonukleotid)
CTP	Cytosin-5´-triphosphat
DAPI	4´,6-Diamidino-2-phylindol-dihydrochlorid
dATP	2´ Desoxyadenosin-5´-triphosphat
dCTP	2´ Desoxycytidin-5´-triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-5´-triphosphat
Depc	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
d.h.	das heißt
DNA	Desoxy ribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2´ Desoxynukleosid-5´-triphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dUTP	2´ Desoxyuridin-5´-triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eFGF	embryonal fibroblast growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis-2-aminoethylether-tetraacetat
EST	expressed sequence tag
et al	et alii
EtOH	Ethanol
f	femto-

FAB	Fragment antigen binding
FCS	fetal calf serum
FBS	fetal bovine serum
fkh	forkhead
Fox	Forkhead box
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	hora (Stunde)
hCG	humanes Choriongonadotropin
HDAC	Histone Deacetylase Complex (Histon Deacetylase Komplex)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
Hox	Homöobox
HPLC	high performance liquid chromatography
i.E.	internationale Einheiten
INT	Iodonitrotetrazolium
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
l	Liter
lac	Lactose
LB	Luria-Bertani
LTR	Longterm Repeat
m	milli-
M	Mol
mA	Milliampere
MAB	maleic acid buffer (Maleinsäure Puffer)
MBSH	Modified Barth solution high salt
MBT	Midblastula Transistion
MEM(P)FA	MOPS/EGTA/$MgSO_4$/(Para)Formaldehyd
min	Minute
MO	Morpholino-Oligonukleotid
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	nano-
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
NCAM	neural cell adhesion molecule
OCM	Oocyte Culture Medium
OD	optische Dichte
ODC	Ornithin-Decarboxylase
ORF	Open reading frame (Offener Leserahmen)
p	pico-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PBT	Phosphate-buffered saline/Tween

PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pfu	plaque forming units (Plaque bildende Einheiten)
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RLU	relative light units (relative Lichteinheiten)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
s.	siehe
SDS	sodium dodecyl sulfat (Natrium-dodecylsulfat)
sec	Sekunde
St.	Stadium
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tap	tobacco acid pyrophosphatase
Taq	Thermus aquaticus
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transforming growth factor β
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyoxyethylen-p-t-octylphenol
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-Monolaurat
U	Unit, Enzymatische Einheit
ü.N.	über Nacht
UTR	Untranslated Region (Untranslatierter Bereich der Boten RNA)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
Vol%	Volumenprozent
WMISH	Whole mount *in situ* Hybridisierung
w/v	Masse pro Volumeneinheit
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galaktosid
z.B.	zum Beispiel
µ	mikro-

1. Einleitung

1.1 Der Modellorganismus *Xenopus laevis*

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wird seit den vielen Jahrzehnten als Modellorganismus für entwicklungsbiologische Versuche benutzt. Krallenfrösche sind Vertebraten und ihre frühe Embryonalentwicklung ist mit der des Menschen wesentlich besser zu vergleichen, als es das klassische Versuchstier der Entwicklungsbiologie, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, erlaubt. Ein weiterer großer Vorteil von *Xenopus laevis* liegt in der einfachen Haltung dieser Tiere. Da sie ihr Leben ausschließlich im Wasser verbringen, können sie in mit Wasser gefüllten Aquarien gehalten werden. Als Nahrung benötigen sie kein Lebendfutter wodurch leicht eine problemlose Versorgung gewährleistet werden kann. Die *Xenopus laevis* Weibchen können zur Eiablage durch eine Gonadotropin-Injektion stimuliert werden. Pro Eiablage werden mehrere Tausend Eier gelegt (siehe Abbildung 1: *Xenopus laevis* (A) Fertilisation (B) Eigelege). Die braune Seite der Eier stellt die pigmentierte animale Hemisphäre dar, die weiße Seite die vegetale Hemisphäre.

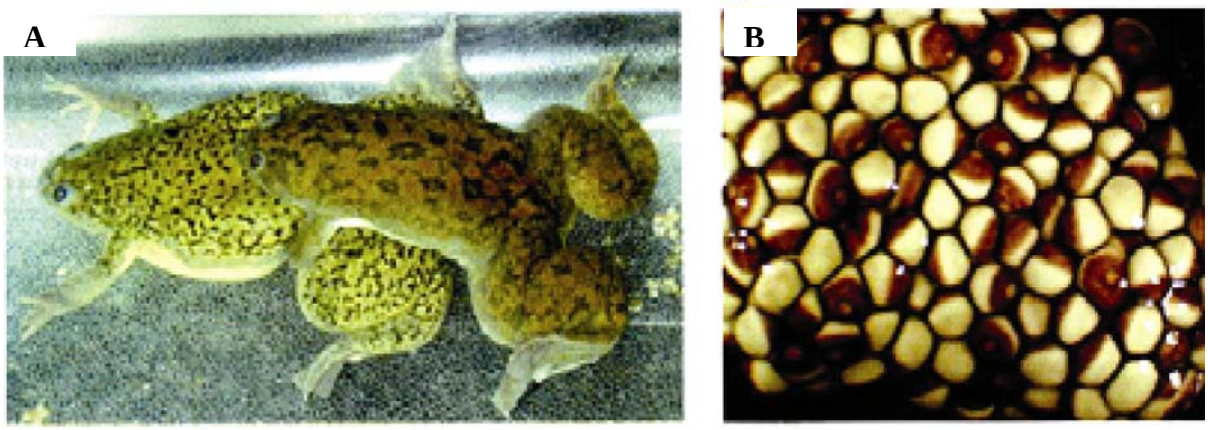


Abb. 1: *Xenopus laevis*. (A) Ferilisation. (B) Eigelege. Die braune Seite der Eier stellt die pigmentierte animale Hemisphäre dar, die weiße Seite die vegetale Hemisphäre (aus Gilbert, 2006).

Die Eier lassen sich *in vitro* befruchten, kultivieren und entwickeln sich relativ schnell. Sie sind durch ihre Größe von 1 bis 2 mm Durchmesser vielen Manipulationen, wie Mikroinjektionen und Transplantationen zugänglich. Ein weiterer Vorteil ist, dass die *Xenopus laevis* Embryonen sich im Gegensatz zu dem Modellorganismus Maus, *Mus musculus*, oder anderen Säugetieren außerhalb des Körpers des Muttertiers entwickeln, was eine permanente Beobachtung der Embryonen ermöglicht. Sie benötigen bis zu späten Entwicklungsstadien kein Futter und können in einer einfachen Salzlösung gehalten werden. Da die *Xenopus laevis* Embryonen nahezu transparent sind, ist es möglich, entwicklungsbiologische Vorgänge in lebenden Embryonen zu beobachten. *Xenopus laevis* eignet sich als Modellorganismus für eine Vielzahl von Untersuchungsmethoden. So können durch die Injektion von RNA in frühe Embryonalstadien einzelne Gene gezielt überexprimiert werden oder durch Morpholino-*antisense*-Oligonukleotide deren Proteinexpression reprimiert werden. Auf diese Weise lassen sich funktionelle Studien einzelner Gene im sich entwickelnden *Xenopus laevis* Embryo durchführen. Ein Nachteil des Modellorganismus *Xenopus laevis* ist sein pseudotetraploides Genom, welches im letzten Jahrzehnt zu einer verstärkten Verwendung des vergleichbaren Zebrafischmodells, *Danio rerio*, führte. Dessen Vorzüge haben sich jedoch seit der Entdeckung der partiellen Polyploidie des Zebrafisches wieder relativiert (Aparicio, 1998; Postlethwait et al., 1998). Trotz dieser Einschränkung ist der südafrikanische Krallenfrosch aber nach wie vor für entwicklungsbiologische Fragestellungen eines der geeignetsten Tiermodelle.

1.2 Die embryonale Entwicklung von *Xenopus laevis*

Die Eier des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* sind rotationssymmetrisch; man kann den dunkelpigmentierten, animalen Bereich von dem hellen, dotterreichen, vegetalen Teil unterscheiden. Die Befruchtung erfolgt in der animalen Hemisphäre und löst den Prozess der kortikalen Rotation aus, wobei es zu einer Verschiebung der Zellmembran einschließlich einer dünnen Schicht des Zytoplasmas (Kortex) gegenüber dem inneren Zytoplasma kommt. An der Eintrittsstelle des Spermiums schiebt sich dabei das vegetale Zytoplasma unter den animalen Kortex (ventraler Pol), und am gegenüberliegenden

dorsalen Pol, das animale Zytoplasma unter den vegetalen Kortex (dorsaler Pol). Damit ist die antero-posteriore Körperachse des *Xenopus laevis* Embryos festgelegt. Bereits die erste Furchungsteilung legt die dritte Asymmetrieebene fest, indem die Zygote entlang der animal-vegetalen Achse in die spätere linke und rechte Körperhälfte geteilt wird. Die Entwicklung der Zygote verläuft anschließend relativ schnell. In etwa drei Stunden, nach fünf Furchungsteilungen (32-Zellstadium), bildet sich ein Zellhaufen (Morula), der sich nach weiteren zwei Stunden, durch Sekretion von Flüssigkeit ins Innere des Embryos, zur Hohlkugel (Blastula) mit primärer Leibeshöhle (Blastocoel) entwickelt. Die Entwicklung bis zu diesem Stadium wird allein durch Signale maternaler Herkunft in Form von unterschiedlich lokalisierten Transkripten und Proteinen gesteuert (Dawid, 1994; Zhang et al., 1998). Nach zwölf Teilungen verlangsamt sich die Teilungsgeschwindigkeit, die Teilungen beginnen asynchron zu werden und die Zygote beginnt mit der zygotischen Transkription. Dieser Zeitpunkt wird als Midblastula Transition (MBT) bezeichnet (Newport und Kirschner, 1982).

Während der nun folgenden Gastrulation kommt es zu Zellbewegungen und Formveränderungen, in deren Folge die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm festgelegt werden. Am animalen Pol entsteht das Ektoderm, am vegetalen Pol das Endoderm und zwischen diesen Keimblättern wird das Mesoderm durch mehrere Induktionssignale gebildet. Die Untersuchungen von Nieuwkoop (1973), Slack (1991), Kessler und Melton (1994) führten zur Etablierung des sogenannten "3-Signal-Modells" der Mesoderminduktion. Demnach werden aus dem Endoderm zwei Signale ausgesandt, ein ventrales Signal, welches das ventrales Mesoderm induziert, und ein dorsales aus dem Bereich des sogenannten Nieuwkoop-Zentrum, das im überliegenden Mesoderm den Spemann-Organisator induziert (Nieuwkoop, 1973; Harland und Gerhart, 1997). Der Spemannsche Organisator wurde von Spemann und Mangold bereits 1924 in ihren berühmt gewordenen Transplantationsversuchen entdeckt. Dabei führte die Verpflanzung dieses Bereichs in einen anderen Froschembryo zu der Organisation einer zweiten Achse an dieser Stelle. Weiterhin wurde gezeigt, dass Explantate, die vor der Gastrula entnommen wurden, sich zu ortgemäßen Gewebe differenzieren; Explantate die nach der Gastrulation transplantiert werden sich jedoch herkunftsgemäß differenzieren. Der

Spemann-Organisator selbst sendet während der frühen Gastrulation das dritte Signal aus, das zur weiteren Differenzierung des Mesoderms beiträgt (Smith und Slack, 1983; Harland und Gerhart, 1997; Heasman, 1997). Während der Gastrulation bildet sich der Blastoporus, der Urmund, und es kommt zu einer Einwanderung von mesodermalen Zellen durch den Urmund in das Innere des Keims: das Gastrocoel, der Urdarm, wird als sekundäre Leibeshöhle gebildet. Der Urmund ist zunächst schlitzförmig, da die Zellen der dorsalen Urmundlippe zuerst einwandern; schließlich wandern auch Zellen der lateralen und ventralen Seite über den Rand des Urmundes. Dabei wird das Blastocoel mehr und mehr von den endodermalen und mesodermalen Geweben verdrängt. Gegen Ende der Gastrulation schließt sich der Blastoporus, um später als posteriores Ende des Verdauungstraktes zu dienen. Nach Abschluss der Gastrulation ist die Oberfläche des Embryos vollständig mit Ektoderm bedeckt, während sich im Inneren das Endoderm befindet. Zwischen diesen beiden Keimblättern befindet sich eine Schicht mesodermaler Zellen. Das Ektoderm entwickelt sich im weiteren Verlauf zu Epidermis, Sinnesepithelien und Zentralnervensystem. Das Mesoderm bildet Muskeln, Knochen, Chorda dorsalis (Notochord), Mesenchym, Herz- und Blutgefäßsystem, Niere und Urogenitalsystem. Aus dem Endoderm entwickeln sich der Verdauungstrakt mit Leber, Pankreas und Schilddrüse, sowie die Lunge und Teile des Harnsystems.

Die sich anschließende Neurulation beginnt mit der Induktion der Neuralplatte auf der dorsalen Körperseite durch das darunter liegende Mesoderm. Durch Einfaltung des Ektoderms entsteht die Neuralfurche, welche sich zum Neuralrohr schließt und vom restlichen Ektoderm ablöst. Das Neuralrohr differenziert sich zum Zentralnervensystem. Hiermit geht die frühe Embryonalentwicklung in die Organogenese über. Der *Xenopus laevis* Embryo entwickelt sich zur Kaulquappe (Tadpole-Stadium), die nach etwa sieben Wochen eine Metamorphose durchläuft und von Kiemen- auf Lungenatmung umstellt, den Schwanz rückbildet und die Ernährung umstellt. Der südafrikanische Krallenfrosch, *Xenopus laevis,* wird nach etwa einem Jahr geschlechtsreif.

1.3 Die Regulation der Transkription

Der Weg von der befruchteten Eizelle bis zu einem komplexen vielzelligen Organismus ist charakterisiert durch koordinierte räumliche und zeitliche Musterbildungsprozesse, die durch zahlreiche genetische Signale gesteuert werden. Hierbei ist insbesondere die differentielle Genexpression eine notwendige Voraussetzung für die Ausbildung der verschiedenen Zelltypen. Es sind aber auch einige posttranskriptionale Regulationsmechanismen beim Prozessieren der primären Transkripte, bei dem Transport der mRNA aus dem Zellkern, der Stabilität der zytoplasmatischen mRNA, sowie bei der Translation der mRNA bekannt (Darnell, 1985). Die selektive Genexpression wird jedoch zum überwiegenden Teil auf der Ebene der Transkription reguliert.

Bei der Transkription wird die genetische Information von DNA in die RNA kopiert, wobei die DNA als Matritze für eine DNA-abhängige RNA-Polymerase dient. In eukaryotischen Zellen gibt es insgesamt drei verschiedene RNA-Polymerasen (Polymerase I, II und III), welche jeweils unterschiedliche Gene transkribieren (Geiduschek et al., 1988; Cramer et al., 2000; Jackson et al., 2000). Normalerweise binden verschiedene Transkriptionsfaktoren an einen Promotor im 5´-Bereich des zu transkribierenden Gens. Zusammen mit diesen Transkriptionsfaktoren öffnet die RNA-Polymerase die DNA Doppelhelix und bewegt sich dann in 3´-5´ Richtung auf dem kodogenen Antisense-Strang der DNA. Dabei synthetisiert sie unter Verbrauch von Ribonukleotiden die RNA in 5´-3´ Richtung komplementär zur Basensequenz des kodogenen Strangs der DNA.

Ein eukaryotischer Promotor besteht aus einem Core-Promotor, der für die Promotoraktivität zwar notwendig, normalerweise aber nicht ausreichend ist, und einem weiter *upstream* liegenden Promotor, der eine Bindung weiterer DNA sequenzspezifischer Faktoren gestattet. Bei Eukaryoten gibt es für jede RNA-Polymerase verschiedene Core-Promotoren. Der Core-Promotor der RNA-Polymerase II enthält neben einem pyrimidinreichen Initiator-Element (Inr, Consensus-Sequenz: PyPyANTAPyPy) an der Transkriptionsstartstelle, eine bei -30 bp liegende TATA-Box (Goldberg-Hogness Sequenz: TATAA), welche in einem Großteil von Protein kodierenden eukaryotischen Genen gefunden wird und als Bindestelle von TBP (TATA-Box binding protein) erkannt

wird (Maniatis et al., 1987; Orphanides et al., 1996). In *Drosophila melanogaster* konnte in TATA-Box freien Core-Promotoren der RNA-Polymerase III ein Element, das *downstream promoter element* (DPE), identifiziert werden. DPE liegt bei +30 bp stromabwärts von der Transkriptionsstartstelle und stellt zusammen mit dem Initiator ein Bindemotiv für TFIID dar (Burke and Kadonaga, 1996). An den Grundpromotor binden generelle Transkriptionsfaktoren (GTF`s), TFIIA, -B, -C, -D, -E, -F und –H (Roeder, 1996; Andel et al., 1999). Sie bilden einen stabilen Prä-Initiationskomplex (PIC) mit der RNA-Polymerase II (Saltzman and Weinmann, 1989; Greenblatt, 1991; Novina and Roy, 1996). Viele Promotoren enthalten darüber hinaus in der Region von -40 bp bis -110 bp eine CAAT-Box und eine GC-Box. Durch diese Promotorelemente kann die Aktivität des RNA-Polymerase II Komplexes gesteigert werden (Dynan and Tjian, 1985; McKnight and Tjian, 1986). Um die Spezifität der Genexpression zu gewährleisten, liegen im *upstream*-Promotor mehrere *upstream activating sequences* (UAS). Die UAS beinhalten Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren (UBF-Protein) und spielen eine elementare Rolle bei der Aktivierung des Promotors. Verschiedene Kombinationen von Transkriptionsfaktoren gestatten so eine spezifische Regulation der Genexpression (Mitchell and Tjian, 1989).

Darüber hinaus können in den Introns des entsprechenden Gens oder in flankierenden Bereichen des Gens noch weitere regulative Elemente (DNA-Response-Elemente), sogenannte Enhancer oder Silencer existieren (Khoury und Gruss, 1983; Lang und Spandidos, 1986; Tamura et al., 1996; Ogbourne und Antalis, 1998). Enhancer erhöhen die basale Transkriptionsrate, während Silencer sie erniedrigen. Zumeist werden diese Elemente durch hochorganisierte Strukturen, bestehend aus mehreren Transkriptionsfaktoren, erkannt. Häufig kommunizieren sie mit dem Promotor über große Multiuntereinheiten-Komplexe sogenannte Mediators, wobei diese bis zu 50 kb entfernt vom Promotor liegen können (Zawel und Reinberg, 1995; Kronberg, 1999). Da zu einem bestimmten Promotor häufig mehr als ein Response-Element gehört, können mehrere Transkriptionsfaktoren durch gegenseitige Verstärkung oder Abschwächung interagieren (siehe Abbildung 2: Eukaryotischer Promotor und die Wirkung von Koaktivatoren (A) und Repressoren (B)).

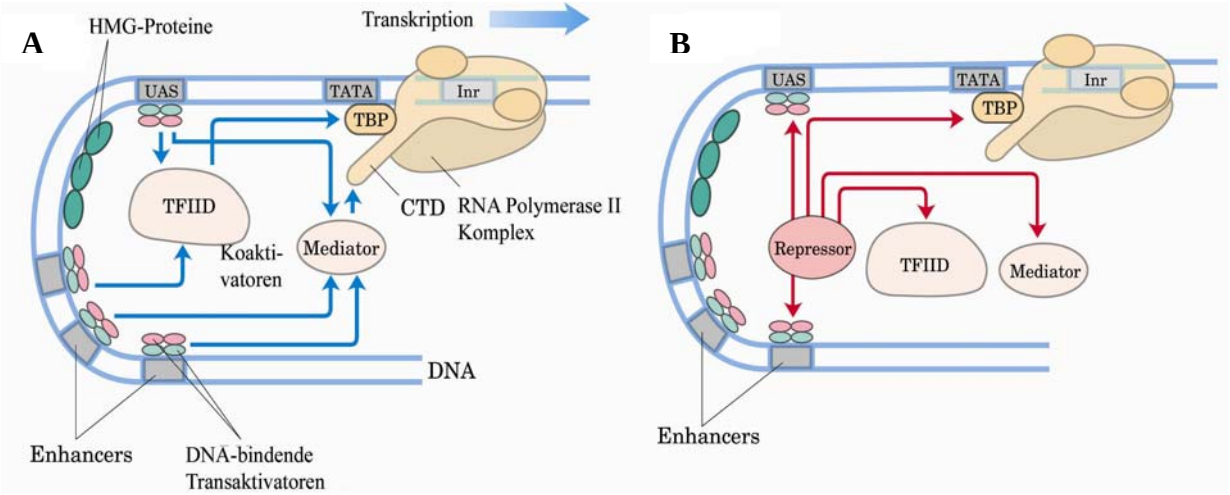


Abb. 2: Eukaryotischer Promotor und die Wirkung von Koaktivatoren (A) und Repressoren (B) (aus Nelson und Cox, 2005). Die DNA bindenden Domänen der DNA bindenden Transaktivatoren sind grün gekennzeichnet, Aktivierungsdomänen sind rot. Durch blaue Pfeile sind Wechselwirkungen der Koaktivatoren gekennzeichnet, durch rote Pfeile mögliche Kontaktstellen der Repressoren.

Neben den Elementen auf der Ebene der DNA hat auch die Struktur des kompletten Genoms einen Einfluss auf die selektive Aktivierung der Transkription. In Eukaryoten ist es in einer kompakten Struktur verpackt, dem Chromatin. Grundbaustein des Chromatins ist das Nukleosom (Arents et al., 1991; Luger et al., 1997). Ein Nukleosom besteht aus einem Oktamer, in dem die Histone H2A, H2B, H3, und H4 doppelt vorliegen. Die DNA ist je zweimal mit einer Länge von 140 bp um ein Nukleosom gewunden. Von außen an die DNA bindet das Histon H1 und sorgt für eine linkshändige Spiralisierung des Chromatins. Diese kompakte Struktur des Chromatins verhindert die Transkription der Gene (Kronberg und Lorch, 1992). Der Zugang zur DNA wird durch Chromatin-modulierende Enzyme, welche die Nukleosomen verschieben können, ermöglicht (Adams und Workman, 1993). Weitere Möglichkeiten zur Chromatindekondensation sind die Modifizierung der Histone und der DNA selbst (Grunstein, 1992; Taunton et al., 1996; Kass et al., 1997; Tsukiyama and Wu, 1997).

1.4 Transkriptionsfaktoren in der Embryonalentwicklung

Es gibt auf der einen Seite die sogenannten Basis-Transkriptionsfaktoren, die für die Transkription praktisch aller Gene erforderlich sind und eine basale Transkriptionsrate auf niedrigem Niveau bewirken. Auf der anderen Seite gibt es spezifische Transkriptionsfaktoren, welche die Basis-Aktivität der Promotoren modifizieren. Gemeinsam ist diesen Proteinen, dass sie aus modulartig angeordneten funktionellen Domänen bestehen. Zu diesen zählt eine DNA-Bindungsdomäne (z.B. Zinkfinger oder Homeo-Domäne), die spezifische Erkennungs- oder Response-Sequenzen innerhalb der Zielgene erkennt. Weiterhin zählt zu den funktionellen Domänen eine Aktivierungsdomäne, welche für die Stimulation der Transkription notwendig ist, da sie mit Komponenten des Basis-Transkriptionsapparates direkte Protein-Protein-Kontakte ausbildet oder über Koaktivatoren stimulierend wirkt. Einige spezifische Transkriptionsfaktoren sind in Form von Homo- oder Heterodimeren aktiv und besitzen dafür eine Dimerisierungsdomäne. Beispiele für Dimerisierungsdomänen sind das Leucin-Zipper Motiv z.B. in Fos, Jun, Myc und das basische Helix-Loop-Helix Bindungsmotiv z.B. in Max, Myc oder MyoD (Lekstrom-Himes et al., 1998).

Es gibt eine Vielzahl entwicklungsbiologisch relevanter Transkriptionsfaktoren, die aufgrund ihrer konservierten DNA-Bindungsdomänen und ihrer räumlichen Struktur in unterschiedliche Familien eingeteilt werden. Eine der umfangreichsten Familien bilden die Homeobox (Hox) Transkriptionsfaktoren. Sie besitzen eine aus sechzig Aminosäuren aufgebaute Homeodomäne, die vier Helices ausbildet (Gehring et al., 1994). Auch die POU-Homeodomäne Gene sind in diese Familie einzuordnen. Sie besitzen neben einer POU-Homeodomäne zusätzlich eine POU spezifische Domäne, die ebenfalls an der DNA-Bindung beteiligt ist. Mitglieder einer weiteren Familie, die Zinkfinger Transkriptionsfaktoren, besitzen zum Teil mehrere DNA-Bindungsdomänen, die über weite Bereiche des gesamten Proteins verteilt sein können. Bei dieser Klasse von Regulatoren bilden sich spezifische Schleifen oder Finger aus, die durch koordinativ gebundene Zinkionen stabilisiert werden (Clarke et al., 1998; Turner et al., 1999). Zinkfinger Bindungsdomänen werden nach der Anzahl und Position von Cysteinen und

Histidinen in der Primärsequenz klassifiziert. Mittlerweile können mehr als zehn verschiedene Klassen von Zink-koordinierenden Domänen definiert werden. Die Cys-Cys, His-His (C_2H_2) Klasse besitzt die größte Anzahl von Mitgliedern. Ein Prototyp stellt TFIIIA dar (Nolte et al., 1998). Ein weiteres Motiv einer Transkriptionsfaktoren-Familie ist die Forkhead-/Winged-helix DNA-Bindungsdomäne, auf die im folgendem Kapitel näher eingegangen wird. Auch HMG-Box Transkriptionsfaktoren, wie die Mitglieder der LEF/Tcf Familie, spielen eine wichtige Rolle während der frühen Embryonalentwicklung. Zu der NF-κB/Rel-Familie zählt der Transkriptionsfaktor NF-κB, der eine entscheidende Rolle bei der zellulären Immunantwort und entzündlichen Prozessen spielt (Barnes et al., 1997; Tisné et al., 1999). Seine räumliche Struktur (Chen et al., 1998) weicht jedoch stark von den anderen beschriebenen Transkriptionsfaktoren ab.

1.4.1 Die Forkhead Transkriptionsfaktoren

Die evolutionär konservierte Genfamilie der Forkhead Transkriptionsfaktoren ist bei vielen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt. Erstmals entdeckt wurde diese Genfamilie, als man bei einer *Drosophila melanogaster* Mutante ektopische Vorder- und Hinterdarmstrukturen in Form von gespaltenen Kopfstrukturen feststellte (Jürgens et al., 1984). Dem für die Mutation verantwortlichem Gen gab man den Namen „Forkhead“ (fkh) (Weigel et al., 1989). Nur wenig später wurden einige hepatozytenspezifische nukleäre Faktoren, die HNF-3 Gene, in Nagetieren identifiziert (Costa et al., 1989; Lai et al., 1990). Das aus den HNF-3 Faktoren und dem Forkhead Genprodukt abgeleitete Forkhead-/HNF-3-Bindungsmotiv definiert eine neue Klasse von Transkriptionsfaktoren (Weigel und Jäckle, 1990; Kaufmann und Knöchel, 1996; Carlsson und Mahlapuu, 2002).

Das Forkhead DNA-Bindungsmotiv erstreckt sich über 110 Aminosäuren (Weigel und Jäckle, 1990). Röntgenkristallographische Analysen zeigten, dass die DNA-Bindungsdomäne aus drei α-Helices (H1-H3), drei β-Faltblättern (F/S1-F/S3) und zwei ausladenden Schleifen (W1 und W2) besteht (Clark er al., 1993). Die ausladenden Flügel, die an die Form eines Schmetterlings erinnern, brachten dem Molekül auch den Namen

„Winged-helix“ Protein ein (Brennan, 1993). Die DNA-Bindung des Forkhead-/Winged-helix Moleküls erfolgt hauptsächlich über die α-Helix H3, die sich dabei in der großen Grube der DNA-Doppelhelix einlagert (siehe Abbildung 3). Weiterhin ist der Übergangsbereich von α-Helix H3 zu β-Faltblatt F/S2 für die DNA-Bindung notwendig (Häcker et al., 1995). Mit Hilfe von PCR-gestützten Methoden ist es gelungen, eine Sequenz von sieben Basen zu identifizieren ((G/A)(T/A)(C/A)AA(C/T)A), die für die DNA-Bindung der Forkhead Gene notwendig, jedoch für eine spezifische Bindung nicht ausreichend ist (Overdier et al., 1994; Pierrou et al., 1994; Häcker et al., 1995; Kaufmann et al., 1995). Diese hochkonservierte Konsensus-Sequenz konnte mittlerweile auf ein fünf Basen umfassendes Motiv ((A/C)AA(C/T)A) reduziert werden (Weigelt et al., 2001). Andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass auch die beiden Schleifen (W1 und W2) eine Rolle bei der spezifischen und festen DNA-Bindung spielen (Shiyanova und Liao, 1999).

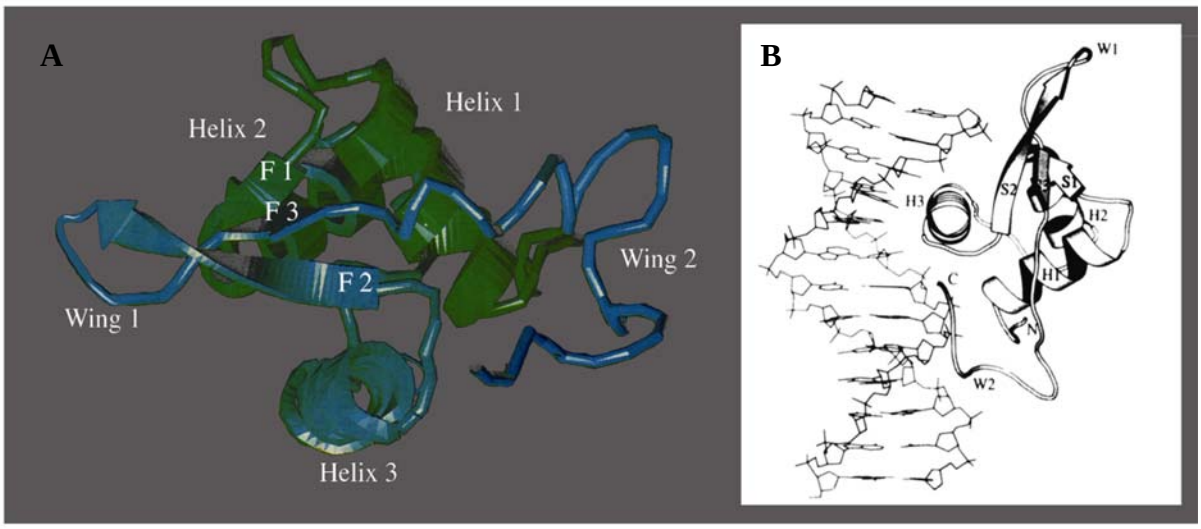


Abb. 3: Schematische Darstellung der Forkhead DNA-Bindungsdomäne (aus Clark et al., 1993). (A) Dreidimensionale Struktur der DNA-Bindungsdomäne bestehend aus drei α-Helices (H1-H3), drei β-Faltblättern (F/S1-F/S3) und zwei ausladenden Schleifen (W1 und W2). (B) Räumliche Darstellung der Forkhead Bindungsdomäne im Kontakt zur DNA-Doppelhelix.

Innerhalb einer Subklasse weist die Forkhead DNA-Bindungsdomäne oft eine hohe Konservierung von 95-100% auf, während zwischen den Subklassen nur einzelne strukturelle Elemente, die vor allem im Bereich der drei α-Helices und des Carboxyl-Endes der Forkhead Domäne liegen, konserviert sind (Kaufmann und Knöchel, 1996). Die außerhalb der Forkhead Domäne liegenden Bereiche zeigen eine große Variationsbreite ihrer Sequenzen. Neben der Forkhead DNA-Bindungsdomäne enthalten einige Fox Gene weitere konservierte Domänen wie zum Beispiel eine N-terminal gelegene Glutaminreiche Region (Patashne, 1988; Sullivan et al., 2001), einen C_2H_2-Zinkfinger, ein Leucin-Zipper Dimerisierungs-Motiv zur Homo- und Heterodimerisierung und eine Bindungsdomäne für den Transkriptions Co-Repressor CtBP1 (Wang et al., 2003; Li et al., 2004).

Aufgrund der uneinheitlichen Namensgebung der Forkhead Transkriptionsfaktoren wurde im Jahr 2000 eine einheitliche allgemein verbindliche Nomenklatur vereinbart (Kästner et al., 2000). Demnach werden die Gene als Fox Gene für „*Forkhead box*“ bezeichnet und anhand der Diversität ihrer DNA-Bindungsdomäne in Subklassen (A-S) unterteilt. Wobei FoxR der N-Subfamilie zugehörig ist. Des Weiteren erfolgt eine Unterscheidung von homologen Genen in unterschiedlichen Spezies durch eine Groß- und Kleinschreibregelung, sowie Kursivschreibregelung. Diese soll beispielhaft an einem Transkriptionsfaktor der Familie dargestellt werden:

FOXA1 (*Homo sapiens*), *Foxa1* (*Mus musculus*), *foxa1* (*Danio rerio*) und *FoxA1* (*Xenopus laevis*). Um den Umbenennungsprozess und die phylogenetischen Beziehungen ständig auf den neusten Stand zu bringen, wurde eine Internetseite eingerichtet (http://www.biology.ponoma.edu/fox.html).

Bis heute sind Forkhead Transkriptionsfaktoren in vielen verschiedenen Spezies gefunden und charakterisiert worden. Phylogenetische Analysen an humanen Fox Genen teilen die 43 bisher bekannten Gene dieser Familie in 17 Subfamilien (*FOXA*-*FOXQ*) ein (Katoh und Katoh, 2004). Weiterhin werden die humanen FOX Proteine in Klasse 1, mit einer C-terminalen basischen Region, und in Klasse 2, ohne diese Region, eingeteilt (siehe Abbildung 4).

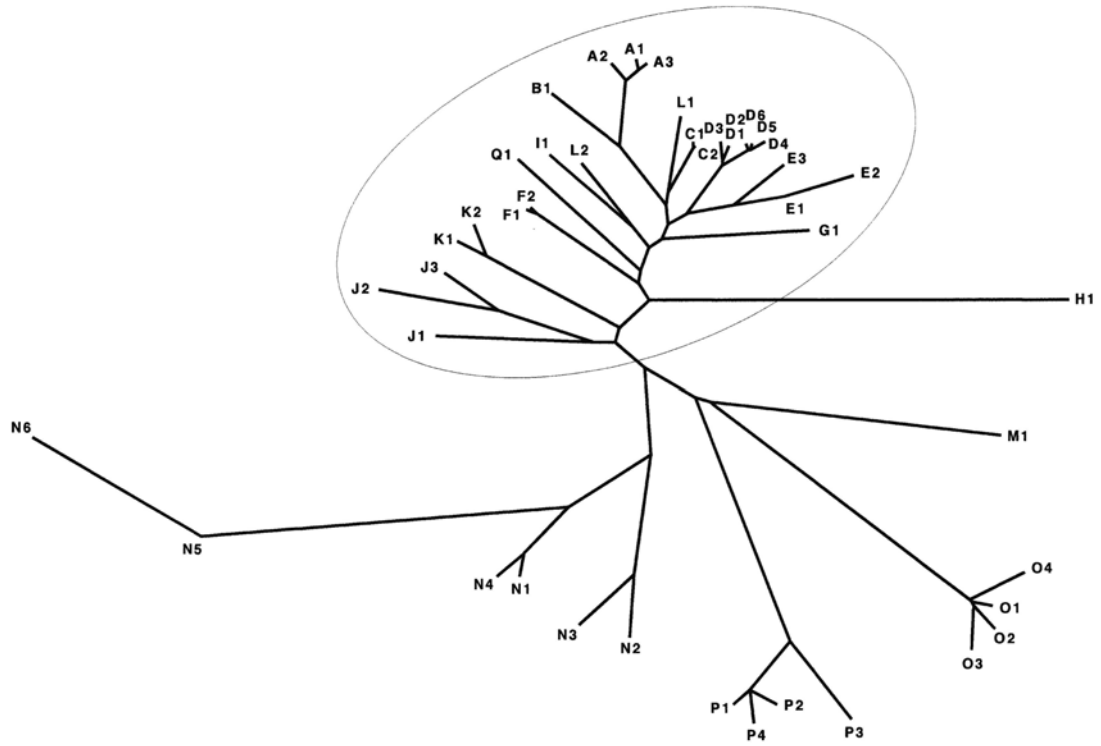


Abb. 4: Phylogenetische Analyse der humanen FOX Genfamilie (aus Katoh und Katoh, 2004). Klasse 1 FOX Gene sind in einem grauen Kreis dargestellt.

Die Forkhead Gene spielen in vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle, zum Beispiel in der Kontrolle des Zellzyklus (Alvarez et al., 2001; Burgering und Kops, 2002; Wittenberg et al., 2005), der Zellproliferation, der Differenzierung (Carlsson und Mahlapuu, 2002) und der Apoptose (Brunet et al., 1999; Dijkers et al., 2002; Gilley et al., 2003) (siehe dazu auch: Abbildung 5). Des weiteren zeigen sie sich als Gene der Stoffwechselregulation zum Beispiel im Glukosestoffwechsel (Shen et at., 2001; Lantz et al., 2004) und im Fettstoffwechsel (Cederberg et al., 2001; Wolfrum et al., 2004). Auch in der embryonalen Entwicklung (Weinstein et al., 1994; Lehmann et al., 2003; Wijchers et al., 2006) und in der Interaktion mit den Sirtuinen, denen eine Schlüsselfunktion in Alterungsprozessen zugeschrieben wird (Greer und Brunet, 2005; Morris et al., 2005; Lehtinen et al., 2006), spielen die Forkhead Gene eine entscheidende Rolle. Multiple Forkhead Transkriptionsfaktoren sind an immunregulatorischen Prozessen beteiligt (Coffer und Burgering, 2004; Lin et al., 2004; Jonsson und Peng, 2005).

Beim Menschen sind einige Erberkrankungen bekannt, die mit Funktionsstörungen einzelner Forkhead Gene in Verbindung gebracht werden können. So sind zum Beispiel das primäre kongenitale Glaukom, die iridogoniodysplastische Anomalie und die Axenfelder-Rieger Anomalie auf eine Mutation des *FOXC1* Gens zurückzuführen (Mears et al., 1996; Gould et al., 1997; Mears et al., 1998). Bei Mutationen im *FOXC2* Gen findet sich das Lymphödem-Distichiasis-Syndrom (Fang et al., 2000; Erickson et al., 2001; Brice et al., 2002) und bei einer Veränderung des *FOXE1* Gens finden sich ein kongenitaler Hypothyroidismus, eine Schilddrüsenagenesie, eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte oder eine Choanalatresie (Castanet et al., 2002). Missbildungen der vorderen Augenkammer und Katarakte können durch *FOXE3* Mutanten hervorgerufen werden (Semina et al., 2001; Ormestad et al., 2002). Veränderungen im *FOXL2* Gen sind bei dem BPES (Blepharophimose-Ptose-Epikantus-Invertus-Syndrom) (Crisponi et al., 2001; De Baere et al., 2001) und beim vorzeitigen Eierstockversagen (Harris et al., 2002) zu finden. Eine Mutation im *FOXN1* Gen kann zum humanen SCID-Syndrom (*severe combined immunodeficiency syndrome*) führen, welches eine T-Zell Immundefizienz in Kombination mit Alopezie und Nageldystrophien einschließt (Frank et al., 1999; Pignata et al., 2001). Es konnte aufgeklärt werden, das *Foxn1* Mutationen in Mäusen einen Defekt der Keratinozyten des Haarschafts und der epithelialen Progenitor-Zellen des Thymus bedingen (Nehls et al., 1994; Nehls et al., 1996; Boehm et al., 2003). *FOXH1* und *FOXO1* mRNAs werden in menschlichen Stammzellen exprimiert (Bandenberger et al., 2004).

Auch in der Karzinogenese sind Forkhead Transkriptionsfaktoren durch Genamplifikation, retrovirale Integration in das Wirtsgenom, chromosomale Translokation und durch Veränderungen der Transkription beteiligt (Katoh und Katoh, 2004). Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des *FOXA1* Gens in Ösophagus- und Bronchialkarzinomen vorliegt (Lin et al., 2002). Ebenfalls überexprimiert ist das *FOXM1* Gen in Pankreas-Karzinomen (Nakamuta et al., 2004), in denen auch der SHH-Smoothened-GLI1-Pathway aktiviert ist (Thayer et al., 2003). Bei Rhabdomyosarkomen entdeckte man eine Fusion der Gene *FOXO1* und *PAX3* oder *PAX7* (Galili et al., 1993; Sorensen et al., 2002). Eine Fusion, aufgrund chromosomaler Translokation, der Gene *FOXO3* und *MLL* (*mixed lineage leukemia*) konnte ebenso bei der sekundären akuten

myeloblastischen Leukämie feststellt werden (Hillion et al., 1997; So et al., 2002). Bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) findet im Rahmen der chromosomalen Translokation eine Fusion der Gene *MLL* und *FOXO4* statt (Parry et al., 1994; So et al., 2003). Interessanterweise zeigte sich bei der Induktion von *FoxO3a* eine Sensitivierung von Mammakarzinom-Zellen zur chemotherapieinduzierten Apoptose (Real et al., 2005).
Im Modellorganismus *Xenopus laevis* konnten mittlerweile über 25 Forkhead Gene identifiziert werden. Die meisten dieser Gene zeigen eine Expression während der Embryogenese, ihre funktionelle Bedeutung ist allerdings nur in den wenigsten Fällen bekannt (Knöchel et al., 1992; Dirksen und Jamrich, 1995; Friedle et al., 1998; Pohl und Knöchel, 2001, 2004, 2005).

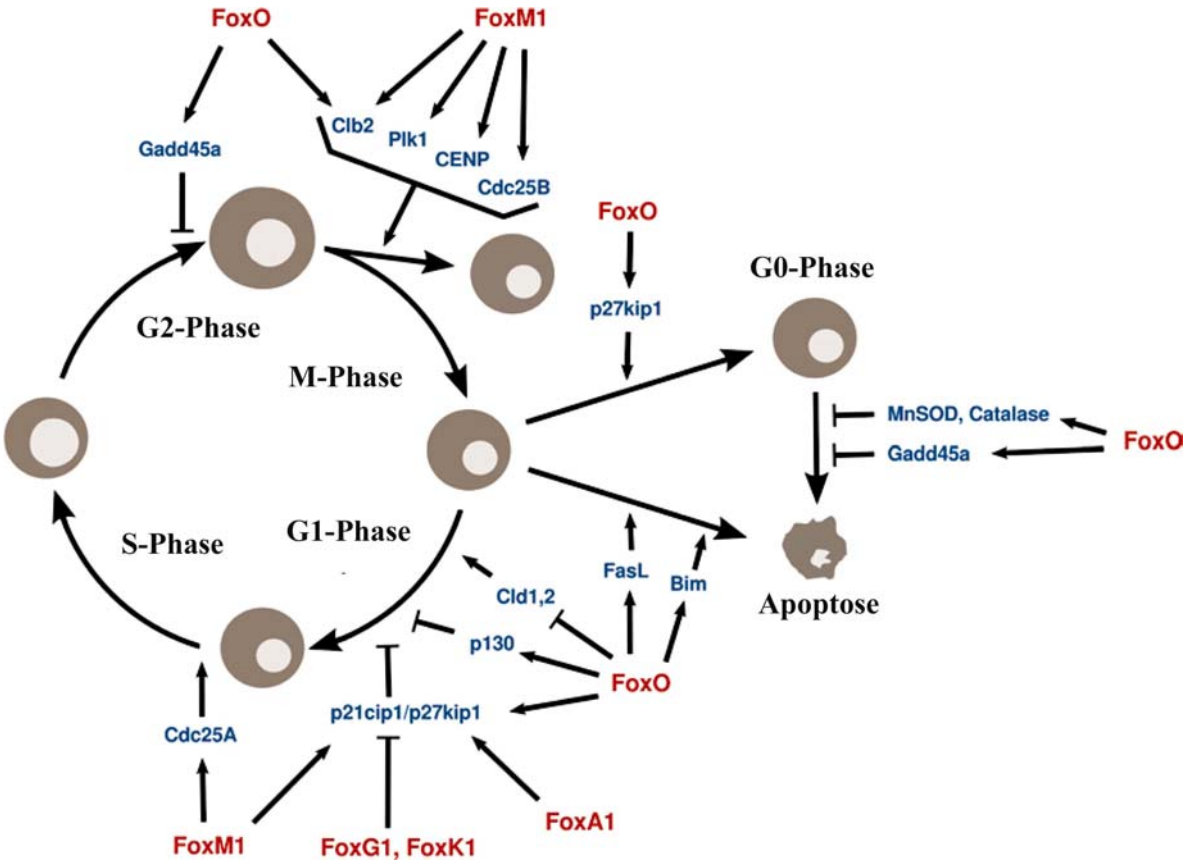


Abb. 5: Forkhead Transkriptionsfaktoren in Zellzyklus und Apoptose (aus Wijchers et al., 2006).

1.4.2 Die Forkhead Transkriptionsfaktoren der Subklasse P

Die an den Spezies Mensch und Maus gewonnenen Daten deuten daraufhin, dass die Subklasse P der Forkhead Transkriptionsfaktoren in Vertebraten vier Mitglieder umfasst. Im Gegensatz dazu wurde in *Drosophila melanogaster* bisher nur ein FoxP Gen beschrieben.

Als erste Gene der Forkhead Subklasse P wurden *Foxp1* und *Foxp2* in der Maus identifiziert und ihre Beteiligung an der Lungenentwicklung und der gastrointestinalen Entwicklung beschrieben (Shu et al., 2001; Lu et al., 2002; Shu et al., 2007). In der Maus konnte ferner gezeigt werden, dass das *Foxp1* Gen eine Rolle bei der Entwicklung des Zentralen Nervensystems spielt (Ferland et al., 2003; Tamura et al., 2003). Im Menschen konnte gezeigt werden, dass *FOXP1* in Zellen des Mammakarzinoms und im diffus-großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*) stark exprimiert wird (Fox et al., 2004; Barrans er al., 2004). Die Expression des *FoxP1* Gens in MALT- (Mucosa assoziiertes lymphatisches Gewebe) Lymphomen deutet auf eine bevorstehende Transformation in ein DLBCL mit schlechter Prognose hin (Sagaert et al., 2006). Andere Studien konnten mittels Tissue-Micro-Array zeigen, dass *FOXP1* als Tumorsuppressorgen fungiert und auf Chromosom 3p14.1 lokalisiert ist, ein Genort der als Tumossuppressor-Genlokus bekannt ist (Banham et al., 2001). Weiterhin gibt es Hinweise, dass das *FOXP1* Gen die Differenzierung von Gewebsmakrophagen (Shi et al., 2004) und die Entwicklung von B-Zellen (Hu et al., 2006) reguliert. In der Herzentwicklung führt eine homozygote Deletion des *FoxP1* Gens zu einer ansteigenden Proliferation in Kombination mit einer aberranten myokardialen Organisation, was eine Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors bei der Entwicklung von Kardiomyozyten vermuten lässt (Wang et al., 2004). In *Xenopus laevis* konnte bereits eine Variante des *FoxP1* Gens identifiziert und sein räumliches und zeitliches Expressionsmuster beschrieben werden (Pohl et al., 2005).

Das *FOXP2* Gen ist ein unverzichtbarer Faktor in der menschlichen Sprachentwicklung, da Mutationen in diesem Gen zu einem komplexen Phänotyp mit schweren Beeinträchtigungen im Artikulationsvermögen und der Schriftsprache führen (KE-Familie) (Lai et al., 2001; MacDermot et al., 2005). Korrespondierend dazu konnte in der Maus eine

Expression von *Foxp1* und *Foxp2* im sich entwickelnden und im reifen Zentralen Nervensystem gezeigt werden (Ferland et al., 2003). Desweiteren konnte eine *Foxp2* Genexpression im embryonalen kardiovaskulären System (Ausflusstrakt des Herzens und Vorhöfe), in der Lunge und in der Muskelschicht des sich entwickelnden Ösophagus der Maus nachgewiesen werden (Shu et al., 2001; Shu et al., 2007).

In Maus und Mensch konnte eine hohe Expression des *Foxp3/FOXP3* Gens in $CD4^+$ $CD25^+$ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) gezeigt werden, die die Eigenschaft besitzen, die Aktivität von $CD25^-$ $CD4^+$ T-Helferzellen herunterzuregulieren (Hori et al., 2003). Das *Foxp3* Gen, das auch als *Scurfin* bekannt ist, reguliert die Aktivität und Anzahl der T_{reg}-Zellen und wirkt somit immunsuppressiv (Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003; Campbell und Ziegler, 2007). Eine Mutation in diesem Forkhead Gen führt zu einer schwerwiegenden lymphoproliferativen Erkrankung der Scurfy Mausmutante (Brunkow et al., 2001). Eine Mutation im menschlichen *FOXP3* Gen kann zum sogenannten IPEX-Syndrom (*Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-linked*) führen, eines schwerwiegenden Zustands bestehend aus einem neonatalen Insulin-abhängigen Diabetes mellitus, chronischer Diarrhoe, Nahrungsmittelallergien und Hypergammaglobulinämie (Chatila et al., 2000; Bennett et al., 2001; Wildin et al., 2002). Bemerkenswerterweise konnte eine erhöhte *Foxp3* Expression und T_{reg}-Aktivität bei erfolgreicher immunsuppressiver Therapie bei manchen Autoimmunerkrankungen beobachtet werden (De Kleer et al., 2004; Ehrenstein et al., 2004; Prakken et al., 2004). Diese sind jedoch auch mit einer spontanen lokalen Immunsuppression und Karzinogenese verbunden (Viguier et al., 2004; Wei et al., 2004). Ein hohes *Foxp3* Expressionsniveau in Urinproben von Patienten ist unter anderem auch mit einer günstigeren Prognose bei der Nierentransplantation verbunden (Muthukumar et al., 2005). In der Maus konnte gezeigt werden, dass *in vitro* generierte, *Foxp3* transduzierte T-Zellen vor Autoimmundermatitis schützen, so dass Modulationen der *Foxp3* Genexpression künftig in der immunsuppressiven Therapie von Autoimmunerkrankungen vorstellbar wären (Loser er al., 2005). Auf der anderen Seite scheint eine zunehmende *FOXP3* Expression bei Patienten die an einem Ovarialkarzinom leiden, mit einer ungünstige Prognose assoziiert zu sein (Wolf et al., 2005).

Der Forkhead Transkriptionsfaktor *Foxp4* wird im sich entwickelnden Darm, Lungengewebe und im Gehirn der Maus, als auch der Ratte, exprimiert (Lu et al., 2002; Takahashi et al., 2008 b). Eine Expression des *Foxp4* Gens konnte ebenso im adulten Herzen, Gehirn, der Lunge und Leber, der Niere und im Hoden der Maus nachgewiesen werden. Außerdem weist eine signifikante Reduktion der *FOXP4* Genexpression im Tumorgewebe bei Patienten mit Nierentumoren auf eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors *FOXP4* in der Pathogenese des Nierenzellkarzinoms hin (Teufel et al., 2003).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nach der Erstbeschreibung des Transkriptionsfaktors *FoxP1* in *Xenopus laevis* (Pohl et al., 2005), weitere Mitglieder der Forkhead Transkriptionsfaktoren der Subklasse P im südafrikanischen Krallenfrosch zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden DNA-Datenbankanalysen und das Screening einer λZAP-cDNA-Bibliothek durchgeführt. Die Sequenzen der isolierten *FoxP* Gene in *Xenopus laevis* sollten ermittelt und charakterisiert werden. Die räumliche Genexpression im Verlauf der Embryonalentwicklung sollte mittels Whole Mount *in situ* Hybridisierung und ihre zeitliche Expression sollte mittels RT-PCR untersucht werden. Darüber hinaus sollten durch Überexpressionsstudien und Funktionsverluststudien mittels Injektion von Morpholino-*antisense*-Oligonukleotiden in frühe *Xenopus laevis* Embryonalstadien die Rolle der isolierten Gene während der Embryogenese morphologisch und histologisch untersucht werden. Mittels Untersuchungen zur *in vitro* Protein-Protein-Interaktion sollte die Wirkungsweise und die Regulation der isolierten *FoxP* Gene näher charakterisiert und die Identifizierung von potentiellen Zielgenen ermöglicht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Reagenzien wurden in p.a. Qualität bezogen.

Acetanhydrid	Sigma, München
Agar	Amersham, Braunschweig
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
BCIP (X-phosphate/5-Brom-4-chloro-3-indolyl-phosphate)	Roche, Basel, Schweiz
Benzylbenzoat	Merck, Darmstadt
BM Purple AP Substrate	Roche, Basel, Schweiz
Boehringer Mannheim Blocking Reagent	Roche, Basel, Schweiz
Borsäure	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau-Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, München
Chaps	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Choriongonadotropin, human (β-hCG)	Schering, Berlin
Cysteinhydrochlorid	Bender und Hohbein, Ulm
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, München
N,N´-dimethylformamid	Sigma, München
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL, Eggenstein

Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N´,N´-Tetraessigsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Amersham, Braunschweig
Formaldehyd 37%	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Formamid	Merck, Darmstadt
Gelatine	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Glutaraldehyd	Sigma, München
Glycerin	Sigma, München
Hefeextrakt	Amersham, Braunschweig
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Magnesiumacetat Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
2-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma, München
Nartiumacetat Trihydrat	Sigma, München
Natriumcitrat	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Buchs, Schweiz

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
NBT (4-Nitro-blue-tetrazolium-chloride)	Roche, Basel, Schweiz
Polyehylenglycol 6000 (PEG 6000)	Serva, Heidelberg
Pepton 40	Difco, Hamburg
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon (PVPP)	Fluka, Buchs, Schweiz
Random Hexamer Primer	Amersham, Braunschweig
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Bender und Hohbein, Ulm
Torula-RNA	Sigma, München
Triethanolamin	Sigma, München
Triethylammoniumacetat	Sigma, München
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	USB, Staufen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20 (Polyethylenorbitanmonolaurat)	Sigma, München
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
X-Gal	Fermentas, St. Leon-Rot
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Puffer und Stammlösungen

Alle wässrigen Lösungen werden, soweit nicht anders angegeben, mit Millipore-Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert (30 min, 2 bar, 121°C).

AP-Puffer (WMISH)	100 mM	NaCl
	50 mM	$MgCl_2$
	100 mM	Tris/HCl, pH 0,5
	0,1% (v/v)	Tween 20
Cysteinchloridlösung	2% (w/v)	Cysteinchlorid in 0,1 x MBSH pH 8,2

10% Chaps	1 g	Chaps in 10 ml DEPC-H_2O 1 ml Aliquots bei -20°C
Deionisiertes Formamid		Formamid mit Ionenaustauscher 1h Rühren, abfiltrieren, in 50 ml Aliquots bei -20°C lagern
Denaturierungslösung (f. Sceening v. Phagenbanken)	0,5 M 1,5 M	NaOH NaCl
Denhardt's 100 x	2% (w/v) 2% (w/v) 2% (w/v)	Ficoll 400 Polyvinylpyrrolidon BSA sterilfiltrieren, bei -20°C lagern
DEPC-H_2O	0,1%	Diethylpyrocarbonat [DEPC] über Nacht in H_2O lösen
Dialysepuffer (f. GST-Fusionsprotein)	50 mM 1 mM 1 mM 20%	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA DTT Glycerin
0,5 M EDTA	186,1 g 800 ml 20 g	EDTA· Na_2 H_2O NaOH-Plätzchen pH 8,0 einstellen auf 1000 ml auffüllen
Elutionspuffer (f. GST-Fusionsprotein)	50 mM 10 mM	Tris/HCl, pH 8,0 Glutathion (reduziert) Aliquots bei -20°C lagern
Ficoll 400 Injektionspuffer	4%	Ficoll 400 in 1 x MBSH sterilfiltrieren, bei 4°C lagern
10 x Fixsalz	20 ml 20 ml 20 ml	1 M MOPS, pH 7,4 20 mM EGTA 10 mM $MgSO_4$
Heparin (100 mg/ml)		in DEPC-H2O lösen, in 100 µl Aliquots bei -20°C lagern

humanes Choriongonadotropin (hCG)	1 mg/ml	in 0,5 mM NaCl-Lösung sterilfiltrieren
Hybridisierlösung (WMISH)	25 ml	deionisiert Formamid
	12,5 ml	20 x SSC
	1 ml	Torula-RNA (50 mg/ml)
	1 ml	50 x Denhardt's
	50 µl	Heparin (100 mg/ml)
	500 µl	10% Tween 20
	500 µl	10% Chaps
	500 µl	0,5 M EDTA pH 8,0
		auf 50 ml mit DEPC-H_2O auffüllen, lagern bei -20°C
Hybridisierungslösung (f. Sceening v. Phagenbanken)		6 x SSC
	20 mM	NaH_2PO_4
	0,4% (w/v)	SDS
		5 x Denhardt's
	1 mg/ml	Lachssperma-DNA
Ladepuffer für die Gelelektophorese		Bromphenolblau/Xylenxyanol
	40%	Saccharose in H_2O
Lysispuffer (f. GST-Fusionsprotein)	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	50 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
		Protease Inhibitor (eine Tablette Complete von Roche/50 ml)
Lysozymlösung	10 mg/ml	H_2O
MAB-Puffer (WMISH)	100 mM	Maleinsäure
	150 mM	NaCl
		pH 7,5
MBSH (WMISH)	88 mM	NaCl
	10 mM	KCl
	2,4 mM	$NaHCO_3$
	0,8 mM	$MgSO_4$
	0,33 mM	$Ca(NO_3)_2$
	0,4 mM	$CaCl_2$
	20 mM	HEPES
		pH 7,4

1 M $MgCl_2$ (WMISH)	20,3 g	$MgCl_2$ mit DEPC-H_2O auf 100 ml auffüllen
MEMPFA (WMISH)	100 mM 2 mM 1 mM 4% (w/v)	MOPS, pH 7,4 EGTA $MgSO_4$ Paraformaldehy
10 x MOPS	200 mM 50 mM 10 mM	MOPS NaOAcetat EDTA
3 M Natriumacetat pH 5,2 (100 ml)	24,6 g 90 ml 10 ml	Natriumacetatanhydrat H_2O 100% Essigsäure
5 M NaCl (WMISH)	21,3 g	NaCl mit DEPC-H_2O auf 100 ml auffüllen
0,5 M Na-Phosphatpuffer pH 6,8	35,5 g 34,5 g	Na_2HPO_4 NaH_2PO_4 mit H_2O auf 1 Liter auffüllen pH 6,8 mit H_3PO_4 einstellen
Neutralisierungslösung (f. Sceening v. Phagenbanken)	1,5 M 0,5 M	NaCl Tris/HCl pH 5,5
OCM-Medium (oocyte culture medium)	50% 15 mM 0,4 mg/ml 1 µg/ml 50 mg/ml 50 U/ml 10%	Leibowitz L15 (L-Glutamin minus) HEPES L-Glutamin BSA Gentamycinsulfat Nystatin FBS (fetal bovine serum) pH 7,8, sterilfiltriert
PBS (WMISH u. Pulldown)	137 mM 2,7 mM 8,5 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4 pH 7,3
PTW (WMISH)	 0,1% (v/v)	1 x PBS Tween 20

Proteinase-K Lösung I	0,2%	Proteinkinase-K (10 µg/ml) in PTW
Proteinase-K Lösung II	5 µg/ml	Proteinkinase-K in 0,1 x MBSH
Puffer A (f. Pulldown)	40 mM 5 mM 0,2 mM 1 mM 0,5% 100 mM	HEPES, pH 7,5 $MgCl_2$ EDTA DTT NP-40 KCl
Puffer B (f. Pulldown)	40 mM 5 mM 0,2 mM 1 mM 0,5% 300 mM	HEPES, pH 7,5 $MgCl_2$ EDTA DTT NP-40 KCl

Qiagenlösungen zur Isolierung von Plasmid DNA

Lösung P1	50 mM 10 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA
Lösung P2	0,2 M 1% (w/v)	NaOH SDS
Lösung P3	3 M	Kaliumacetat pH 5,5
Lösung QBT	750 mM 50 mM 15% (v/v) 0,15%	NaCl MOPS pH 7,0 Isopropanol Triton X-100
Lösung QC	1 M 50 mM 15% (v/v)	NaCl MOPS pH 7,0 Isopropanol
Lösung QN	1,25 M 50 mM 15% (v/v)	NaCl Tris/HCl pH 8,5 Isopropanol
Resolving Puffer (f. SDS-PAGE)	1,5 M	Tris, pH 8,8

5 x SDS-Elektrodenpuffer	125 mM	Tris
(f. SDS-PAGE)	960 mM	Glycin
SDS-Elektrodenpuffer	5 x	SDS-Elektrodenpuffer
(f. SDS-PAGE)	10%	SDS
		auf 1 Liter auffüllen
SDS-Probenpuffer	0,5 M	Tris/HCl, pH 6,8
(f. SDS-PAGE)	0,025%	Bromphenolblau
	10%	SDS
	20% (v/v)	Glycerin
	25%	β-Mercaptoethanol
SM-Puffer	5,8 g/l	NaCl
	2 g/l	$MgSO_4$
	50 ml/l	1 M Tris/HCl
		pH 7,5
20 x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat
		pH 7,0
TAE-Puffer	40 mM	Tris/Acetat pH 8,3
	1 mM	EDTA
Tbf-1	100 mM	RbCl
	30 mM	Kaliumacetat
	50 mM	$MnCl_2$
	10 mM	$CaCl_2$
	15%	Glycerin
		pH 5,8 mit Essigsäure
		bei 4°C lagern, sterilfiltrieren
Tbf-2	75 mM	$CaCl_2$
	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	15%	Glycerin
		pH 6,5 mit KOH
		bei 4°C lagern, sterilfiltrieren
Teltlösung	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
	62,5 mM	EDTA
	0,4% (v/v)	Triton X-100
	2,5 M	LiCl

TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA
Torula RNA	50 mg/ml	in DEPC-H_2O lösen, in 1 ml Aliquots bei -20°C lagern
Tris/HCl pH 9,5 (WMISH)	1 M	Tris in H_2O pH mit 37% HCl einstellen (zum messen des pH-Wertes spezielle Tris-Elektrode oder pH-Papier benutzen; Tris-Puffer nicht mit DEPC-H_2O ansetzen)
Waschpuffer (f. GST-Fusionsprotein)	50 mM 500 mM 1 mM 1%	Tris/HCl pH 8,0 NaCl EDTA Triton X-100

2.1.3 Nährmedien und Zusätze

2 TY	1,6% 1% 1%	Tryptone Hefeextrakt NaCl
NZ-Medium	1% 0,5% 0,5% 0,2%	Casein Hefeextrakt NaCl $MgSO_4$
NZ-Topagar	 0,7%	NZ-Medium Agarose 2 min kochen und lagern bei 4°C
LB	1% 1% 0,5%	NaCl Tryptone Hefeextrakt

Antibiotika	Endkonzentration	Stammlösung (1000 x)
Ampicillin (Amp)	50 mg/l	50 mg/l H_2O sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)

X-Gal (2 ml)	100 mg 2 ml	X-Gal N,N´-dimethylformamid bei -20°C lagern

Eine Agarplatte für eine Blau-Weiß-Selektion wird mit 20 µl 50 mg/ml X-Gal beschichtet.

2.1.4 Reaktionssysteme (Kits)

5-Bromo-2´-desoxy-uridine Labeling and Detection Kit II	Roche, Basel, Schweiz
DIG RNA Labeling Mix 10 x	Roche, Basel, Schweiz
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham, Braunschweig
Endofree Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
GeneRacer Kit	Invitrogen, Karlsruhe
MMessage machine Kit (SP6: T3; T7)	Ambion, Austin, USA
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Purescript RNA Isolation Kit	Gentra Systems
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Spin PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Random-Prime-Labelling Kit	Gibco, Eggenstein
Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy-RNA Purification Kit	Qiagen, Hilden
T7 TNT Quick Coupled Transcription/	Promega, Heidelberg

Translation Systems	
Superscript II RT	Invitrogen, Karlsruhe
Thermisequenase Kit	Amersham, Braunschweig
Trizol Reagent	Gibco, Eggenstein

2.1.5 Enzyme

DNaseI RNase-frei	Boehringer, Mannheim
Klenow Fragment	Boehringer, Mannheim
Phusion Polymerase	Finnzymes, Finnland; Espoo
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Life Technologies, Karlsruhe; Fermentas, Vilnius, Litauen ; Gibco BRL, Eggenstein
RNasen	Boehringer, Mannheim
SP6, T3, T7 RNA-Polymerasen	Boehringer, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Abgene, Hamburg
T4 DNA Ligase	Life Technologies, Karlsruhe

2.1.6 Antikörper

Anti-Digoxigenin-Antikörper, FAB-Fragment AP	Roche, Basel, Schweiz

2.1.7 Radioisotope

^{32}P-markiertes dCTP	Amersham, Braunschweig
^{35}S-Methionin	Amersham, Braunschweig

2.1.8 Nukleinsäuren

2.1.8.1 Vektoren

pBluescript II KS+	Stratagene, Heidelberg
pCS2+	Rupp et al., 1994
pCS2+ Myc tag	Rupp et al., 1994
p-Drive Cloning Vector	Qiagen, Hilden
pGEX-4T-1	Stratagene, Heidelberg
pGL3-Basic	Promega, Heidelberg

Alle Vektorenkarten befinden sich im Anhang.

2.1.8.2 Oligonukleotide und Morpholino-Oligonukleotide

Oligonukleotide werden von Thermo Scientific, Ulm bezogen.

Tab. 1: Auflistung der Oligonukleotidsequenzen.

Gen	Sequenz
RT-PCR Primer :	
FoxP1/Fox P1b forward	5′ -CATGATTCCAGCTGAACTGC- 3′
FoxP1/Fox P1b reverse	5′ -GCACTCGATACTAGGTTCAG- 3′
FoxP1c forward	5′ -GTGCAGCAATTAGAGTTACAG- 3′
FoxP1c reverse	5′ -CACAGGTGAAAGTTTCCATAG- 3′
FoxP2a forward	5′ -AGGTATTAAGTCATGATGCAGG- 3′
FoxP2a reverse	5′ -CAGCATCTAATTGGCTGCTTAG- 3′
FoxP2 forward	5′ -CCAGCTTAGGCTATGGTGCAG- 3′
FoxP2 reverse	5′ -TGCGGTGGTGACCAAAGACATT- 3′
FoxP4 forward	5′ -CATTGTCCCAAAGTCCAGCAC- 3′

FoxP4 reverse	5′ -GAAGTGCTGCCAGATGATGG- 3′
FoxP4a forward	5′ -TGTTGTCCACCTGCTCTTGT- 3′
FoxP4b forward	5′ -GTGCAGGGTGTTTCATCTTTACT- 3′
FoxP4c forward	5′ -GCATTCTGTTCTATTGTGTGCAG- 3′
FoxP4a/b/c reverse	5′ -GGGTTTAGCTCTCCATTGGTCT- 3′
RACE-Primer :	
FoxP2 5′ RACE Primer GSP-1	5′ -CAGCATCTAATTGGCTGCTTAG- 3′
FoxP2 5′ RACE Primer GSP-2	5′ -CATTGAACTGTTGCTTATTGTCTC- 3′
FoxP4 5′ RACE Primer P4as1	5′ -GTGCTGTTGCTGCAACTGTTG- 3′
FoxP4 5′ RACE Primer P4-700rev	5′ -ATTGCTTGTTTCCCAAAGCTAAC- 3′
Klonierungs-Primer :	
FoxP1/Fox P1b forward	5′-CGGGATCCATGATGACACCTCAAGTGA- 3′
FoxP1/Fox P1b reverse	5′-CCGCTCGAGTTACTCCATGTCCTCATTT- 3′

Morpholino-*antisense*-Oligonukleotide:

Morpholino-*antisense*-Oligonukleotide oder kurz Morpholinos sind Nukleinsäure-Analoga, die in der Entwicklungsbiologie verwendet werden, um einen sogenannten Knockdown zu erzielen.

Es handelt sich um synthetische Moleküle, die durch strukturell veränderte Nukleinsäure-Bausteine erzeugt werden und die auch als PMOs (*Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotide*) bezeichnet werden. Sie werden in *antisense*-RNA-Experimenten eingesetzt und hemmen durch die Bindung an die komplementäre mRNA entweder die Translation oder das Splicing der prä-mRNA und damit die Bildung eines Proteins. Vor allem in *Xenopus laevis* und *Danio rerio* werden Morpholinos häufig eingesetzt, um die Funktion von Genen in der Embryonalentwicklung zu analysieren (Summerton und Weller, 1997).

Die Morpholinos werden lyophilisiert von der Firma Gene Tools, LLC, Philomath, USA bezogen (http://www.gene-tool.com). Die Aufnahme erfolgt nach Angaben des Herstellers in autoklaviertem H_2O. Direkt nach der Aufnahme werden die Morpholinos aliquotiert und

bei -70°C gelagert. Vor der Mikroinjektion werden die Morpholinos auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.1.9 Geräte

Tab. 2: Verwendete Geräte, Modell und Hersteller.

Gerät	Modell	Hersteller
Binokular		Saur
Brutschränke (13, 18°C)	WB22K	Mytron
Computer	PowerMac1, G3 Prozessor Aspire 1362LMi	Apple Computer Acer
Dokumentationsanlage für Embryonen und histologische Schnitte	DP 11 (Digitalkamera) SZH 10 (Binokular) BH-2 (Mikroskop)	Olympus
Eismaschine	AF-10	Scotman
Feinwaage	Explorer	Ohaus
Gefrierschrank -20°C		Liebherr
Gefrierschrank -70°C	Herafreeze	Heraeus Instruments GmbH
Gefriertruhe -70°C	E 80-360 T	Colora GmbH (Lorch)
Gelelektophoresekammer	GNA 100 und 200	Pharmacia
Geltrockner	Pherotemp 40	Biotec Fischer
Heizblock	HBT130	HLC
Heizrührer	MR3000	Heidoplph
Injektionsanlage	Pneumatic Picopump PV 820	Bachhofer, Reutlingen
Inkubationsschrank	BK-600	Heraeus Instruments GmbH
Kaltlichtquelle	EK-1	Euromex
Kapillaren	Borosilicatglas mit Filament 0,1 mm	H. Saur Laborbedarf
Konfokales Lasermikroskop	Leica TCS 40	Leica
Kühlschränke	FKS 5000 Type 2000	Liebherr
Kühlzentrifuge	Biofuge primoR	Heraeus
Kryostat	Frigomix	Braun
Luminometer	LB 9507	Berthold
Mikrowelle	Micromat	AEG
N_2-Flaschen	EG-Nr. 231-783-9	MTI Industriegase
Netzgerät	P25	Biometra
PCR-Geräte	Gene Amp PCR System 2400 und	Perkin Elmer

	DNA Termal Cycler 480	Perkin Elmer
pH-Meter	CG 837	Schott
Phospho-Imager	Fujix BAS 1000	Fuji
Photometer	Lambda Bio	Perkin Elmer
Pipetten	2er ; 10er ; 20er ; 200er ; 1000er	Gilson
Puller (f. Injektionsnadeln)	PN-30	Narishige, Japan
Rollmischer	TRM-V	IDL GmbH
Schüttler (Bakterien)	Certomat	B.Braun
Schüttler (Rotat.)	Rocky	Fröbel Labortechnik
Sequenziergerät	ABI PRISM 377	Perkin Elmer
Screen (Phosphoimager)	Fuji BAS III S	Fuji
Spektralphotometer	Lamba Bio	Perkin Elmer
Szintillationszähler	LS 1701	Beckman
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
UV-Tisch	UV-Transilluminator 312 nm	Bachofer
Vibratom	Serie 1000	Technical Products Internat.
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
Waage	PE360	Mettler
Wasserbäder	Typ 1002	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH)
Zentrifuge, Ausschwingrotor	Universal 16 A	Hettich

2.1.10 Software

Tab. 3: Software und Programme.

Verwendungszweck	Programm
Bild- und Grafikverarbeitung	Adobe Photoshop 7.0, Adobe Systems
DNA-/Protein-Sequenzverarbeitung	MacMolly Tetra, Version 3.9, Soft Gene GmbH
Genomische Analysen und Vergleiche, Proteinsuche, BLAST- und EST- Analysen	NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), ENSMBL (http://www.ensembl.org/index.html) und Xenbase (http://www.xenbase.org/)
Phylogenetische Stammbäume	CLUSTALW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)

Textverarbeitung	Microsoft Office 2000 Premium, Microsoft Corporation Adobe Acrobat 7.0 Professional, Adobe Systems

2.1.11 Sonstiges

Tab. 4: Auflistung der verwendeten sonstigen Produkte und Hersteller.

Produkt	Hersteller
Alufolie	Gut & Billig
Dumont Pinzetten	Merck
Einwegspritzen	HeukeSass Wolf GmbH
Falcongefäße	Corning
Glasmaterialien: Flaschen, Pasteurpipetten, Erlenmeyerkolben usw.	Brand, Schott
Haushaltsfolie	Gut & Billig
Kanülen	Braun
Kunstoff-Einwegmaterial: Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Petrischalen, Pipetten usw.	Eppendorf, Braun, Greiner, Sarstedt
Parafilm	Pechiney
PCR-Gefäße	Biozym
Quarz-Küvetten	Hellma
Whatmanpapier	Schleicher & Schuell

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Bakterienstämme

Tab. 5: Bakterienstämme mit zugehörigen Genotpen.

Stamm	Genotyp
Escherichia coli XL 1-blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17/rk-mk-, supE44, relA1, F´(proA, lacIqZΔM15, Tn10 tetr)

Escherichia coli XL 1-blue MRF´	EI-(mcrA)183 D(mcrCD-hsdSMR-mrr)173 endA1, supE44 lac[F´proAB lacIqZDM15 Tn10(Tetr)] thi-1 recA1 gyrA96 relA1
Escherichia coli LE392	eI4-(mcrA), galK2, galT22, metB1, trpR55, hsdR514, Δ(lacIZY)6, supE44, supF58
Escherichia coli BL21 (DE3)	hsdS, gal (ΔcI*ts*857)ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7 gene1

2.2.2 Phagen

Lambda ZAP® II	Stratagene, La Jolla, USA
R408, ExAssist Helfer Phage	Stratagene, La Jolla, USA

2.2.3 Versuchstiere

Der südafrikanische Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) gehört zur Familie der zungenlosen Froschlurche (*Pipidae*) der Ordnung *Anura*.

Pigmentierte und Albino-Frösche wurden von der Firma Nasco, Wisconsin, USA, erworben. Betreuung und Pflege der Tiere durch Mitarbeiter der Tierforschungsanlage Oberberghof, Universität Ulm. Die Tiere wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen gehalten und behandelt.

Die Bestimmung der Embryonalstadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967).

2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.3.1 Arbeiten mit DNA

2.3.1.1 Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab (Telt-Methode)

Die Telt-Methode bzw. LiCl-Methode (Wilimzig, 1985) stellt eine schnelle und effiziente Methode zur Isolierung kleiner Mengen von Plasmid-DNA dar.
Zur Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab, zum Beispiel für Restriktionsanalysen, Sequenzierungen oder Subklonierungen, werden von 3 ml einer Bakterien-Übernachtkultur in einem Eppendorfgefäß zweimal 1,5 ml für 5 Minuten bei 6.000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert und das Bakterienpellet in 150 µl TELT-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) wird 5 Minuten bei RT inkubiert und die Zellen durch zweiminütige Inkubation in einem kochenden Wasserbad aufgeschlossen. Die Proben werden dann 2 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 10 bis 15 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Pellets mit einer Pipettenspitze wird die Lösung zur Präzipitation der DNA mit 150 µl Isopropanol versetzt. Die Plasmid-DNA wird durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 14.000 rpm gefällt und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen für 20 Minuten im Wärmeblock bei 37°C wird das Pellet in 30 bis 40 µl DEPC-H_2O oder TE-Puffer resuspendiert und 1 µl einer RNAse A-Lösung (1 mg/ml) zugegeben.
Für die meisten weiteren Schritte wie Restriktionsanalysen oder Subklonierungen kann die so gewonnene Plasmid-DNA ohne weitere Aufreinigung verwendet werden.

2.3.1.2 Isolierung von Plasmiden im präparativem Maßstab

Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und wird zur Präparation größerer Mengen reiner Plasmid-DNA für Klonierungen oder präparativer Restriktionsverdaue eingesetzt. Verwendet werden hierzu das Plasmid Midi-

Kit und das Plasmid Mini-Kit, beides von der Firma Qiagen, wobei die Menge Bakteriensuspension beziehungsweise gewünschter DNA darüber entscheidet, ob eine „Midi"- oder „Mini"-Präparation durchgeführt wird.
Bei der alkalischen Lyse werden die Bakterien durch Inkubation in einem alkalischen Puffer, der zumeist NaOH oder SDS enthält, aufgeschlossen und anschließend über Anionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Am Vortag werden 50 µl einer Bakterien-Flüssigkultur oder eine Bakterienkolonie in 50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektivantibiotikum überimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden in 50 ml Falcon-Röhrchen für 10 Minuten bei 4.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml Puffer P1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 wird 2 Minuten geschwenkt und anschließend 4 ml Puffer P3 zugegeben. Nach erneutem Schwenken wird das Bakterienlysat in 12 ml Reagenzröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wird auf eine mit 3 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-tip 100 Säule geladen und die Säule mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wird mit 5 ml QC-Puffer in frische Reagenzröhrchen eluiert. Zur DNA-Fällung wird 0,7 x Vol. (3,5 ml) Isopropanol zugegeben, gut gemischt und für 15 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird nun mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50 bis 100 µl DEPC-H_2O oder TE-Puffer aufgenommen.

2.3.1.3 Aufreinigung von DNA mit dem Qiagen PCR Purification Kit

Um Produkte aus präparativen PCR-Ansätzen oder linearisierte Vektor-DNA aufzureinigen, wird das PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Der Ansatz wird möglichst ölfrei in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit DEPC-H_2O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 500 µl PB-Puffer wird der Ansatz gemischt und auf eine QIAquick Säule mit DNA-bindender Silicagel-Membran überführt. Nach Zentrifugation bei 8.000 rpm für 1 Minute wird mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und zum Trocknen der Membran erneut zentrifugiert, zunächst bei 8.000 rpm für 1 Minute, dann bei 14.000 rpm für 1 Minute. Die Säule werden in ein frisches 1,5 ml

Eppendorfgefäß gesetzt, 5 Minuten bei 37°C vollständig getrocknet und die DNA in 20 bis 30 µl DEPC-H_2O durch Zentrifugation eluiert.

2.3.1.4 Manuelle Aufreinigung von DNA

2.3.1.4.1 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Die Ethanolfällung von DNA beruht auf dem physikalischem Effekt des Lösungsmittelentzuges der DNA durch Ethanol (Geiduschek und Gray, 1956). Die Zugabe von Kationen bewirkt eine Ladungsneutralisierung der negativen Ladung des DNA-Moleküls, so dass die DNA-Moleküle kollabieren und in eine kompakte, auf molekularer Ebene stäbchenförmige, DNA-Phase übergehen (Eickbush und Moudrianakis, 1978).
Sofern das Volumen der DNA-Lösung nicht bekannt ist, wird dieses zunächst bestimmt. Dann wird 1/10 des DNA-Lösungsvolumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) hinzugegeben. Danach werden 3 Volumina des jetzigen Volumens absoluten Ethanols oder 96%igen Ethanols zugegeben und vermischt. Wenn die DNA-Konzentration hoch ist, kann mit weniger Ethanol, z.B. 2 bis 2,5faches Volumen, eine effizientere Fällung erreicht werden.
Die Fällung wird für 30 Minuten bei 4°C oder 20 Minuten bei -20°C inkubiert. Diese wird dann zum Sedimentieren der gefällten DNA für 5 bis 10 Minuten bei 4°C in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und anschliedend der Überstand abgenommen. Zur Entfernung von Salz- und Phenolresten wird die gefällte DNA mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Danach erfolgt eine weitere Zentrifugation für 5 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit. Abschließend wird der Überstand abgenommen, das DNA-Pellet getrocknet und in DEPC-H_2O aufgenommen.

2.3.1.4.2 Isopropanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Die Isopropanolfällung beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Ethanolfällung, besitzt aber den Vorteil, dass nur 0,7 Volumina der DNA-Lösung Isopropanol zugegeben werden müssen und damit weniger Salz mit ausfällt. Nachteilig ist allerdings die geringere

Flüchtigkeit von Isopropanol und das weniger feste, durchsichtige Pellet nach der Zentrifugation. Deshalb erfolgt nach einer Isopropanolfällung meist ein Waschschritt mit Ethanol.

2.3.1.4.3 Reinigung über Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe werden diese in einem Agarosegel durch Anlegen einer elektrischen Spannung voneinander getrennt (Thorne, 1967; Johnson und Grossman, 1977; Southern, 1979). DNA wandert aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen in einem elektrischen Feld zur Anode.
In Abhängigkeit von der erwarteten Größe der Fragmente kann die Agarose-Konzentration zwischen 0,8 und 3% variieren. Die Agarose wird in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in die Gelapparatur gegossen. Nach vollständigem Erkalten wird das Gel mit 1 x TAE überschichtet und die zu untersuchenden Proben können aufgetragen werden. Diese werden zur Erhöhung der Dichte und zur besseren Visualisierung mit 2 bis 5 µl Ladungspuffer versetzt. Die Trennung erfolgt durch Anlegen einer konstanten Stromstärke zwischen 20 und 200 mA.
Durch die Interkalation des Ethidiumbromids während der Elektrophorese kann im Anschluss die DNA unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und die gewünschten Fragmente mit einer sauberen Skalpellklinge ausgeschnitten werden. Das isolierte Agarosestückchen wird in ein Eppendorfgefäß überführt und ausgewogen. Zur DNA-Extraktion wird das QIAEX Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Dazu wird das Gelfragment mit einem mindestens dreifachen Volumen QX1-Puffer versetzt und 10 Minuten bei 50°C im Wasserbad unter mehrfachem Invertieren vollständig aufgelöst. Die Lösung wird anschließend auf eine QIAquick-Säule geladen und 1 Minute in der Tischzentrifuge bei 8.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird danach mit 500 µl QX1-Puffer und anschließend mit 500 µl PE-Puffer gewaschen, in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt, 5 Minuten bei 37°C getrocknet und die DNA in 20 bis 30 µl DEPC-H_2O durch Zentrifugation eluiert.

2.3.1.5 Konzentrationsbestimmung von wässrigen Nukleinsäurelösungen

Nukleinsäurekonzentrationen werden in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm bestimmt. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Die Konzentration wird nach Lambert-Beer errechnet oder wie folgt bestimmt:

$OD_{260} = 1$ entspricht 50 µg dsDNA

$OD_{260} = 1$ entspricht 40 µg RNA

$OD_{260} = 1$ entspricht 33 µg Oligonukleotid

Um die Reinheit (Proteinfreiheit) eines Nukleinsäure-Präparats abzuschätzen, kann außerdem die Optische Dichte bei 280 nm gemessen werden. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} beträgt bei proteinfreier DNA bzw. RNA 1,8 bis 2,0.

2.3.1.6 Enzymatische Modifikation von DNA

2.3.1.6.1 Restriktionsspaltung

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die palindrome DNA-Sequenzen spezifisch spalten, indem sie die Phosphodiester-Bindung doppelsträngiger DNA trennen (Smith und Wilcox, 1970). Je nach Enzym entstehen glatte Enden (*blunt-ends*) oder 5´- bzw. 3´-überhängende Enden (*stick- ends*).

Restriktionsanalysen werden in 20 bis 50 µl Ansätzen durchgeführt. Für die Hydrolyse von 1 µg DNA werden 5 bis 10 U Enzym eingesetzt, wobei darauf zu achten ist, dass die Enzymmenge 10 Vol% des Gesamtansatzes nicht überschreitet, da das im Lagerungspuffer enthaltene Glycerin die Aktivität des Enzyms stört. Außerdem kann durch übermäßige Enzymzugabe eine sogenannte *Star-Activity* erfolgen, bei der eine unspezifische Spaltung der DNA durch das Restriktionsenzym stattfindet. Die optimalen Bedingungen werden mit dem vom Hersteller mitgelieferten Restriktionspuffer eingestellt. Die Hydrolyse erfolgt in Abhängigkeit von dem gewählten Enzym meist bei 37°C. Für Testrestriktionen mit denen

bestimmt werden soll, ob ein Insert erfolgreich kloniert wurde, ist eine Inkubationszeit von 1,5 bis 2 Stunden durchaus ausreichend. Wird dagegen für den Einsatz in eine Klonierung eine vollständige Restriktion benötigt, kann die Hydrolyse über Nacht inkubiert werden.
Die Analyse der Restriktionsprodukte erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.1.4.3).

2.3.1.6.2 Ligation

Zur Vermehrung und weiteren Untersuchung rekombinanter DNA-Fragmente werden diese in Plasmidvektoren ligiert (Dugaiczyk et al., 1975). Voraussetzung für die Ligation sind kompatible Enden der zu ligierenden Fragmente, die durch Restriktion (siehe 2.3.1.6.1) erzeugt und mit den nachfolgend aufgeführten Methoden optimiert werden können.
Die T4-DNA-Ligase benötigt für die Verknüpfung der offenen Enden ATP, das in den Puffer supplementiert werden muss. Die Bedingungen für eine optimale Ligation müssen innerhalb der folgenden Rahmenbedingungen im einzelnen adaptiert werden. Das Reaktionsvolumen sollte möglichst gering gehalten werden, die Temperatur sollte zwischen 14°C und 20°C liegen und die Reaktionsdauer von 2 Stunden bis 24 Stunden richtet sich nach der Art der Ligation (*sticky*- oder *blunt-ends*). Es werden zwischen 20 und 100 ng linearisierter Vektor-DNA mit dem 5 bis 10fachen molaren Überschuss an Insert-DNA gemischt, der Ansatz mit 1/10 Volumen 10 x Ligase-Puffer des entsprechenden Herstellers versetzt und mit ATP zu einer Endkonzentration von 1 mM supplementiert. Durch Zugabe von 1 U Ligase wird die Reaktion gestartet.

2.3.1.6.3 Radioaktive Markierung von DNA

Dieses Verfahren beruht auf dem Einbau eines radioaktiv markierten Nukleotids (^{32}P-dCTP oder ^{32}P-dATP) in einen neu zu synthetisierenden DNA-Strang. Dazu wird zunächst 25 ng DNA in 5 bis 20 µl Wasser gelöst und durch Kochen denaturiert. Durch sofortiges Kühlen auf Eis wird eine Renaturierung verhindert, anschließend wird eine Mischung aus

Random Hexamer-Primern und Nukleotiden zugegeben, entsprechende Pufferbedingungen eingestellt und das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zugegeben. Alle zugehörigen Lösungen sind in dem Random-Prime-Labelling-Kit der Firma Gibco enthalten und wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.
Die Abtrennung der freien Nukleotide erfolgt über MicroSpin™ G50-Säulen der Firma Pharmacia. Auch hier wird entsprechend der Herstellerangaben verfahren. Die aufgereinigte, radioaktiv markierte DNA kann als Sonde beispielsweise beim Screening einer Phagenbank (siehe 2.4.2.2) eingesetzt werden.

2.3.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die gezielte Amplifikation von DNA-Fragmenten wird die PCR (*Polymerase chain reaction*) verwendet (Saiki et al., 1985; Seiki et al., 1986; Mullis und Faloona, 1987).
Das Prinzip beruht auf der Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase, die in einer zyklischen Reaktion, von Aufschmelzen der DNA, Annealen des Primers und Amplifikation, das gewünschte Fragment millionenfach vermehrt. Die PCR-Bedingungen müssen für jedes zu amplifizierende DNA-Fragment neu bestimmt werden. Die Schmelztemperatur liegt bei 94°C, die Dauer richtet sich nach der Länge der DNA, höhere Temperaturen denaturieren die Polymerase zu schnell. Das Annealing erfolgt bei einer den Primern entsprechenden Temperatur zwischen 45°C und 65°C. Die eigentliche Amplifikation erfolgt im Temperaturoptimum der Polymerase bei 72°C.
Ein beispielhafte PCR wird folgendermaßen gemischt und durchgeführt:

5 ng	Template-DNA
25 pmol	Primer 1
25 pmol	Primer 2
3 mM	$MgCl_2$
5 mM	dNTP-Mix
1/10 Volumen	10 x Reaktionspuffer
5 U	thermostabile DNA-Polymerase
ad 50 µl	H_2O

Der Ansatz wird mit 100 µl Mineralöl überschichtet.
Für die PCR wurde folgendes Temperaturprogramm benutzt:

Denaturieren:	94°C	20 sec
Annealen:	58°C	20 sec
Polymerisieren:	72°C	60 sec

Im Anschluß an 31 bis 38 solcher Zyklen wird weitere 10 Minuten bei 72°C inkubiert, um die vollständige Polymerisation der amplifizierten DNA zu gewährleisten.

Die PCR bietet sehr viele verschiedene Anwendungsmöglichkeiten, die weit über die einfache Vermehrung von DNA hinausgehen. So kann z.B. durch die Synthese entsprechender Primer eine neue Restriktionsschnittstelle oder eine Mutation eingeführt werden. Eine weitere Nutzung besteht in der so genannten RT-PCR, der eine Reverse Transkription (siehe 2.3.1.8) vorgeschaltet ist. Dadurch kann eine quantitative Aussage von Transkripten eines Gens beispielsweise in verschiedenen Geweben oder Entwicklungsstadien getroffen werden.
Alle diese Anwendungen erfordern spezielle Adaptionen der Zusammensetzung einer PCR-Reaktion sowie der Reaktionszeiten und -temperaturen. In jedem einzelnen Fall müssen diese Parameter ausgetestet und optimiert werden. Einige gute Richtlinien dazu finden sich in *Molecular Cloning – A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 1989).
Die gegebenenfalls erforderliche Weiterbehandlung eines PCR-Produkts z.B. für eine Ligation beinhaltet immer die Entfernung der Polymerase, welche die Tendenz hat an den DNA-Enden hängen zu bleiben. Dies kann durch Ionenaustauschsäulen mittels Qiagen PCR Purification Kit (siehe 2.3.1.3) geschehen.

2.3.1.8 RT-PCR

Aus gesamt-RNA von *Xenopus laevis* Embryonen (siehe 2.3.2.1) aus unterschiedlichen Stadien wird cDNA hergestellt und die quantitative Expression bestimmter Gene zu den verschiedenen Stadien mittels PCR untersucht.
Die Umschreibung von RNA zu cDNA erfolgt durch die Reverse Transkriptase (RT). Ein Enzym das verschiedene RNA-Viren für die Integration ihres genetischen Materials in das Wirtsgenom benutzen. Für die Reverse Transkription aus gesamt-RNA werden gleiche Mengen RNA eingesetzt und Oligo-dT-Primer verwendet damit nur mRNA als Template verwenden wird. Es wird der Revert Aid^{TM} First Strand cDNA-Synthesis-Kit und Protokoll der Firma Fermentas verwendet:

x µl	RNA (ca. 300 ng)
x µl	H_2O
1 µl	Oligo-dT-Primer
13 µl	Gesamtvolumen

Bei 65°C wird der Ansatz für 10 Minuten denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.
Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von:

4 µl	Reaktionspuffer (5 x)
0,5 µl	RNase Inhibitor (40 U/µl)
2 µl	Desoxynukleotid Mix
0,5 µl	Reverse Transkriptase (10 U)

Nach 30 Minuten Inkubation bei 55°C wird die Reaktion durch fünfminütiges Erhitzen auf 85°C abgestoppt. Danach wird die cDNA auf Eis gestellt oder bei -20°C gelagert.

Die RT-PCR kann semiquantitativ durchgeführt werden, um eine Vergleichbarkeit zwischen der Expression eines Gens in verschiedenen Embryonalstadien zu erzielen. Dazu wird zu jedem cDNA-Ansatz eine RT-PCR auf ein sogenanntes Haushaltsgen, zum

Beispiel der ODC (Ornithin-Decarboxylase), mitgeführt. Unterscheiden sich die Stärke der ODC-Banden nach der RT-PCR bei den zu vergleichenden Embryonalstadien nicht signifikant und ist in einer mitgeführten Negativkontrolle kein Signal zu beobachten, so lassen sich die getesteten Gene hinsichtlich ihrer Expressionsstärke vergleichen.

2.3.1.9 DNA-Sequenzierung

Zum Sequenzieren der DNA wird ein von Frederick Sanger entwickeltes Verfahren benutzt, das auf der enzymatischen Kettenabbruchmethode beruht (Sanger et al., 1977). Zunächst wird der zu sequenzierende DNA-Abschnitt an seinem 3´-Ende mit einer komplementären DNA-Matrize hybridisiert. Mir Hilfe der DNA-Polymerase, welche für ihre Syntheseaktivität einen kurzen Abschnitt doppelsträngige DNA benötigt, kann nun an diese als Primer dienende Sequenz ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert werden. Zusätzlich zu den vier benötigten Basen als Desoxyribonukleosidtriphosphate werden zu dem Reaktionsansatz auch entsprechende 2´,3´-Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) hinzugegeben. Wird dieses Nukleotid anstelle des normalen Nukleotids in die wachsende Polynukleotidkette eingebaut, so wird das Kettenwachstum beendet, da keine freie 3´-OH-Gruppe am Zucker für die Polymerisierung vorhanden ist. Über die unterschiedliche Länge der neu entstandenen DNA-Stränge lässt sich die Basenabfolge nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung ermitteln. Dabei kann ein Längenunterschied von einem Basenpaar aufgelöst werden. Die ddNTPs sind je nach Base unterschiedlich fluoreszenzmarkiert, so dass nach einer Gelelektrophorese jedes DNA-Fragment mit einem Laser-Fluorometer detektiert werden kann. Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen wird auf einem ABI PRISM-377 DNA Sequencer durchgeführt.
Der Reaktionsansatz wird in 0,5 ml Eppendorfgefäßen durchgeführt und enthält folgende Komponenten: 300 bis 400 ng DNA, 10 µmol Primer und 4 µmol Sequenzier-Premix. Die Reaktion findet in einem Gesamtvolumen von 10 µl statt.
Im Biometra T3-Thermocycler durchliefen die Ansätze das folgende Programm: 15 sec 94°C, 30 sec 50°C, 60 sec 60°C für 25 Zyklen.

Nach der Reaktion wird der Ansatz mit Ethanol gefällt, in Formamid-Auftragspuffer aufgenommen und auf das Sequenziergel aufgetragen. Computergestützte Sequenzanalysen können mit Hilfe des Programms MacMolly Tetra, Version 3.9, Soft Gene GmbH, durchgeführt werden.

2.3.1.10 5´-RACE und 3´-RACE

Die schnelle Amplifikation von cDNA-Enden (RACE: *Rapid Amplification of cDNA Ends*) ist eine Methode zur Vervielfachung einer teilweise unbekannten Nukleinsäuresequenz einer mRNA zwischen einer definierten internen Sequenz und einer unbekannten Sequenz am 5´- oder am 3´-Ende (Frohman et al., 1988). Normalerweise werden für eine PCR zwei sequenzspezifische Primer, welche die zu amplifizierende Sequenz flankieren, benötigt (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988). Mit dieser Methode ist es jedoch möglich den Tanskriptionsstartpunkt eines Gens festzustellen oder eine nur teilweise bekannte Nukleinsäuresequenz zu vervollständigen.
Der verwendete Gene Racer Kit der Firma Invitrogen ist eine effiziente Variante des RACE-Verfahrens, um die vollständige Sequenz einer mRNA zu erhalten (Maruyama und Sugano, 1994; Schaefer, 1995; Volloch et al., 1994). Zunächst wird das 5´-Ende der mRNA enzymatisch mittels der TAP (*Tobacco Acid Pyrophosphatase*) von der Cap-Struktur befreit. Dann lässt sich mit Hilfe der T4 RNA-Ligase an das nun phosphorilierte 5´-Ende ein RNA-Oligo ligieren. Nach Umschreiben der mRNA in cDNA (Oligo dT-Primer) befindet sich sowohl am 5´-Ende (RNA-Oligosequenz), als auch am 3´-Ende (Oligo dT-Primer Sequenz) des Moleküls bekannte Sequenzen, die als Hybridisierungsstellen für Primer dienen können. Auf der Basis der teilweise bekannten Sequenz einer mRNA lassen sich genspezifische Primer entwerfen, die für die selektive Amplifikation einer speziellen mRNA benutzt werden können. Für eine 5´-RACE bindet der unspezifische Primer an der RNA-Oligo Sequenz (Gene Racer 5´-Primer), für eine 3´-RACE bindet der unspezifische Primer an der Oligo dT-Primer Sequenz (Gene Racer 3´-Primer).

Die eingesetzte *Xenopus laevis* RNA wird, wie unter 2.3.2.1 beschrieben, aus Froschembryonen gewonnen. Für die Reverse Transkription wird die Superscript II RT (Invitrogen) eingesetzt. Die anschließende PCR erfolgt mit der Thermoprime Plus DNA-Polymerase (Abgene).
Um die Spezifität für das gesuchte Gen zu erhöhen, kann eine zweite sogenannte *Nested*-PCR mit einem stromaufwärts liegenden genspezifischen Primer und der Thermoprime Plus DNA-Polymerase (Abgene) durchgeführt werden.

Verwendetes PCR-Protokoll:

1. PCR:	denaturieren:	94°C, 2 min
	die ersten 5 Zyklen:	94°C, 30 sec – 72°C, 6 min
	weitere 5 Zyklen:	94°C, 30 sec – 70°C, 6 min
	weitere 25 Zyklen:	94°C, 30 sec – 65°C, 30 sec – 72°C, 6 min
	terminal:	72°C, 10 min

Für die 2. PCR wird 1 µl des 1. PCR-Ansatzes als Matrize eingesetzt.

2. PCR:	denaturieren:	94°C, 2 min
	25 Zyklen:	94°C, 30 sec – 65°C, 30 sec – 72°C, 6 min
	terminal:	72°C, 10 min

Das gewonnene PCR-Produkt wird anschließend umgehend auf 4°C gekühlt und kann über Schnittstellen in den verwendeten Primern subkloniert oder direkt sequenziert werden.

2.3.2 Arbeiten mit RNA

Da die Gefahr der Degradation der RNA durch RNasen beim Arbeiten mit RNA immer sehr hoch ist, müssen stets große Sorgfalt, Sterilität und einige Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden. Vor Beginn der Arbeit ist zu empfehlen die Arbeitsfläche mit Wasser und Ethanol zu säubern. Frische Einmalhandschuhe sollten stets getragen und ein Übergreifen offener Reaktionsgefäße sollte vermieden werden. Es wird mit autoklavierten Spitzen gearbeitet, und es werden sterilverpackte Plastikgefäße verwendet. Verwendete Lösungen und Puffer werden mit DEPC-H_2O angesetzt und autoklaviert.

2.3.2.1 Isolierung von gesamt-RNA aus *Xenopus laevis* Embryonen

Zur Aufreinigung von RNA aus ganzen Embryonen oder embryonalen Geweben werden diese zuvor in DMPC-H_2O behandelten Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um eine Degradation zu verhindern.
Die Isolierung von kleinen Mengen RNA aus *Xenopus laevis* Embryonen wird mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen durchgeführt. 5 bis 10 Embryonen des gewünschten Entwicklungsstadiums werden im Lysepuffer mit einem Plastikpistill homogenisiert und die freigesetzte RNA an die Matrix einer Ionenaustauschersäule gebunden. Dies geschieht unter niedrigen Salz- und pH-Bedingungen. Nach zweimaligem Waschen unter mittleren Salzbedingungen haben sich Verunreinigungen ausgewaschen und die RNA kann unter Hochsalzbedingungen von der Matrix eluiert werden. Um DNA-Kontaminationen zu vermeiden, erfolgt im Anschluss an die Isolierung der RNA ein DNase-Verdau durch Zugabe von 2 U DNase I für 20 Minuten bei 37°C. Die DNase wird abschließend durch einen Reinigungsschritt wieder entfernt (siehe 2.3.2.2).

2.3.2.2 Reinigung von RNA

Die Reinigung der RNA erfolgt über RNeasy-Ionenaustauschersäulen der Firma Quiagen. Zunächst muss das Volumen der zu behandelnden Probe mit DEPC-H_2O auf 100 µl aufgefüllt werden, danach werden 350 µl des im Kit enthaltenen Lysispuffer (RLT-Puffer) sowie 250 µl 100% Ethanol zugegeben. Der Ansatz wird durch das Säulenmaterial für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule zweimal mit dem mitgeliefertem Waschpuffer (RPE-Puffer) gewaschen, indem einmal 15 Sekunden bei 10.000 rpm und beim zweiten Mal 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert wird. Nachdem 30 µl DEPC-H_2O auf die Säule aufgetragen wurden wird für 10 Minuten bei RT inkubiert und dann für 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wird nochmals mit 30 µl DEPC-H_2O wiederholt. Durch Agarosegelelektrophorese wird die Integrität der RNA überprüft und zur Bestimmung der Konzentration wird die RNA im Spektralphotometer bei 260 nm vermessen (siehe 2.3.1.5). Anschließend wird die RNA aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.2.3 *In vitro* Transkription von RNA

2.3.2.3.1 Transkription von RNA für Mikroinjektionen

Für die *in vitro* Transkription wird die gewünschte DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Die Synthese der RNA erfolgt unter Verwendung des mMESSAGE mMACHINE^{TM} High Yield Capped RNA Transcription-Kit der Firma Ambion. RNA, die injiziert werden soll, muss eine große Stabilität gegenüber dem zellinternen Abbau besitzen. Deshalb werden diese RNAs aus dem Plasmid pCS2 (siehe Anhang) transkribiert, der hinter der multiplen Klonierungsstelle einen Poly-A-Schwanz mitliefert und der entstehenden RNA dadurch eine hohe Stabilität und Translationseffizienz verleiht.

Reaktionsansatz (Pipettierschema für 20 µl Endvolumen):

1 µg	linearisierte Template-DNA
10 µl	NTP/Cap (2 x)
2 µl	Reaktionspuffer (10 x)
2 µl	Enzym Mix
ad 20 µl	DEPC-H_2O

Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37°C wird dem Reaktionsansatz 1 µl DNase I zugegeben und für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird die Reaktion mit 2 µl EDTA (200 mM) gestoppt und die RNA über RNeasy-Ionenaustauschersäulchen aufgereinigt (siehe 2.3.2.2).

2.3.2.3.2 Transkription von RNA für Whole Mount *in situ* Hybridisierung

Für die Herstellung einer *in situ* Hybridisierungssonde wird eine linearisierte DNA-Probe verwendet und mit dem DIG-RNA-Labeling Kit der Firma Boehringer Mannheim transkribiert. Die einzelsträngige RNA wird durch die jeweils passende RNA-Polymerase (SP6, T3 oder T7 Polymerase) hergestellt. Dabei wird das Digoxigenin markierte Nukleotid UTP in den neu synthetisierten RNA-Strang eingebaut, das später über einen Antikörper gegen Digoxygenin erkannt und über eine daran gekoppelte Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Die Farbreaktion wird durch das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) katalysiert. Nach geeigneter Substratzugabe (z.B. NBT/BCIP) für die AP kommt es zu einer Blaufärbung an den entsprechenden Transkriptlokalisationen.

Reaktionsansatz (Pipettierschema für 21 µl Endvolumen):

1 µg	linearisierte Template-DNA
2 µl	DIG-RNA-Labeling Mix (10 x)
2 µl	Transkriptionspuffer (10 x)
1 µl	RNase Inhibitor (20 U/µl)
2 µl	RNA-Polymerase (SP6, T3 oder T7, 20 U/µl)
ad 21 µl	DEPC-H_2O

Nach einer Transkriptionszeit von 2 Stunden bei 37°C wird die Ausgangs-DNA durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNaseI (10 U/µl) bei 37°C über eine Zeitspanne von 15 Minuten hydrolysiert. Zum Stoppen der Reaktion werden 2 µl EDTA (200 mM) zum Reaktionsansatz gegeben. Qualität und Quantität der RNA-Sonde werden nach der Aufreinigung über RNeasy-Säulchen der Firma Qiagen (siehe 2.3.2.2) auf einem Ethidiumbromid-Agarosegel (siehe 2.3.1.4.3) überprüft.

2.3.3 Arbeiten mit Proteinen

2.3.3.1 *In vitro* Tranlation von RNA

Die *in vitro* Translation wird mittels des T7 TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems Kit der Firma Promega durchgeführt.
Mit dem TNT-gekoppelten Retikulozytenlysat System ist es möglich zu kontrollieren, ob von erstellten Expressionskonstrukten Proteine der erwarteten Größe exprimiert werden. Ausgehend von einer cDNA im entsprechenden Expressionsvektor kann das gewünschte Protein in einem einzigen Ansatz durch Kopplung von Transkription mit Translation *in vitro* synthetisiert werden.
Die radioaktive Markierung des Proteins human *C-terminal binding protein 1* (CtBP1) erfolgt über [^{35}S]-Methionin.
Folgende Komponenten werden in einem Ansatz möglichst luftblasenfrei pipettiert:

25 µl	TNT Kaninchen-Retikulozytenlysat
2 µl	TNT Reaktionspuffer
1 µl	1 mM Aminosäuremischung ohne Methionin
8 µl	^{35}S-Methionin (10 µCi/µl; 1.000 Ci/mmol)
1 µl	RNasin (40 U/µl)
2 µg	zirkuläre Plasmid-DNA
1 µl	RNA-Polymerase (T7, 10 U/µl)
ad 50 µl	RNase-freies DEPC-H_2O

Durch Pipettieren wird der Ansatz durchmischt und 120 Minuten bei 30°C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss wird 1 µl des Ansatzes in 17 µl Protein-Probenpuffer aufgenommen und drei Minuten bei 95°C denaturiert. Die Proben werden abzentrifugiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.3.3.2).

2.3.3.2 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgt im diskontinuierlichen Verfahren (Laemmli, 1970). Dabei wird das anionische Detergens SDS verwendet, um Proteine zu denaturieren und gleichzeitig ihre Eigenladung zu maskieren. Dadurch ist eine Auftrennung der Proteine allein nach ihrem Molekulargewicht gewährleistet.
Die Proteinprobe wird im Verhältnis 5:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt, fünf Minuten bei 98°C erhitzt und anschließend auf Eis inkubiert. Die zu verwendende Acrylamidkonzentration der Gele richtet sich nach dem zu erwartenden Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine. Zur Fokussierung der Proben wurde dem Trenngel ein Sammelgel vorgeschaltet.

Ansatz für Proteingele:

Tab. 6: Schema zur Herstellung eines Trenngels (10 ml).

	8%	10%	15%
H_20	4,6 ml	4,0 ml	2,3 ml
4 x Resolving Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
30% Acrylamid- Bisacrylamid (29:1)	2,7 ml	3,3 ml	5,0 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	62,5 µl	62,5 µl	62,5 µl
TEMED	6,25 µl	6,25 µl	6,25 µl

Tab. 7: Schema zur Herstellung eines 5%igen Sammelgels.

	für 2,5 ml	für 5,0 ml
H_20	1,74 ml	3,4 ml
1 M Tris, pH 6,8	0,315 ml	0,63 ml
30% Acrylamid- Bisacrylamid (29:1)	0,415 ml	0,83 ml
10% SDS	0,025 ml	0,05 ml
10% APS	10 µl	20 µl
TEMED	4 µl	8 µl

Die Elektrophorese beginnt mit dem Einlauf in das Sammelgel bei 60 V, die Auftrennung im Trenngel erfolgt bei 100 bis 120 V in Minigelapparaturen der Firma BioRad.

2.3.3.3 Aufreinigen von GST-Fusionsproteinen mit Glutathion Sepharose

Zur Untersuchung von *in vitro* Protein-Protein Interaktionen werden die cDNAs von *FoxP1* und *FoxP1b* als GST-Fusionsprotein im Bakterium *Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimiert und aufgereinigt.

Dazu werden 15 ml Bakteriensuspension einer über Nacht Kultur in 200 ml ampicillinhaltigem LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 1,0 kultiviert. Anschließend werden die Bakterien bei 5.500 rpm und 4°C im GSA-Rotator abzentrifugiert. 500 ml der Glutathion-Sepharose werden abzentrifugiert und mit 1 ml Lysispuffer gewaschen. Das Bakterienpellet wird mit 10 ml Lysispuffer resuspendiert und 4 x 15 Sekunden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Die Zellreste werden durch 30 minütige Zentrifugation bei 11.000 rpm präzipitiert, der Überstand abgenommen, in 1% Triton X-100 (1 ml) gelöst und 500 µl Glutathion-Sepharose zugegeben. Das Gemisch wird bei 4°C auf dem Schüttler mindestens drei Stunden inkubiert und danach in 4 x 10 ml Waschpuffer gewaschen, in 10 ml Lysispuffer inkubiert und mit 2 bis 4 x 500 µl Elutionspuffer eluiert. Danach wird das Eluat nochmals für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Dialyse erfolgt bei 4°C über Nacht.

2.3.3.4 Pulldown Assay

Vor dem Interaktionstest wurde das Protein CtBP1 mit Hilfe des T7 TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems der Firma Promega als ^{35}S-markiertes Protein hergestellt. Vor der eigentlichen Interaktion erfolgt ein sogenanntes Preclearing. Danach werden die an die Sepharose gebundenen Proteine vier mal mit PBT gewaschen. Die Interaktionsanalyse der Proteine (Pulldown Assay) erfolgt nach Friedle und Knöchel (2002). Der Überstand des Inkubationsmixes wird auf eine SDS-PAGE aufgetragen, das Gel wird fixiert, getrocknet und eine Imaging Plate aufgelegt. Diese wird anschließend im Phospho-Imager ausgewertet.

2.4 Arbeiten mit Organismen

2.4.1 Arbeiten mit Bakterien

2.4.1.1 Herstellung chemokompetenter Zellen nach der RbCl-Methode

Zur Transformation (siehe 2.4.1.2) von Bakterien durch Plasmid-DNA ist es erforderlich den Zellen die Kompetenz für die Aufnahme der DNA zu vermitteln.
Zur Steigerung der Transformationseffizienz empfiehlt sich die Behandlung der Bakterien mit Rubidiumchlorid (RbCl). Dazu wird von einer durch Tetracyclin selektionierten Bakterienkolonie des XL1-blue-Stamms eine gesättigte Vorkultur hergestellt. 1 ml der Vorkultur wird auf 100 ml Kulturmedium überimpft und diese bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,3 bis 0,5 kultiviert. Die Bakterienkultur wird auf Eis abgekühlt, in zwei 50 ml Falcons überführt und bei 4°C für 5 Minuten bei 3.000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wird in 20 ml Tbf-1-Lösung resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 2.500 rpm wird der Überstand verworfen und die pelletieren Zellen in 2 ml Tbf-2-Lösung aufgenommen. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis können

die Zellen direkt für die Transformation verwendet oder aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

2.4.1.2 Transformation von Bakterien

Die RbCl-kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit 5 bis 10 µl Ligationsansatz beziehungsweise 100 ng zirkulärer Plasmid-DNA vermischt. Nach einer 30 bis 60 minütigen Inkubationszeit findet der Hitzschock bei 42°C für 90 Sekunden statt. Danach werden die Bakterien sofort auf Eis gestellt und dort für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird der Ansatz auf einer ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen.

2.4.1.3 Blau-Weiß Selektion von Bakterien

Dieses Verfahren erleichtert die Selektion der Kolonien mit rekombinanten Plasmiden (Sambrook et al., 1989). Es beruht auf der α-Komplementation der β-Galaktosidase. Wird die Plasmidsequenz, die für das α-Peptid kodiert, wie es beispielsweise beim ρ-Drive Vektor der Fall ist, durch den Einbau von fremder DNA unterbrochen, so bleiben die Bakterienkolonien weiß. Bakterienkolonien, die kein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben und somit das α-Peptid synthetisieren, sind an ihrer blauen Färbung zu erkennen. Bakterien, die kein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben, sind durch die Selektion eines Antibiotikums nicht in der Lage zu wachsen.
Die Selektiv-Platten, auf denen eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt wird, werden vor dem Ausplattieren der Bakterien mit 80 µl X-Gal (50mg/ml) bestrichen. Nach 30 Minuten Inkubation der Substanz auf dem Agar, können die Bakterien, denen 4 µl IPTG (100 mM) zugegeben wird, ausgestrichen werden. Die Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht.

2.4.1.4 Vorbereitung von Bakterien für die Phageninfektion

Da die verwendeten Phagen über den Maltoserezeptor in die Bakterien eindringen und lysieren, benötigt man für das Screenen von Phagen-Banken Bakterien, die eine hohe

Maltoserezeptordichte aufweisen. Dazu werden *Escherichia coli* Bakterien des Stammes LE 392 in NZ-Medium, dem 10 mM $MgSO_4$ sowie 0,2% Maltose zugesetzt wird, bis zu einer gesättigten Bakteriensuspension kultiviert. Nach der Zentrifugation der Zellen wird das Sediment in 1/3 Volumen 10 mM $MgSO_4$ aufgenommen und bei 4°C bis zu zwei Wochen gelagert.

3.4.2 Arbeiten mit Phagen

Für die Isolierung von cDNA Klonen wurde eine *Xenopus laevis* λ–ZAP-cDNA-Tadpole Bibliothek (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet.
Bei dieser Phagen-Bank handelt es sich um eine Oligo dT und *random geprimte* cDNA Bank der *Xenopus laevis* Embryonen im Entwicklungsstadium 30. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt 1,5 Kilobasen, die über Eco RI/Xho I Erkennungsstellen in einem pBluescript-Vektor und anschließend in die λ–Phagen-DNA kloniert sind. Der vollständige Vektor, einschließlich des Inserts, kann mit einem Helferphagen herausgeschnitten, religiert und in entsprechenden Bakterienzellen vermehrt werden.

2.4.2.1 Ausplattieren und Titerbestimmung einer Phagen-Bank

Beim Screenen einer Phagen-Bank ist es wichtig eine möglichst große Anzahl von unterschiedlichen Phagenklonen zu erfassen. Auf einer NZ-Agarplatte mit einem Durchmesser von 20 cm sollten sich circa 50.000 Phagenklone befinden. Um die Anzahl der Klone auf einer Platte zu optimieren, wird zunächst der Titer der Phagen-Bank bestimmt. Dazu wird eine Verdünnungsreihe der Phagen erstellt (10^{-1}-10^{-6}) und jeweils 1 µl der Phagenverdünnung mit 200 µl der vorbereiteten Bakterien (siehe 2.4.1.4) vermischt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert, um den Phagen die Möglichkeit zu geben sich an die Maltoserezeptoren der Bakterien anzuheften. Anschließend werden 5 ml auf 45°C abgekühlter Topagar zugegeben und der Ansatz möglichst luftblasenfrei auf die NZ-Agarplatten gegossen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C kann die Anzahl der

Phagenplaques auf der Agarplatte bestimmt werden und so die Anzahl der Phagen pro Milliliter Phagen-Bank in pfu (*plaque forming units*)/ml errechnet werden.

2.4.2.2 Screenen einer Phagen-Bank

Insgesamt werden etwa 50.000 Phagen der cDNA Bank auf NZ-Agarplatten mit einem Durchmesser von 20 cm ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C werden diese für mindestens eine Stunde auf 4°C gekühlt, wodurch ein späteres Ablösen der NZ-Topagarschicht von der Agarplatte verhindert werden soll.

2.4.2.3 Transfer der Phagen-DNA auf Nitrocellulose-Filter

Die achteckig zugeschnittenen Nitrocellulose-Filter werden trocken auf die gekühlten Platten aufgelegt und die Orientierung durch Einstechen mit einer Tinte gefüllten Kanüle in den Agar markiert. Zur Vermeidung von Falschpositiven Signalen nach der Hybridisierung wird auf jede Phagenplatte ein Duplikatfilter aufgelegt. Nach einer Minute wird der erste Filter, nach 4 Minuten der Duplikatfilter, mit einer Pinzette vorsichtig von der Phagenplatte genommen. Die nun an dem Nitrocellulose-Filter haftenden Phagen werden durch Eintauchen in eine Lösung aus 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH für zwei Minuten denaturiert. Anschließend werden die Filter für 4 Minuten in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 8,0 neutralisiert und kurz in 2 x SSC-Puffer äquilibriert. Nach kurzem Trocknen wird die Phagen-DNA durch zweistündiges Backen bei 80°C mit der Nitrocellulose-Membran vernetzt.

2.4.2.4 Nitrocellulose-Filter Hybridisierung

Die Hybridisierungsstärke ist abhängig von der Hybridisierungstemperatur, der Ionenstärke des Hybridiesierungspuffers und der Waschstringenz.
Die Nitrocellulose-Filter werden nach dem Backen einzeln in die Hybridisierungslösung gelegt und vollständig benetzt. Jeweils 10 Filter werden zusammen mit ausreichend

Hybridisierungspuffer luftblasenfrei in eine Plastiktüte eingeschweißt und mindestens zwei Stunden bei 58°C vorhybridisiert. Anschließend wird der Puffer durch frische Hybridisierungslösung ersetzt; dem nun die radioaktive Sonde (siehe 2.3.1.6.3) zugegeben wird. Die Kammer wird wieder sorgfältig verschweißt und über Nacht bei ca. 58°C inkubiert. Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach der verwendeten Sonde und liegt je nach erwarteter Homologie zwischen 55°C und 65°C. Im Anschluß an die Hybridisierung werden die Filter unter Beibehaltung der Hybridisierungstemperatur solange mit einer absteigenden SSC/SDS-Reihe gewaschen, bis die Radioaktivität gerade die Hintergrundaktivität erreicht.
Dies geschieht mit folgenden Puffern unter verschiedenen Temperaturbedingungen (zwischen 50°C und 60°C):

2 x SSC, 0,5% SDS

1 x SSC, 0,5 % SDS

1 x SSC, 0,1 % SDS

Die gewaschenen Filter werden leicht getrocknet und in Klarsichtfolie verpackt in eine Filmkassette gelegt, in der dann eine Exposition der Imagingplate über Nacht erfolgt. Die Auswertung des Screenings erfolgt mit dem Bio Imaging System Fuji Bas 1000.

2.4.2.5 *In vivo* Exzision

Durch Koinfektion von Bakterien mit λ-ZAP- und filamentösen Helferphagen sind die Helferphagen in der Lage den pBluescript-Anteil einschließlich des *Xenopus laevis* cDNA Inserts aus dem λ-Phagen herauszuschneiden und zu rezirkularisieren. Dies ermöglicht, dass die weitere Isolierung des gescreenten Inserts wie eine Plasmidpräparation behandelt werden kann.
Hierzu kann nun dem Signal auf dem Nitrocellulose-Filter die exakte Position auf der Agarplatte zugeordnet werden. Nach dem Ausstechen des signalgebenden Areals auf der Agarplatte werden die noch zahlreichen Phagen in 1 ml SM-Puffer in Lösung genommen und verschiedene Verdünnungen erneut ausplattiert und hybridisiert (siehe 2.4.2.1 bis 2.4.2.4). Dieses Verfahren wird solange wiederholt, bis ein positives Signal auf dem

Nitrocellulose-Filter genau einer Phagenplaque zugeordnet werden kann. Zur Isolierung der Phagen-DNA werden 200 µl der Phagen-Lösung mit 200 µl Plating-Bakterien gemischt und mit 1 x 10^6 pfu des Helferphagen RU408 versetzt. Zur Infektion wird die Mischung 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Bakterien mit 3 ml LB-Medium versetzt und für 3 Stunden inkubiert. In diesem Zeitraum erfolgt das Ausschneiden des pBluescript-Anteils aus dem λ-Phagen und dessen Verpackung und Ausschleusung in Form von filamentösen Phagenpartikeln. Durch Erhitzen auf 70°C für zehn Minuten werden die Bakterien und Phagen inaktiviert, so dass anschließend durch Zentrifugation die Bakterienzellen pelletiert werden. Die Phagenpartikel bleiben im Überstand erhalten und können abdekantiert werden. Mit 100 µl des Überstandes werden erneut 200 µl Plating-Bakterien infiziert (15 Minuten, 37°C), auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf dem ampicillinhaltigen Medium können nur die Bakterien wachsen, welche die Resistenz gegen Ampicillin mit dem pBluescript aufgenommen haben, und zugleich die gewünschten cDNA-Inserts von *Xenopus laevis* tragen. Von den gewachsenen Kolonien wird eine Kultur über Nacht angesetzt und eine DNA-Präparation mit dem Qiagen Plasmid Midi/Mini Kit durchgeführt (siehe 2.3.1.2)

2.4.2.6 Nitrocellulose-Filter strippen

Nitrocellulose-Filter können bei vorsichtiger Behandlung mehrmals verwendet werden, so dass mit demselben Filtersatz nach verschiedenen cDNAs gesucht werden kann. Dazu müssen allerdings alle bisherigen Signal gelöscht werden, ohne die an den Filtern haftende Phagen-DNA zu beeinträchtigen. Dies wird erreicht indem eine Lösung aus 0,1 x SSC und 0,1% SDS zum Kochen gebracht und gerade nicht mehr siedend über die Filter gegossen wird. Die Filter werden in der Lösung frei schwimmend 20 Minuten auf einem Schüttler abgekühlt und können nach anschließendem Trocknen in Folie eingeschlagen bei 4°C mehrere Wochen gelagert und wiederverwendet werden. Diese Behandlung lässt sich mit den Nitricellulose-Filtern zwei- bis dreimal wiederholen.

2.4.3 Arbeiten mit *Xenopus laevis*

Der adulte *Xenopus laevis* wird in 20°C temperierten und mit gefiltertem Wasser versorgten Glasbecken gehalten. Bei der Haltung ist es wichtig auf hygienische Bedingungen zu achten, um eine Pilzinfektion oder eine Kontamination mit anderen froschpathogenen Keimen zu vermeiden. Zwischen zwei hCG-induzierten Ablaichprozessen sollte für die weiblichen Tiere eine dreimonatige Regenerationspause eingehalten werden.

2.4.3.1 Gewinnung von Froschembryonen

Um eine synchronisierte Entwicklung aller Froschembryonen eines Geleges zu gewährleisten, werden die Eier künstlich befruchtet.
Zur Stimulation der Oogenese wird den weiblichen Tieren vier Wochen vor Eiablage 50 i.E. humanes Choriongonadotropin (hCG) in den dorsalen Lymphsack injiziert. 12 bis 16 Stunden vor der geplanten Eiablage werden zur Oozytenreifung *in vivo* nochmals 200 bis 250 µl (500 i.E.) hCG injiziert. Legebereite Weibchen sind an der Öffnung der Kloake zu erkennen. Durch sanftes Massieren der Rückenregion über den Eileitern werden diese Tiere zur Eiablage angeregt. Die Eier werden in einer Petrischale aufgefangen und befruchtet (siehe 2.4.3.2).

2.4.3.2 *In vitro* Fertilisation

Zur Gewinnung der Spermien wird ein männliches Tier dekapitiert und die Testis freipräpariert. Von den entnommenen Testis wird ein Stück in 1 x MBSH mazeriert. Die Spermien befinden sich nun in einer sogenannten Salzstarre, in welcher der Energieverlust durch die relative Unbeweglichkeit möglichst gering gehalten wird. Zur *in vitro* Fertilisation müssen die Spermien aktiviert werden. Dies geschieht durch Verdünnung auf 0,1 x MBSH und sofortiges Vermischen mit den abgelaichten Eiern. Der restliche Hoden

wird in OCM-Medium bei 4°C gelagert und kann bis zu etwa einer Woche verwendet werden.
Nach circa 30 Minuten zeigt sich eine erfolgreiche Befruchtung durch das Drehen der Eier, die dann mit der pigmentierten Seite nach oben zu liegen kommen. Nun wird die Petrischale mit 0,1 x MBSH aufgefüllt und die befruchteten Eizellen bei 15°C gelagert. Ab Entwicklungsstadium 46 (nach Nieuwkoop und Faber, 1967) werden die *Xenopus laevis* Embryonen mit Algenpulver gefüttert.

2.4.3.3 Entfernen der Gallerthülle

Zur Mikroinjektion in *Xenopus laevis* Embryonen muss die Gallerthülle entfernt werden, die die Eier umgibt. Damit die Entwicklung der Eier nicht gestört wird, darf dieser Vorgang frühestens eine Stunde nach der Fertilisation erfolgen. Zur Entfernung der Gallerthülle werden die Eier solange in Cysteinchloridlösung geschwenkt, bis sie dicht aneinander zu liegen kommen. Die Cysteinchloridlösung wird abdekantiert und die Eier werden gründlich in 0,1 x MBSH gewaschen. Nun werden die Eier weiter bei 15°C inkubiert, bis sie das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht haben.

2.4.3.4 Mikroinjektion in Froschembryonen

Zur Injektion von DNA oder RNA in die Froschembryonen werden Glaskapillaren mechanisch ausgezogen und deren Spitzen vorsichtig abgerochen. Die so hergestellten Injektionsnadeln besitzen einen sehr feinen Durchmesser und sind zur Injektion in Froschembryonen geeignet.
Die Kontrolle der Mikroinjektion durch das Pneumatic Picopump-Injektionsgerät ermöglicht das reproduzierbare Injizieren einer Flüssigkeitsmenge definierten Volumens. Die zu injizierende Flüssigkeit wird mittels eines Vakuums in die Glaskapillaren aufgezogen und durch Druckaufbau mit Stickstoffgas beim Injektionsvorgang abgegeben. Das Aufsaugen der Flüssigkeit und die Mikroinjektion werden unter dem Binokular kontrolliert. Vorteilhaft ist die Größe der *Xenopus laevis* Embryonen, die es erlaubt

einzelne Blastomeren gezielt mit einem Maximalvolumen von 10 nl zu injizieren. Die Steuerung der Glasnadel erfolg mittels eines Mikromanipulators. Nachdem mit einer kurzen, ruckartigen Vorwärtsbewegung die Nadel die Membran der Blastomere durchstoßen hat, erfolgt die Mikroinjektion der gewünschten Stoffmenge durch Betätigung des Fußpedals.
Für die Injektion werden die Embryonen in Ficoll 400-Injektionspuffer gehalten, um einen schnelleren Wundverschluss zu erreichen. Die Froschembryonen werden zur Mikroinjektion in einem Gitternetzschälchen leicht fixiert.
Zwei Stunden nach der Injektion werden die Embryonen in 0,1 x MBSH überführt, um spätere Gastrulationsprobleme, die in 1 x MBSH aufgrund der höheren Salzkonzentration entstehen, zu verhindern. Bei 14°C bis 18°C werden die Froschembryonen kultiviert. Die Embryonale Entwicklung der Tiere wird nach Nieuwkoop und Faber (1967) in Stadien eingeteilt.

2.4.3.5 Betäuben von Embryonen

Zur intensiven Untersuchung und zu Dokumentationszwecken ist es oft erforderlich die *Xenopus laevis* Embryonen höherer Stadien (ab circa Stadium 26 nach Nieuwkoop und Faber, 1967) ruhig zu stellen, ohne ihre Entwicklung zu beeinträchtigen. Dies geschieht mit dem Fischbetäubungsmittel MS 222. Es wird eine 20 x Stammlösung mit 4 mg/ml in 0,1 x MBSH (pH 7-8) angesetzt. Die Embryonen verlieren in einer 1:20-Verdünnung dieser Lösung nach kurzer Zeit ihre Bewegungsfähigkeit, die sie jedoch nach Zurücksetzen in 0,1 x MBSH schnell wiedererlangen. Ohne Schaden zu erleiden können die Embryonen, in Abhängigkeit ihres Entwicklungsstadiums, bis zu 5 Stunden in der Betäubungsmittellösung verweilen. Gelöst ist MS 222 nur wenige Tage haltbar, aliquotiert und bei -20°C gelagert, ist es jedoch für einen längeren Zeitraum verwendbar.

2.4.4 Immunhistochemische und histologische Methoden

2.4.4.1 Fixieren von *Xenopus laevis* Embryonen

Nachdem die Embryonen das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht haben, werden sie für etwa 5 Minuten in Proteinase-K Lösung II gegeben. Dadurch wird die Vitellinmembran, die sie umgibt, für die Whole Mount *in situ* Hybridisierung permeabilisiert. Danach werden die Embryonen für mindestens 4 Stunden bei RT in MEMPFA auf dem Roller fixiert. Alternativ können die Froschembryonen auch über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend schrittweise in Ethanol überführt und bei -20°C gelagert werden.

2.4.4.2 Whole Mount *in situ* Hybridisierung (WMISH)

Die Whole Mount *in situ* Hybridisierung wurde nach dem Protokoll von Harland (1991) durchgeführt und an einigen Stellen leicht modifiziert. Diese Methode ermöglicht es, sowohl die zeitliche als auch die räumliche Expression von genspezifischen Transkripten im gesamten *Xenopus laevis* Embryo sichtbar zu machen. Die Digoxygenin markierten, zum Transkript revers komplementären, RNA-Sonden (siehe 2.3.2.3.2) hybridisieren mit den Transkripten des zu untersuchenden Gens. Diese RNA-Hybride werden von einem an die Alkalische Phosphatase gekoppelten anti-Digoxygenin-Antikörper erkannt und durch Zugabe eines geeigneten Substrat für dieses Enzym (z.B. NBT/BCIP, BM Purple, INT/BCIP oder Fast Red) kommt es zu einer türkisblauen, violetten oder orangeroten Färbung an den entsprechenden Lokalisationen des Transkripts. Bei einer Doppel *in situ* Hybridisierung kann die räumliche Expression von zwei unterschiedlichen Genen gleichzeitig sichtbar gemacht werden. Als Probengefäße für die Whole Mount *in situ* Hybridisierung werden 4 ml Glasröhrchen mit Schraubdeckel verwendet. Diese werden zuvor mit DMPC (0,1% in H_2O) behandelt, dazu werden die Röhrchen mit der DMPC-Lösung gefüllt, kräftig geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Danach werden die

Glasröhrchen autoklaviert. Das Protokoll umfasst vier Tage, wobei an den ersten beiden Tagen streng RNase-frei gearbeitet werden muss.

Erster Tag: Das 100%ige Ethanol, in dem die Embryonen gelagert sind, wird kurz gewechselt und dann werden sie nacheinander mit jeweils 5 ml 75% Ethanol und 25% DEPC-H_2O, 50% Ethanol und 50% DEPC-H_2O, 25% Ethanol und 75% PTW sowie mit 100% PTW für jeweils 5 Minuten bei RT rehydriert. Das Waschen in 100% PTW wird noch dreimal wiederholt, wobei zwischen den Waschschritten jeweils 5 Minuten bei RT inkubiert wird. Während allen Inkubationen werden die Glasröhrchen auf ein Rollband gelegt, das die Gläschen horizontal rotieren lässt. Danach erfolgt eine Behandlung mit 1 ml Proteinase-K Lösung I für 15 Minuten, wodurch die Vitellinmembran der Embryonen permeabilisiert wird, um unspezifische Färbungen verursacht durch Wechselwirkungen der DIG-RNA mit Resten der Gallerthülle oder der Vitellinmembran, zu verringern. Während des Proteinase-K-Verdaus sollten die Embryonen ruhig stehen gelassen werden. Anschließend werden die Embryonen einmal mit PTW und zweimal mit Triethanolamin (0,1 M, pH 7,8) für je 5 Minuten bei horizontaler Rotation gewaschen. Dem Triethanolamin wird schrittweise Essigsäureanhydrid zugefügt, und es folgen zwei weitere Waschschritte mit PTW. Durch eine zwanzigminütige Behandlung mit MEMPFA werden die Embryonen fixiert und daran anschließend fünfmal für 5 Minuten mit PTW gewaschen. Um die Embryonen für die Vorhybridisierung vorzubereiten, werden diese kurz mit 1 ml PTW und 200 µl Hybridisierpuffer versetzt, dann für 10 Minuten in 500 µl Hybridiesierpuffer bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend werden die Embryonen für 6 Stunden oder über Nacht in 500 µl frischer Hybridisierlösung im 60°C temperiertem Schüttelwasserbad vorhybridisiert.

Zweiter Tag: Für die Hybridisierung werden 56 µl der DIG-markierten antisense-RNA-Sonde (siehe 2.3.2.3.2) mit 56 µl deionisiertem Formamid vermischt, für 30 Sekunden auf 95°C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 380 µl Hybridisierpuffer werden die RNA-Sonden zu den Embryonen gegeben und über Nacht bei 60°C im Wasserbad hybridisiert.

Dritter Tag: Die eingesetzte DIG-markierte antisense-RNA wird abgenommen und bei –20°C gelagert, da sie mehrmals verwendet werden kann. Ab diesem Schritt ist es nicht mehr notwendig RNase-frei zu arbeiten. Alle Lösungen können nun mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden. Um überschüssige oder unspezifisch hybridisierte RNA zu entfernen, werden die Embryonen wie folgt gewaschen: zuerst mit 500 µl Hybridisierpuffer für 10 Minuten bei 60°C, dem wird 1 ml 2 x SSC zugegeben und weitere 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Nach entfernen dieser Lösungen wird dreimal mit 2 x SSC für 15 Minuten bei 60°C gewaschen. Zur Eliminierung von einzelsträngigen RNA-Formen und DNA-RNA-Hybriden werden die Embryonen mit 2 µl RnaseA und 1µl RNaseT1 in 1 ml 2 x SSC zweimal bei 37°C für 20 Minuten behandelt. Nach zwei Waschschritten mit 2 x SSC bei RT für jeweils 5 Minuten sowie dreimaliges Waschen mit 0,2 x SSC bei 60°C für je 15 Minuten werden die Embryonen für die Anitikörperreaktion vorbereitet. Dazu werden sie zuerst zweimal für 10 Minuten bei RT in MAB, dann für 1 Stunde in MAB und 2%igem Boehringer Mannheim Blocking Reagenz (BMB) und danach für 1 Stunde in 500 µl MAB, 2% BMB und 20% Lammserum geschwenkt. Die Inkubation mit dem anti-Digoxygenin Antikörper dauert etwa 3 Stunden bei RT. Nicht gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen für 10 Minuten in 20 ml MAB und anschließendes Waschen in 40 ml MAB-Puffer über Nacht bei 4°C entfernt.

Vierter Tag: Zur gründlichen Entfernung nicht gebundener Antikörper werden die Embryonen noch 4 bis 6 mal für je 10 Minuten in 15 ml MAB bei RT geschwenkt. Danach werden sie zur Vorbereitung der Färbung einmal für 10 Minuten in 10 ml Alkalische Phosphatase-Puffer geschwenkt, dann in kleine Petrischalen überführt und noch zweimal für 10 Minuten in Alkalische Phosphatase -Puffer inkubiert. Die Färbung wird durch Zugabe von 1 ml BM-purple AP Substrat eingeleitet. Die Petrischälchen werden schräg gestellt, so dass alle Embryonen bedeckt sind, und im Dunklen gelagert. Die Dauer der Färbung richtet sich nach der Präsenz der RNA des zu analysierenden Gens und der Qualität der DIG-markierten Sonde. Wenn die Färbung die gewünschte Intensität erreicht hat, werden die Embryonen für 1 Stunde bei RT in MEMPFA fixiert und anschließend in Methanol überführt und bei 4°C gelagert.

2.4.4.3 Depigmentierung von *Xenopus laevis* Embryonen

Da bei *Xenopus laevis* Embryonen unterschiedlich stark ausgeprägte Pigmentierungen der Haut vorkommen können, kann eine Färbungen durch Whole Mount *in situ* Hybridisierung eventuell nicht gut zu erkennen sein. Aus diesem Grund werden die Embryonen mit 10% Wasserstoffperoxid in Ethanol depigmentiert. Die Dauer der Behandlung beträgt abhängig von der Stärke der Pigmentierung zwischen einer Stunde und zwei Tagen, wobei die 10%ige H_2O_2-Lösung mehrmals gewechselt werden sollte. Danach werden die Embryonen gründlich mit Ethanol gewaschen und zur Auswertung beziehungsweise Lagerung in 100% Ethanol überführt und bei 4°C verwahrt.

2.4.4.4 Gewebeschnitte anfertigen

Um die Expressionsdomänen der *Xenopus laevis* Embryonen nach einer Whole mount *in situ* Hybridisierung histologisch zu untersuchen, werden Vibratomschnitte mit einer Schichtdicke von 30 bis 50 µm angefertigt. Dazu wird der Embryo für mehrere Stunden in Gelatinelösung gelegt.

Gelatinelösung: 2,2 g Gelatine in 450 ml H_2O unter vorsichtigem Rühren bis zur vollständigen Lösung erwärmen, 135 g BSA hinzugeben, 90 g Saccharose zugeben, nach kompletter Lösung aliquotieren, Lagerung bei -20°C.

In einer Gussform wird eine zuvor auf Eis durchmischte Gelatine-/Glutaraldehydlösung (1 ml Gelatinelösung + 140 µl Glutaraldehyd) gegossen, die sich schnell verfestigt. Danach wird der Embryo auf dem Gusssockel ausgerichtet und die Gelatine-/Glutaraldehydlösung über diesen geschichtet. Nachdem sich die Gelatine verfestigt hat, kann die Gussform entfernt und der Gelatineblock mittels Sekundenkleber auf einen Metallträger befestigt werden. Dieser Metallträger wird im Vibratom eingespannt und in einer Schichtdicke von 30 bis 50 µm geschnitten. Abschließend werden die Vibratomschnitte mit Glycerin eingedeckelt und fotodokumentiert.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung vollständiger cDNA Klone der *Xenopus laevis* FoxP-Subfamilie

In Nukleotidsequenzvergleichen von hinterlegten *Xenopus tropicalis* EST-Klonen (expressed sequence tag) mit den humanen *FOXP* mRNAs konnte eine besonders hohe Homologie der *FoxP2* Nukleotidsequenzen gezeigt werden. Mit Hilfe von identischen Sequenzbereichen vor dem putativen Startkodon und hinter dem putativen Stopkodon konnte der offene Leserahmens (*open reading frame*, ORF) von *Xenopus laevis FoxP2* aus einer λZAP-cDNA-Tadpole Bibliothek erfolgreich amplifiziert werden. Das ca. 2,2 Kilobasen (kb) umfassende Fragment wurde zunächst im pDrive-Vektor (siehe Anhang) subkloniert und sequenziert. Ausgehend davon wurde für das Screening der Phagenbank ein 1,2 kb großes *FoxP2*-Pst-I-Fragment als Hybridisierungssonde ausgewählt, das in der korrespondierenden Nuklotidsequenz einen Zinkfinger und die charakteristische Forkhead-Domäne umfasst.

Das Hybridisieren dieser Sonde mit ca. 500.000 auf NZ-Agarplatten befindlichen Phagenklonen einer λZAP-cDNA-Tadpole Bibliothek bei einer niedrigen Stringenz von 58°C und 0,2 x SSPE führte zur Isolierung von insgesamt 22 Phagenklonen (willkürlich von 1.1 - 16.4 durchnummeriert). Es zeigte sich nach Ansequenzierung, dass von diesen 22 Phagneklonen sieben als Mitglieder der FoxP Subfamilie identifiziert werden konnten (siehe Tabelle 1). Die unterschiedlichen Splicevarianten innerhalb eines FoxP Gens wurden mit Kleinbuchstaben durchnummeriert. Diese sieben cDNA Klone wurden vollständig sequenziert, dabei zeigten alle sieben cDNA Varianten einen offenen Leserahmen mit vorausgehendem Stoppkodon. Damit war sichergestellt, dass alle neuen cDNA Klone für ein *in vivo* vorkommendes Protein in *Xenopus laevis* kodieren. Wie aus dem Ergebnis der initialen PCR zu erwarten war, konnten cDNA Klone des *FoxP2* Gens, die mit *FoxP2a* und *FoxP2b* bezeichnet wurden, isoliert werden. Weiterhin konnten zwei neue cDNA Varianten in *Xenopus laevis*, der bereits von Pohl et al., 2005 isolierten *FoxP1*

Teilsequenz, mit eindeutigem ORF ermittelt und mit *FoxP1b* und *FoxP1c* benannt werden. Drei der isolierten Klone erwiesen sich im Sequenzvergleich mit den humanen *FOXP* Nukleotidsequenzen als *FoxP4* Varianten: *FoxP4a*, *FoxP4b* und *FoxP4c*.

Tab. 8: Zuordnung der isolierten Phagenklone zu den Mitgliedern der FoxP Subklassen.

Phagenklon-Nummer	FoxP Variante
2.1	FoxP1b
2.3	FoxP4a
3	FoxP4b
8.2	FoxP1c
12	FoxP2
15	FoxP4c
16.4	FoxP2 (identisch zu Phagenklon 12)

3.2 Genomische Organisation der *Xenopus* Gene *FoxP1, FoxP2* und *FoxP4*

Um die genomische Organisation der identifizierten *FoxP* Gene zu untersuchen, wurden die neu gefundenen Sequenzen mit den homologen genomischen Sequenzen von *Xenopus tropicalis*, die als sogenannte Scaffolds in der JGI X. tropicalis v4.0 Datenbank (http://www.ensembl.org) hinterlegt sind, verglichen. Die genomische Organisation von Genen in *Xenopus tropicalis* lässt sich weitgehend vollständig bestimmen, da dessen Genom größtenteils sequenziert ist. Aufgrund der nahen Verwandtschaft der Spezies *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis*, war es möglich, nahezu alle Exons der isolierten *FoxP1/2/4* Sequenzen von *Xenopus laevis*, einschließlich der Leader Exons, innerhalb des Genoms von *Xenopus tropicalis* zu lokalisieren. Dies ermöglichte eine exakte Bestimmung der Exon-/Intronstruktur der *Xenopus laevis FoxP1*, *FoxP2* und *FoxP4* Gene (siehe Abbildung 6).

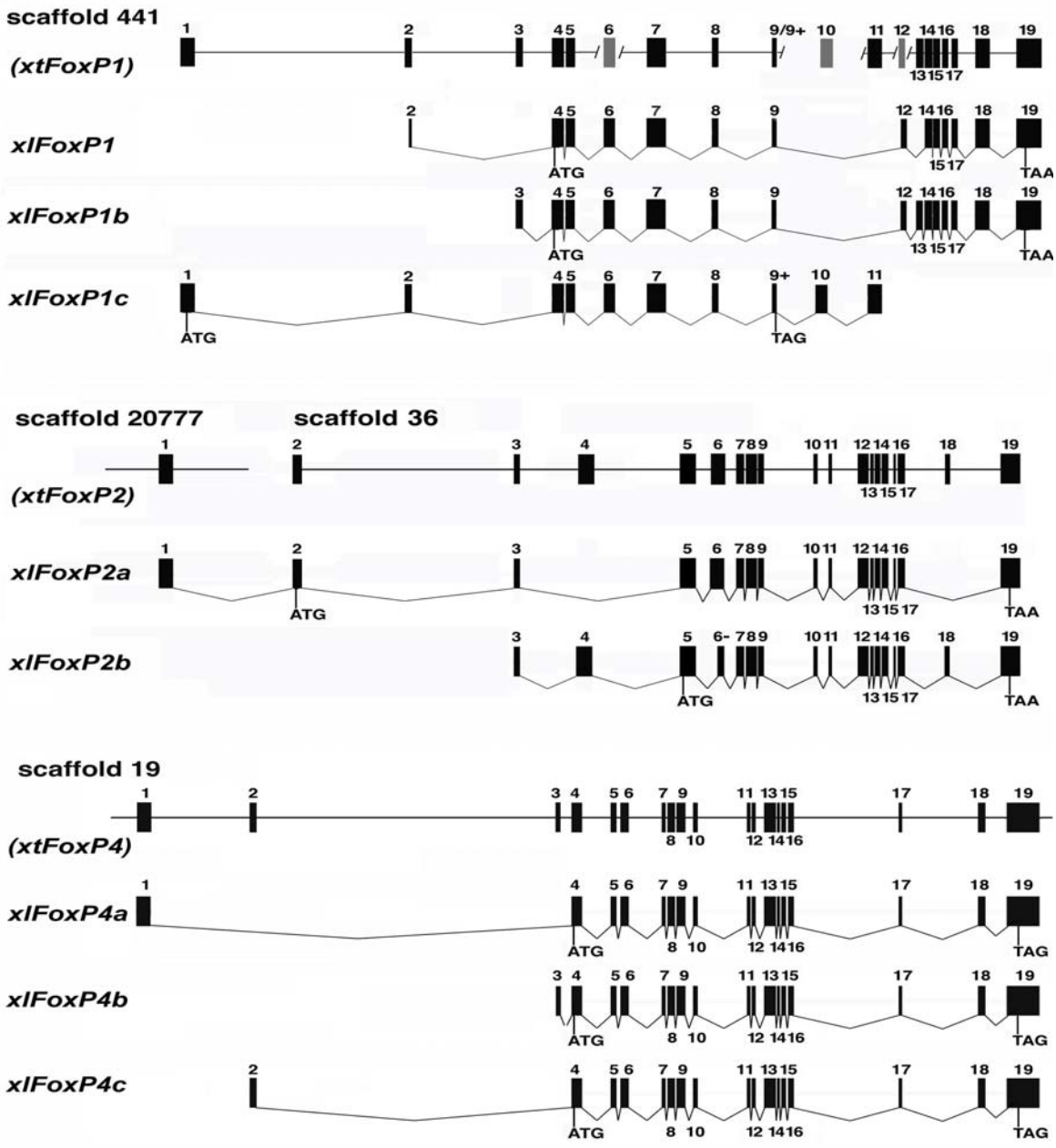


Abb. 6: Genomische Organisation der *Xenopus laevis* (xl) *FoxP1*, *FoxP2* und *FoxP4* Gene im Bezug zu den genomischen Scaffolds von *Xenopus tropicalis* (xt) (JGI X. tropicalis v4.0 Datenbank; http://www.ensembl.org). Die durchnummerierten Exons sind durch Balken, Introns durch Linien gekennzeichnet. Die Abstände sind maßstabsgetreu wiedergegeben, wobei eine Unterbrechung der Linien Bereiche außerhalb des Maßstabs signalisieren. Putative Translationsstartsignale (ATG) und Stoppsignale (TAA, TAG, TGA) sind angegeben. Exons, die aufgrund von Lücken in der genomischen Sequenz nicht lokalisierbar sind, sind in grau gezeichnet.

Dabei sind die durchnummerierten Exons durch Balken, die Introns durch Linien dargestellt. Unterhalb der Darstellung der genomischen Struktur des jeweiligen Gens wird die Verwendung der verschiedenen Exons für die isolierten Splicevarianten gezeigt. Mutmaßliche Startpunkte (ATG), sowie Stoppsignale (TAA, TAG oder TGA) der Translation sind dabei jeweils angedeutet. Exons, die aufgrund der fehlenden Sequenzinformation bis jetzt noch nicht innerhalb der genomischen Organisation lokalisiert werden konnten, sind grau dargestellt. Alle *Xenopus FoxP* Gene bestehen aus einer komplexen Struktur mit bis zu 19 Exons, inklusive unterschiedlicher Leader Exons. Die vollständigen Nukleotidsequenzen aller identifizierten *FoxP* Klone befinden sich im Anhang der Arbeit.

3.3 Vergleich der Aminosäuresequenzen der *Xenopus laevis* FoxP1, FoxP2 und FoxP4 Proteine

Die Aminosäuresequenzen von *Xenopus laevis* FoxP1, FoxP1b, FoxP1c, FoxP2a und FoxP2b, sowie die gemeinsame Sequenz von FoxP4a, FoxP4b und FoxP4c sind in Abbildung 7 dargestellt. Identische Aminosäuren der Proteine sind in blau abgebildet, differierende Aminosäuren in schwarz. Die charakteristische Forkhead-/Winged-helix DNA-Bindungsdomäne, bestehend aus 93 Aminosäuren, wurde rot hinterlegt. Neben dieser DNA-Bindungsdomäne besitzen FoxP1, FoxP2 und FoxP4 weitere charakteristische Proteinstrukturen, wie zum Beispiel im N-terminalen Bereich die Glutaminreiche Region bzw. Poly-Q-Strech (gelb hinterlegt). Besonders für das FoxP2 Protein ist eine der längsten Glutaminreichen Regionen charakteristisch. Weiterhin enthalten die Aminosäuresequenzen einen konservierten Leucin-Zipper (blau hinterlegt), der als Dimerisierungs-Motiv für Homo- und Heterodimerisierungen dient und dessen Integrität zur DNA-Bindung und Transkriptionsregulation benötigt wird. Außerdem weisen die Proteinsequenzen von FoxP1, FoxP2 und FoxP4 einen C_2H_2-Zinkfinger (grün hinterlegt) und ein PLNLV-Motiv (lila hinterlegt) zur Bindung des Co-Repressors CtBP1 (*human C-terminal binding protein 1)* auf.

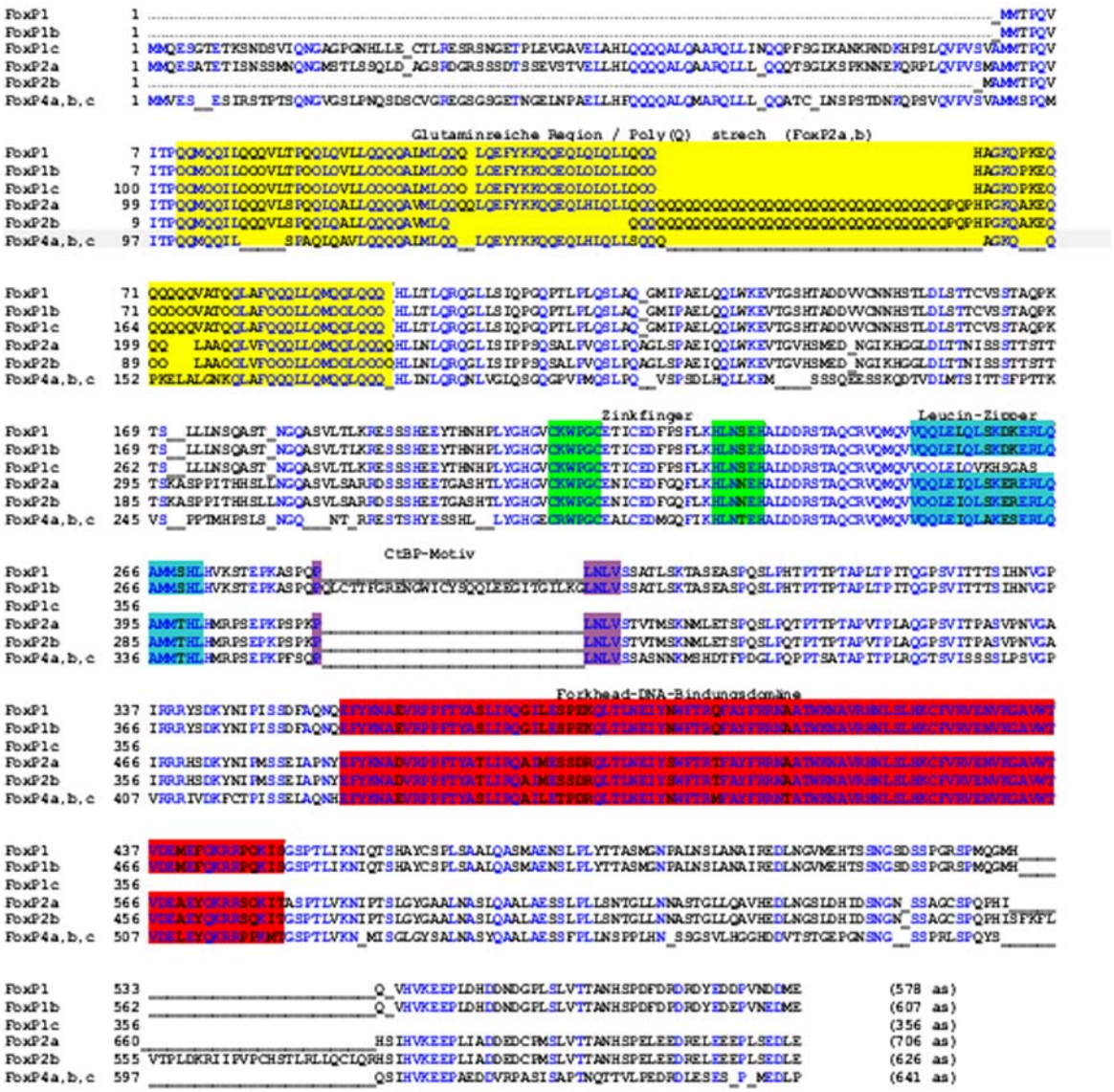


Abb. 7: Proteinsequenzvergleich der verschiedenen Isoformen der *Xenopus laevis* FoxP1, FoxP2 und FoxP4 Subklasse. Identische Aminosäuren sind blau markiert, differente sind in schwarz gezeichnet. Charakteristische Proteinstrukturen und Bindungsmotive sind unterschiedlich farblich hervorgehoben: die Forkhead-Domäne rot, der C_2H_2-Zinkfinger grün, der Leucin-Zipper blau, das CtBP1-Motiv lila und die Glutaminreiche Region/Poly-Q-Strech gelb. Angefertigt wurde das Protein-Alignment über Mac Molly® Tetra Version 3.9.

3.4 Phylogenetische Analyse der FoxP1, FoxP2 und FoxP4 Proteine in verschiedenen Spezies

Die phylogenetische Entwicklung zwischen *FoxP* Genen der Spezies *Xenopus laevis* und anderen Spezies, wie zum Beispiel Mensch, Maus, Zebrafisch und Zebrafink, ist basierend auf dem Programm DNAstar (Meg Align, Clustal method, PAM250) in Abbildung 8 gezeigt. Während die FoxP1 und FoxP2 Proteine in allen Spezies eine relativ nahe Verwandtschaft aufweisen, ist offensichtlich, dass das *Xenopus laevis* (xl) FoxP4 Protein im Vergleich zu seinem Säugetier-Homolog in Mensch (*Homo sapiens*, hs) und Maus (*Mus musculus*, mm) evolutionär weniger konserviert ist, was den Schluss einer relativ frühen Abspaltung dieses *Xenopus laevis* Gens aus einem gemeinsamen *FoxP* Vorläufergen zulässt.

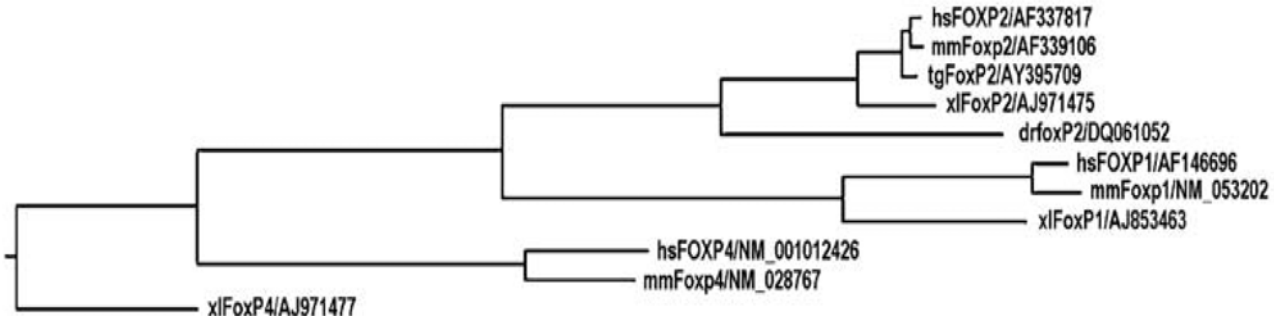


Abb. 8: Phylogenetischer Stammbaum der FoxP Proteine von Mensch (*Homo sapiens*, hs), Maus (*Mus musculus*, mm), Zebrafisch (*Danio rerio*, dr), Zebrafink (*Taeniopygia guttata*, tg) und Südafrikanischem Krallenfrosch (*Xenopus laevis*, xl). Die Zugangsnsnummern der Genbank sind jeweils hinter den Gennamen angegeben. Erstellt wurde der Stammbaum mit Hilfe des Programms DNAstar (Meg Align, Clustal method, PAM250).

3.5 Charakterisierung der FoxP1 Subfamilie in *Xenopus laevis*

Das *FoxP1* Gen in *Xenopus laevis* wurde bereits in seiner Nukleotidsequenz (AJ853463), sowohl in seiner zeitlichen Expression mittels RT-PCR, als auch mit Hilfe der Whole Mount *in situ* Hybridisation in seiner räumlichen Expression in der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* charakterisiert (Pohl et al., 2005). In dieser Arbeit sollen die beiden neu isolierten *FoxP1* Varianten, welche mit *FoxP1b* und *FoxP1c* benannt wurden, vorgestellt werden. Die Sequenzen der beiden Gene sind in der Datenbank von EMBL (European Molecular Biology Laboratory; http://www.embl.org) unter den Zugangsnummern AJ971473 für *FoxP1b*, und für *FoxP1c* unter AJ971474 (Schön et al., 2006) hinterlegt. Die vollständigen Nukleotidsequenzen aller identifizierten *FoxP* Klone befinden sich auch im Anhang der Arbeit. Die genomische Struktur und die Zusammenstellung der Exon-/Intron-Organisation der *FoxP1* cDNA Klone wurden mit Hilfe der Sequenzinformation des *Xenopus tropicalis* Genoms (Scaffold 404) untersucht.
Das *FoxP1* Transkript besteht aus einer Nukleotidsequenzlänge von 1.986 Basen und es enthält 14 Exons, wobei das Startkodon der Translation (ATG) in Exon 4 und das Stoppsignal (TAA) in Exon 19 lokalisiert ist. Das korrespondierende Protein besteht aus 578 Aminosäuren (Pohl et al., 2005). Der isolierte *Xenopus laevis FoxP1b* Klon besteht im Gegensatz zur *FoxP1* Variante aus 15 Exons und hat einen Sequenzlänge von 2.323 Nukleotiden. Dieser Klon beinhaltet ein anderes Leader Exon (Exon 3) als FoxP1 (siehe Abbildung 6). Exon 3 besitzt ein Stoppkodon des offenen Leseramens, welches dem mutmaßlichen Startsignal in Exon 4 (ATG) vorausgeht. Das Stoppsignal (TAA) der *FoxP1b* Sequenz ist in Exon 19 lokalisiert. Das zusätzliche Exon (Exon 13) in der *FoxP1b* Variante umfasst 87 bp und führt zu einer Insertion in der resultierenden Aminosäuresequenz von 29 Aminosäuren, so dass die Gesamtlänge des FoxP1b Proteins 601 Aminosäuren beträgt. Da der Einschub der zusätzlichen Aminosäuren in das PLNLV-Motiv (siehe Abbildung 7) inseriert, ist die Bindungsstelle für den Co-Repressor CtBP1 im FoxP1b Protein unterbrochen. Um die Vermutung zu überprüfen, dass durch die Insertion von 29 Aminosäuren in die CtBP1-Bindungsstelle eine Bindung des Co-Repressors unterbunden wird, wurde ein GST-Pulldown Assay durchgeführt. Mit Hilfe dieses

Experimentes können *in vitro* Protein-Protein Interaktionen nachgewiesen werden (siehe 2.3.3.4). In der Tat konnte gezeigt werden, dass die *Xenopus laevis* GST-FoxP1b Variante nicht in der Lage ist, CtBP1 zu binden, wohingegen *Xenopus laevis* GST-FoxP1, mit intaktem CtBP1-Motiv, mit dem radioaktiven Co-Repressor interagieren kann (siehe Abbildung 9). Als Beweis der gelungenen *in vitro* Translation dient der Input mit radioaktiv markiertem Protein.

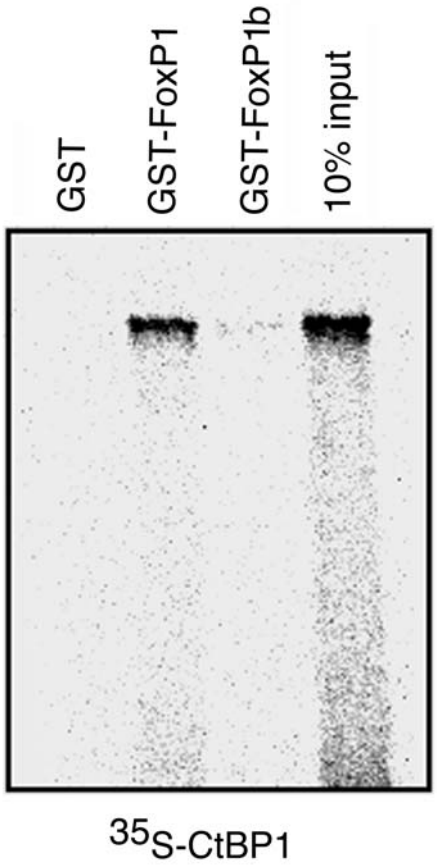


Abb. 9: *In vitro* Interaktionsanalyse zwischen *Xenopus laevis* FoxP1 und FoxP1b und humanem CtBP1. Der GST-Pulldown Assay wurde mit aufgereinigten GST-FoxP1 und GST-FoxP1b Fusionsproteinen und mit [^{35}S]-Methionin markiertem CtBP1-Protein durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurde das GST-Protein alleine verwendet. Der Input zeigt nur radioaktiv markiertes Protein als Kontrolle der gelungenen *in vitro* Translation. Der Pulldown Ansatz wurde auf einem 10%igen SDS-PAGE analysiert.

Das *Xenopus laevis FoxP1c* Transkript besitzt eine Nukleotidsequenz von 2.530 bp und enthält insgesamt 10 Exons. Dabei beinhaltet die *FoxP1c* cDNA ein zusätzliches erstes Exon (Exon 1), welches das Initiations-Methionin (Startkodon, ATG) enthält (siehe Abbildung 6). Daraus resultiert eine N-terminale Verlängerung des korrespondierenden FoxP1c Proteins um 93 Aminosäuren (siehe Abbildung 7). Insgesamt besteht die resultierende Aminosäuresequenz aus 356 Aminosäuren. In Exon 9 wird in der *FoxP1c* Variante eine alternative 3´-Splicelokalisation verwendet, was zu einer Verlängerung desselben (Exon 9+) führt und gleichzeitig ein vorzeitiges Stoppsignal (TAG) im Bereich des Leucin-Zippers enthält (siehe Abbildung 6). Daher ist die *Xenopus laevis FoxP1c* Variante im C-terminalen Bereich kürzer als seine Subgruppenmitglieder und es fehlt ihr sowohl die CtBP1-Bindungsstelle als auch die Forkhead-/Winged-helix DNA-Bindungsdomäne. Der Leucin-Zipper bricht nach 14 Aminosäuren ab (siehe Abbildung 7). Ferner besteht die *FoxP1c* cDNA an der 3´-untranslatierten Region aus zwei zusätzlichen Exons (Exon 10 und Exon 11), die in der *FoxP1* und *FoxP1b* Variante nicht vorkommen (siehe Abbildung 6).

Das zeitliche Expressionsmuster der Subfamilie *FoxP1* wurde mittels semiquantitativer RT-PCR in den Stadien 1 bis 45 (Nieuwkoop und Faber, 1967) untersucht. Dabei wurde das Haushaltsgen *Ornithin-Decarboxylase* (ODC) als interne Kontrolle verwendet. Die temporale Expression von *Xenopus laevis FoxP1b* ist identisch zu der des *FoxP1* Klons. So ist in Abbildung 10 zu erkennen, dass bei beiden Varianten die maternalen Transkripte bis zum Ende der Gastrulation (Entwicklungsstadium 10 bis 12) persistieren. Während der Neurulation (Stadium 13 bis 20) verschwinden die beiden RNA-Transkripte, bis die zygotische Transkription nach Stadium 20 in der Organogenese wieder einsetzt und die *FoxP1* und *FoxP1b* Transkripte bis zum Entwicklungsstadium 45 verstärkt detektiert werden können. Im Gegensatz dazu fehlt die maternale Expression von *FoxP1c* in der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* bis zum Ende der Neurulation. Zygotische Transkripte des *FoxP1c* Gens können erst im Entwicklungsstadium 30 und 45 gefunden werden (siehe Abbildung 10).

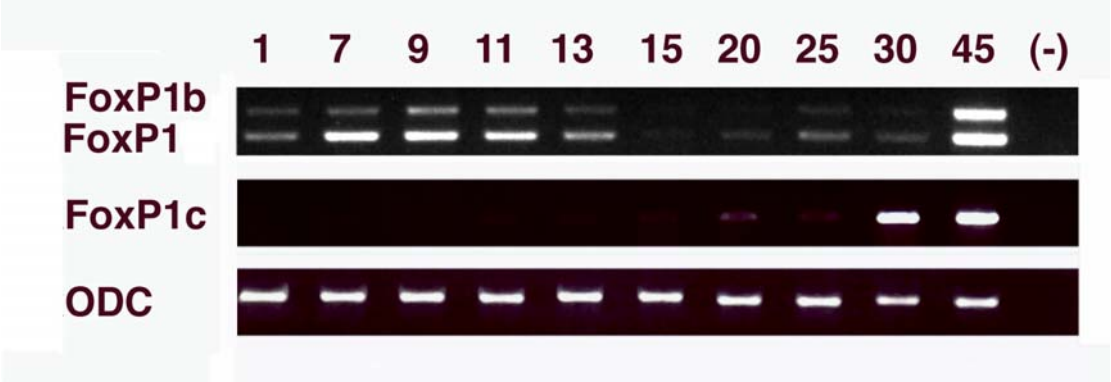


Abb. 10: Zeitliches Expressionsmuster der Gene *FoxP1*, *FoxP1b* und *FoxP1c* während der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis*. Die semiquantitative RT-PCR wurde jeweils mit gesamt-RNA der einzelnen Entwicklungsstadien (Nieuwkoop und Faber, 1967) durchgeführt. Oben gezeigte Zahlen geben die Embryonalstadien an. Die rechte Spalte, durch (-) markiert, zeigt die Negativkontrolle unter Ausschluss von cDNA. Die unteren Banden zeigen die interne Kontrolle über das Haushaltsgen *Ornithin-Decarboxylase* (ODC). Für die PCR der ODC wurde eine Zyklenzahl von 24, für die *FoxP1* Gene eine Zyklenzahl von 35 gewählt.

Die räumliche Expression einer Variante des *FoxP1* Gens in der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* wurde mittels Whole Mount *in situ* Hybridisierung (Harland, 1991) ermittelt und bereits veröffentlicht (Pohl et al., 2005). In frühen Teilungsstadien zeigte sich das *FoxP1* Transkript in den animalen Blastomeren (Stadium 4). Die *FoxP1* Expressionsdomänen konnte in der weiteren Entwicklung von *Xenopus laevis* überwiegend im Gehirn, im Auge und dem Splanchnikus-Gebiet des Seitenplattenmesoderms lokalisiert werden (Stadium 31). Ab Entwicklungsstadium 35 zeigte sich eine *FoxP1* Expression in der Linse und einzelnen Regionen des Kopfmesenchyms. In höheren Entwicklungsstadien von *Xenopus laevis* (Stadium 41) konnte das *FoxP1* Transkript in der Außenregion des Mesenzephalons, sowie im Dünndarm lokalisiert werden. Differenzen der räumlichen Expression während der Embryogenese von *Xenopus laevis* konnten weder für die von uns isolierte *FoxP1b* Variante, noch für die *FoxP1c* Variante der *FoxP1* Subfamilie festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt).

Durch Überexpressionsstudien und Funktionsverluststudien mittels Injektion von *FoxP1* mRNA beziehungsweise Morpholino-*antisense*-Oligonukleotiden in frühe *Xenopus laevis* Embryonalstadien sollte die Rolle des *FoxP1* Genes während der Embryogenese morphologisch und histologisch untersucht werden. Um einen *Gain-of-Function* zu bewirken, wurden 125 pg *FoxP1* mRNA pro Blastomere in die ventralen Blastomeren (Abbildung 11B) und in die dorsalen Blastomeren (Abbildung 11C) eines *Xenopus laevis* Embryos im Vier-Zell-Stadium (Stadium 3) mittels Mikroinjektion injiziert. Die sich entwickelnden, dorsal injizierten Embryonen zeigten einen ausgeprägten Phänotyp mit einer schweren Reduktion der Körperachse und einen Verlust von Kopfstrukturen (siehe Abbildung 11C). Die ventral injizierten Embryonen zeigten keine relevante Änderung des Phänotyps. Die Injektion von Morpholino-*antisense*-Oligonukleotiden des *FoxP1b* Gens zum sogenannten Knockdown dieser Splicevariante in *Xenopus laevis* erbrachte ebenfalls keinen signifikanten Phänotyp (Daten hier nicht gezeigt).

Abb. 11: *Xenopus laevis* Embryonen im Stadium 28 nach Nieuwkoop und Faber (1967). (A) Kontroll-Embryonen. (B) Injektion von 125 pg *FoxP1* mRNA/Blastomere in die ventralen Blastomeren eines Embryos im Vier-Zell-Stadium. (C) Injektion von 125 pg *FoxP1* mRNA/Blastomere in die dorsalen Blastomeren eines Embryos im Vier-Zell-Stadium.

3.6 Charakterisierung der FoxP2 Subfamilie in *Xenopus laevis*

Zwei verschiedene Varianten von *Xenopus laevis FoxP2* konnten isoliert werden und wurden mit *FoxP2a* und *FoxP2b* benannt. Hinterlegt wurden die Sequenzen unter den Zugangsnummern AJ971475 und AJ971476 in der Datenbank von EMBL (Schön et al., 2006). Die genomische Organisation der *FoxP2* cDNA-Klone wurden mit Hilfe der Sequenzinformation des *Xenopus tropicalis* Genoms (JGI X. tropicalis v4.0, Scaffold 36) untersucht. Dabei zeigt sich, dass sich das analoge *Xenopus tropicalis FoxP2* Gen in seiner genomischen Organisation über mehr als 200 kb erstreckt und mindestens 19 Exons beinhaltet (Abbildung 6). Die *Xenopus laevis FoxP2a* cDNA ist 2.641 bp lang, die cDNA von *FoxP2b* mit 2.371 bp etwas kürzer. Unterschiede der beiden *FoxP2* Transkripte bestehe beispielsweise darin, dass die *FoxP2a* Variante im 5´-Bereich zwei zusätzliche Exons beinhaltet (Exon 1 und Exon 2), ihr dafür aber Exon 4 und Exon 18 fehlen, welche dagegen der *FoxP2b* Klon einschließt (Abbildung 6). Ein weiterer Unterschied ist der Gebrauch einer alternativen 3´-Splicestelle in *FoxP2b* in Exon 6, was zu einem um 60 bp reduzierten Exon 6- führt. Dies hat in der korrespondierenden Proteinsequenz von FoxP2b einen Verlust von 20 Aminosäuren zur Folge (Abbildung 7). Gemeinsam ist beiden cDNA Klonen, dass sie jeweils aus 17 Exons bestehen und einen kompletten offenen Leserahmen enthalten. Exon 2 enthält in der *FoxP2a* Sequenz das Startsignal der Translation (ATG), in der *FoxP2b* Sequens ist dieses im Exon 5 lokalisiert. Das Stoppkodon beider Gene (TAA) findet sich in Exon Nummer 19. Das resultierende FoxP2a Protein besteht aus 706 Aminosäuren, das FoxP2b Protein besteht aus 626 Aminosäuren (Abbildung 7). Beide Proteine beinhalten die charakteristische Forkhead-Domäne (rot hinterlegt), einen Zinkfinger (grün hinterlegt), einen Leucin-Zipper (blau hinterlegt), ein CtBP1-Bindungsmotiv (lila hinterlegt) und im N-terminalen Bereich eine Glutaminreiche Region bzw. Poly-Q-Strech (gelb hinterlegt). Es fällt auf, dass das FoxP2a Forkhead-Protein, ähnlich dem FoxP1c Protein, eine N-terminale Verlängerung von 92 Aminosäuren aufweist, die das FoxP2b Protein, aufgrund des Fehlens von Exon Nummer 1 und 2, nicht besitzt. Im C-terminalen Bereich beinhaltet das Protein FoxP2b einen Einschub aus 30 Aminosäuren, der aus dem zusätzlichen Exon 18 resultiert (siehe Abbildung 7).

Um die zeitliche und die räumliche Expression der *FoxP2* Transkripte während der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* zu bestimmen, wurden Embryonen der Entwicklungsstadien 1 bis 45 eingesetzt. In einem ersten Experiment wurde das Amplifikat so gewählt, dass der Startpunkt an der Exon-/Intron-Grenze des Exons Nummer 2 besteht und das Amplifikat insgesamt aus 100 bp (von Base 269 bis 368) besteht, so dass nur *FoxP2a* Teilsequenzen amplifiziert werden können (Daten hier nicht gezeigt). Dabei zeigt sich, dass das *FoxP2a* Transkript nicht maternal transkribiert wird und erst nach der Midblastula Transition (MBT; Stadium 9), das heißt mit Einsetzen der Transkription des Embryos, wird eine sehr schwache Expression in Stadium 11 sichtbar. Die Expression des *FoxP2a* Transkriptes in der semiquantitativen RT-PCR wird im Entwicklungsstadium 15 prominenter (Neurulation), um bis Stadium 45 als kräftige Expression in *Xenopus laevis* zu imponieren (Schön et al., 2006). In einem folgenden Experiment wurden die Oligonukleotid Primer so gewählt, dass sie in Exon 3 und Exon 5 zu liegen kommen. Damit ist es möglich, die beiden *FoxP2* Varianten in einer RT-PCR voneinander zu diskriminieren (Abb. 12).

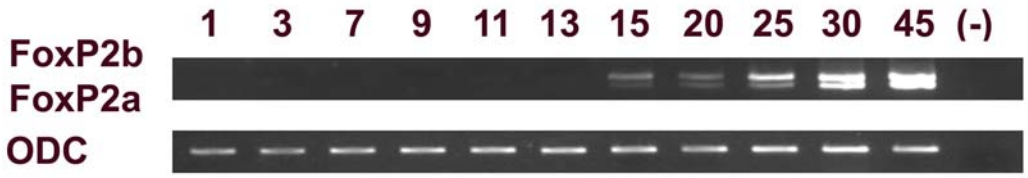


Abb. 12: Temporales Expressionsmuster des *Xenopus laevis FoxP2* Gens während der embryonalen Entwicklung. *FoxP2a* Klon zeigt sich als untere Bande (280 bp-Fragment), *FoxP2b* Klon als obere Bande (370 bp-Fragment). Die semiquantitative RT-PCR wurde jeweils mit gesamt-RNA der einzelnen Entwicklungsstadien durchgeführt (Nieuwkoop und Faber, 1967). Oben gezeigte Zahlen geben die Embryonalstadien an (Stadium 1 bis 45). Die rechte Spalte, durch (-) markiert, zeigt die Negativkontrolle unter Ausschluss von cDNA. Die untersten Banden zeigen die interne Kontrolle über das Haushaltsgen *Ornithin-Decarboxylase* (ODC). Für die PCR der ODC wurde eine Zyklenzahl von 24, für die *FoxP2* Gene eine Zyklenzahl von 32 gewählt.

Das *FoxP2a* Transkript stellt sich dabei als kleineres RT-PCR-Fragment (280 bp) dar. Das Expressionsmuster in *Xenopus laevis* deckt sich mit dem des ersten Experimentes. Das größere RT-PCR-Fragment (370 bp) von *FoxP2b*, welches durch das zusätzliche Exon 4 entsteht, stellt sich als obere Bande dar. Auch *FoxP2b* ist maternal nicht transkribiert und erst ab Stadium 15 als sehr schwache Expression nachweisbar. Das Transkriptionslevel dieses Gens steigert sich in Analogie zu dem des *FoxP2a* Transkriptes bis zum späten Tadpole-Stadium (Stadium 45) (Abb. 12).

In der Whole Mount *in situ* Hybridisierung können die Digoxigenin markierten antisense *FoxP2* Transkripte als erstes in den anterior/superioren Augenfeldern und in den kaudalen Branchialbögen (Schlundbögen) im Entwicklungsstadium 21 von *Xenopus laevis* lokalisiert werden (Abb. 13A). Auch in späteren Stadien der Entwicklung des *Xenopus laevis* Embryos persistiert die *FoxP2* Expression in Vorläuferstrukturen der Retina (Netzhaut), nämlich dem Augenbecher (Abb. 13B und C) und im Ziliarkörper (Abb. 13E Insert), sowie in den kaudalen Branchialbögen (Abb. 13D und E). Weitere Expressionsdomänen des *FoxP2* Transkriptes sind die Vorniere (Pronephros) ab Entwicklungsstadium 25 (Abb. 13B, C und D) und die Schwanzspitze, zu sehen ab Stadium 35 (Abb. 13D und E). Ab ca. Entwicklungsstadium 29 können *FoxP2* Anfärbungen präziser Hirnregionen des *Xenopus laevis* Embryos beobachtet werden. Zu diesen spezifischen Regionen zählt das anteriore Vorderhirn, auch Prosenzephalon genannt (Abb. 13C, E, F und G), aus dem sich das spätere Telenzephalon oder Endhirn entwickelt. Weiterhin zu den spezifisch angefärbten *FoxP2* Domänen des Gehirns zählen das mediale Mittelhirn (Mesenzephalon) (Abb. 13C, E, F, G und H) und das laterale Rautenhirn (Rhombenzephalon) (Abb. 13C, E, F, G und I), aus dem sich später das Metenzephalon (Nachhirn) und das Myelenzephalon (Markhirn) entwickeln. Aus dem Metenzephalon gehen das Kleinhirn (Cerebellum) und die Brücke (Pons) hervor und aus dem Myelenzephalon die Medulla oblongata (verlängertes Mark). Differenzen der räumlichen Expression in der *Xenopus laevis* Embryogenese zwischen der *FoxP2a* und der *FoxP2b* Variante konnten nicht festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt).

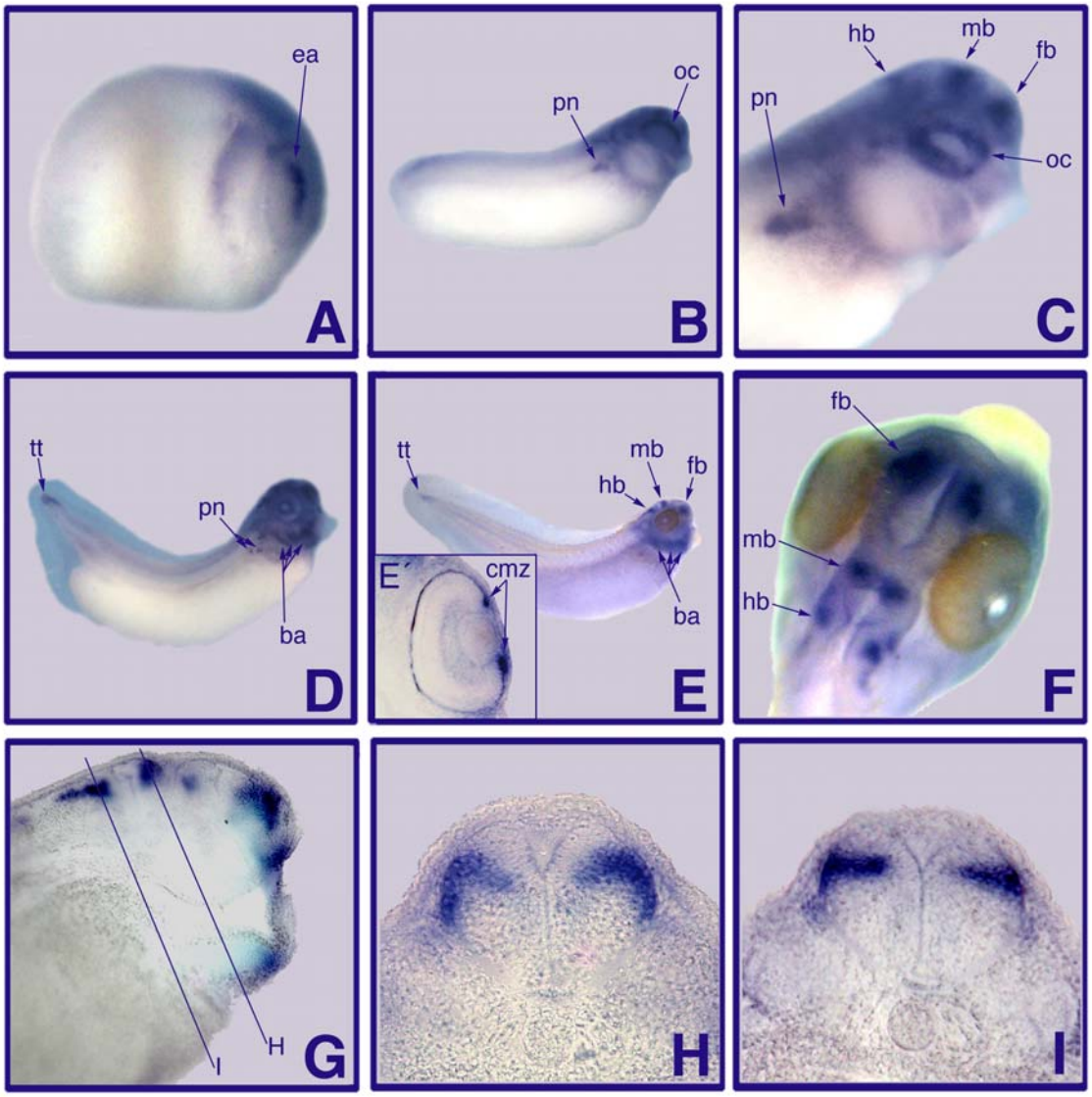


Abb. 13: Räumliches Expressionsmuster von *FoxP2* während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. (A) Stadium 21 von lateral. (B) Stadium 25 von lateral. (C) Seitenansicht der Kopfregion eines Embryos im Stadium 29. (D) Seitenansicht eines Embryos im Stadium 35. (E) Seitenansicht eines Embryos im Stadium 40; Insert: Frontalschnitt durch das Auge. (F) Kopfbereich von dorsal bei einem Embryo im Stadium 40. (G) Paramedianer Sagittalschnitt durch einen Embryo im Stadium 40. (H) Transversalschnitt durch den Bereich des Mesenzephalons (Mittelhirn) im Stadium 40. (I) Transversalschnitt durch den Bereich des Rhombenzephalons (Hinterhirn) im Stadium 40. Die Linien in (G) kennzeichnen die Schnittebenen der Schnitte (H) und (I). *cmz* Ziliarkörper, *ba* Branchialbögen, *ea* Augenfeld, *fb* Forderhirn, *hb* Hinterhirn, *mb* Mittelhirn, *oc* Augenbecher, *pn* Pronephros, *tt* Schwanzspitze. Entwicklungsstadien nach Nieuwkoop und Faber (1967).

3.7 Charakterisierung der FoxP4 Subfamilie in *Xenopus laevis*

Es wurden die *Xenopus laevis* cDNA Klone *FoxP4a*, *FoxP4b* und *FoxP4c* isoliert und bei EMBL hinterlegt (Schön et al., 2006) (AJ971477, AJ971478 und AJ971479). Ein Vergleich dieser cDNA Klone mit dem *Xenopus tropicalis* Genom (Scaffold 41) zeigt, dass sich die genomische Organisation dieses *Xenopus tropicalis* Gens über fast 33 kb erstreckt und 19 Exons beinhaltet (siehe Abbildung 6). Die drei aus *Xenopus laevis* isolierten cDNA Varianten unterscheiden sich jeweils nur in ihrem ersten nicht-kodierenden Exon. *FoxP4a* ist 2.664 bp lang, besteht aus 17 Exons und beginnt mit Exon Nummer 1. Im Gegensatz dazu benutzt die *FoxP4b* Variante Exon 3 als erstes Exon und besteht aus insgesamt 2.553 bp. Das *FoxP4c* Transkript beginnt mit Exon 2 und umfasst 2.537 bp. Bei allen drei *FoxP4* Varianten befindet sich das Startsignal der Translation (ATG) in Exon 4 und das Stoppkodon (TAG) in Exon 19, so dass alle isolierten Transkripte für das gleiche, 641 Aminosäuren umfassende Forkhead-Protein kodieren. Die Aminosäuresequenz des FoxP4 Proteins weist die für FoxP1/2/4 charakteristischen Strukturdomänen, wie die Forkhead-Domäne (rot hinterlegt), einen Zinkfinger (grün hinterlegt), einen Leucin-Zipper (blau hinterlegt), ein CtBP1-Bindungsmotiv (lila hinterlegt) und N-terminal eine Glutaminreiche Region (gelb hinterlegt) auf (siehe Abbildung 7).

Eine Analyse des zeitlichen Expressionsmusters von *Xenopus laevis FoxP4* mittels semiquantitativer RT-PCR wurde zuerst mit Oligonukleotid Primern durchgeführt, die alle drei Varianten des *FoxP4* Gens amplifizieren. Dabei zeigen die *FoxP4a/b/c* Transkripte eine schwache maternale Expression bis zur Gastrulation. Von der Gastrulation an beginnt die zygotische Transkription der *FoxP4a*, *4b* und *4c* Gene (Stadium 11) und die Expression steigert sich zu einer auf dem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel stark sichtbaren Anfärbung der *FoxP4a/b/c* Teilsequenzen in Stadium 30 und 45 der *Xenopus laevis* Embryonen (siehe Schön et al., 2006). Die Daten sind hier nicht gezeigt. In einem folgenden Experiment wurde für jede *FoxP4* Variante ein spezifisches Primerpärchen ausgewählt, um die zeitliche Expression der einzelnen *FoxP4* Splicevarianten in *Xenopus*

laevis zu erfassen. Dazu wurde der *forward* Primer jeweils in das erste nicht-kodierende Exon gelegt (das heißt: bei *FoxP4a* in Exon 1, bei *FoxP4b* in Exon 3 und bei *FoxP4c* in Exon 2) und der gemeinsame *reverse* Primer in des Exon 6, das alle drei *FoxP4* Varianten enthalten. Das zeitliche Expressionsmuster des *FoxP4a* Amplifikats in *Xenopus laevis* ist mit dem des ersten Versuchs identisch (siehe Abbildung 14). Im Gegensatz dazu ist das *FoxP4b* Transkript nicht maternal exprimiert und es ist erst ab Stadium 11 eine schwache Expression in *Xenopus laevis* nachweisbar. Diese zeigt eine Progredienz der Expressionsstärke, bis in Stadium 25, 30 und 45 eine ähnlich starke *FoxP4b* Expression nachzuweisen ist, wie für das *FoxP4a* Transkript (Abbildung 14). Bemerkenswerterweise ist eine Expression der *FoxP4c* Variante bis Stadium 25 über die RT-PCR nicht detektierbar. Erst in den Tadpole-Stadien 30 und 45 von *Xenopus laevis* kann eine Expression nachgewiesen werden. Die Daten der RT-PCR für die *FoxP4c* Splicevariante sind hier nicht gezeigt.

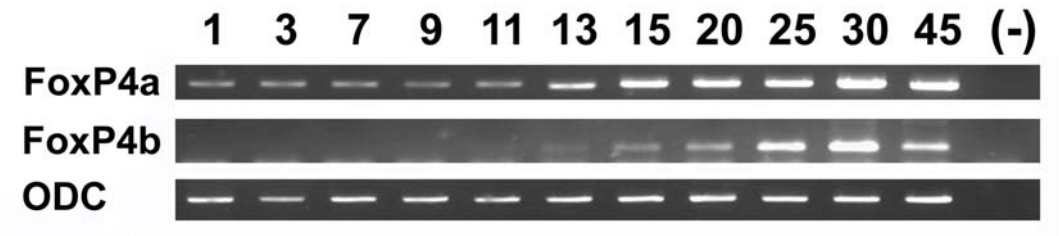


Abb. 14: Zeitliches Expressionsmuster der *Xenopus laevis* Gene *FoxP4a* und *FoxP4b* während der embryonalen Entwicklung. Die semiquantitative RT-PCR wurde jeweils mit gesamt-RNA der einzelnen Entwicklungsstadien (Nieuwkoop und Faber, 1967) durchgeführt. Oben gezeigte Zahlen geben die Embryonalstadien an (Stadium 1 bis 45). Die rechte Spalte, durch (-) markiert, zeigt die Negativkontrolle unter Ausschluss von cDNA. Die unteren Banden zeigen die interne Kontrolle über das Haushaltsgen *Ornithin-Decarboxylase* (ODC). Für die PCR der ODC wurde eine Zyklenzahl von 24, für die *FoxP4* Gene eine Anzahl von 31 gewählt.

Mit Hilfe der Whole Mount *in situ* Hybridisierung konnte die räumliche Expression des *FoxP4* Gens ermittelt werden. Dabei wurden *FoxP4* Digoxigenin markierte antisense Transkripte eingesetzt. Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, findet sich die früheste eindeutig nachweisbare Expression von *FoxP4* in der anterioren Neuralfalte im Entwicklungsstadium 15 (Abb. 15A). Im Stadium 21 ist bereits eine intensive Färbung durch *FoxP4* in drei Domänen des zentralen Nervensystems sichtbar: im Vorderhirn (Prosenzephalon), im Mittelhirn (Mesenzephalon) und im Hinterhirn bzw. Rautenhirn (Rhombenzephalon) (Abb. 15B). Außerdem zeigt sich im Stadium 21 eine *FoxP4* Expression in den Augenfurchen aus denen später die Augenbläschen, die Augenbecher und schließlich die Zellen der Retina (Netzhaut) hervorgehen (Abb. 15B, C und D). Die spezifischen Expressionsdomänen im ZNS und im Augenbereich persistieren auch in fortgeschrittenen Embryonalstadien, Stadium 25 bis 35 (siehe Abb. 15C, D und E). Neben der cerebralen und retinalen Expression von *FoxP4* zeigen sich in späteren Entwicklungsstadien weitere spezifische *FoxP4* Färbungen im *Xenopus laevis* Embryo. So kann eine *FoxP4* Expression in den Branchialbögen (Schlundbögen) ab Entwicklungsstadium 33 beobachtet werden (Abb. 15D und F), aus denen sich später die Kiemen (Branchia) und mesodermale Strukturen des Kopfes und des Halses entwickeln. Weitere *FoxP4* Expressionsdomänen zeigen sich in späteren Entwicklungsstadien am Boden der sogenannten *hatching gland* (Schlüpfdrüse) (Abb. 15D und E) und im Pankreas (Abb. 15F). Differenzen der räumlichen Expression der verschiedenen *FoxP4* Splicevarianten in der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* konnten für keine *FoxP4* Variante festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt).

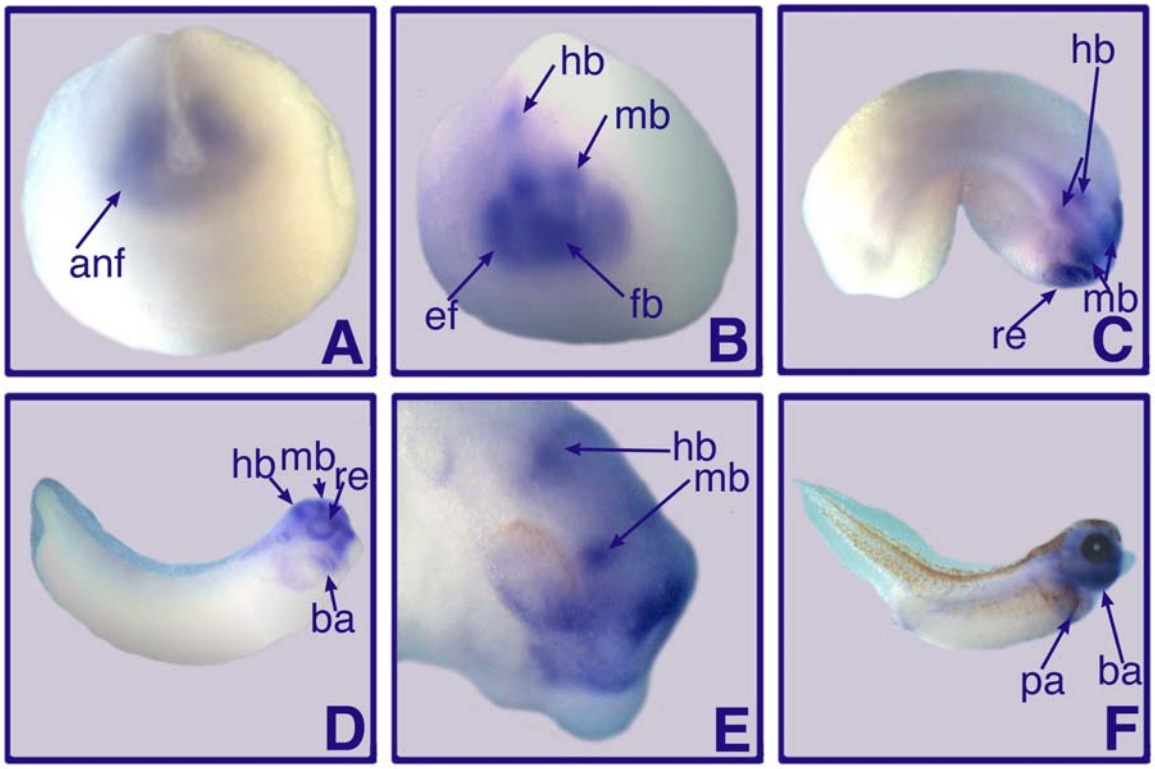


Abb. 15: Räumliches Expressionsmuster von *FoxP4* während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. (A) Stadium 17 von anterior. (B) Stadium 21 von anterior. (C) Dorsalansicht eines Embryos im Stadium 25. (D) Seitenansicht eines Embryos im Stadium 33. (E) Detailansicht der Kopfregion im Stadium 35 von anterolateral. (F) Seitenansicht eines Embryos im Entwicklungsstadium 39. *anf* anteriore Neuralfalte, *ba* Branchialbögen, *ef* Augenfurche, *fb* Forderhirn, *hb* Hinterhirn, *mb* Mittelhirn, *pa* Pankreas, *re* Retina. Entwicklungsstadien nach Nieuwkoop und Faber (1967).

Zusammengefasst besitzen die einzelnen Mitglieder der Subklasse P (*FoxP1*, *FoxP2* und *FoxP4*) der Forkhead Transkriptionsfaktoren sowohl gemeinsame räumliche Expressionsdomänen in der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis*, wie zum Beispiel Lokalisationen im Gehirn (Vorder-, Mittel- und Hinterhirn) und im Auge, als auch spezifische Expressionsdomänen, wie beispielsweise *FoxP1* im embryonalem Darm, *FoxP2* in der Vorniere (Pronephros) und in der Schwanzspitze und *FoxP4* im embryonalen Pankreas.

4. Diskussion

4.1 Die FoxP Subklasse

Die Forkhead Transkriptionsfaktoren, die sowohl in niedrigen eukaryotischen Organismen, wie zum Beispiel der Hefe, als auch im Menschen zu finden sind, gehören zwar nicht zu den größten Familien der Transkriptionsfaktoren, sie spielen allerdings eine wichtige Rolle in vielen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen (Carlsson und Mahlapuu, 2002). Und erst kürzlich wurde über eine zentrale Rolle der Forkhead Gene in der Immunregulation und in der Pathogenese verschiedener immunologischer Störungen berichtet (Jonsson und Peng, 2005).

Die Forkhead Transkriptionsfaktoren werden anhand der Konservierung ihrer Forkhead DNA-Bindungsdomäne in zahlreiche Subklassen unterteilt (Kaestner et al., 2000). Derzeit sind Subklasse A bis S bekannt, wobei der Forkhead Transkriptionsfaktor R der N-Subklasse zugehörig ist. Im menschlichen Genom konnten bisher 43 Mitglieder (*FOXA-FOXQ*) dieser Genfamilie identifiziert werden (Katoh und Katoh, 2004). Im Modellorganismus *Xenopus laevis* konnten mittlerweile über 30 Forkhead Gene beschrieben werden (Pohl und Knöchel, 2004). In der Spezies *Homo sapiens* sind aktuell vier Gene der Subfamilie P der Forkhead Transkriptionsfaktoren bekannt (*FOXP1*, *FOXP2*, *FOXP3* und *FOXP4*).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir mittels Screening einer λZAP-cDNA-Tadpole Bibliothek sieben cDNA Klone der Subklasse P, zwei *FoxP1* Klone (*FoxP1b* und *FoxP1c*), zwei *FoxP2* Klone (*FoxP2a* und *FoxP2b*) und *drei FoxP4* Klone (*FoxP4a*, *FoxP4b* und *FoxP4c*), in *Xenopus laevis* identifizieren.

4.2 FoxP1

Zwei der von uns isolierten *Xenopus laevis* cDNA Klone (*FoxP1b* und *FoxP1c*) gehören zu der Subfamilie *FoxP1*. Das *FoxP1* Gen in *Xenopus laevis* wurde bereits im Jahr 2005 identifiziert und charakterisiert (Pohl et al., 2005). Der von uns isolierte *FoxP1b* Klon ähnelt in seiner genomischen Organisation stark dem des bekannten *FoxP1* Gens in *Xenopus laevis*. Allerdings besteht die *FoxP1b* Variante aus insgesamt 15 Exons und ist damit um ein Exon länger, als die von Pohl *et alii* ein Jahr zuvor identifizierte *FoxP1* Variante. Ein zusätzlicher Unterschied zwischen beiden Genen besteht in der Nutzung unterschiedlicher Leader Exons (siehe Abbildung 6). Die korrespondierenden Proteine, FoxP1 und FoxP1b, unterscheiden sich einzig durch eine 29 Aminosäuren lange Insertion im FoxP1b Protein, verursacht durch das zusätzliche Exon Nummer 13. Dieser Einschub inseriert in das PLNLV-Motiv und unterbricht damit die Bindungsstelle für den Co-Repressor CtBP1 (*human C-terminal binding protein 1)* im FoxP1b Protein. Das bei dieser Forkhead Variante eine *in vitro* Protein-Protein Interaktion zwischen FoxP1b und CtBP1 unterbleibt, während das FoxP1 Protein CtBP1 binden kann, konnten wir mittels GST-Pulldown Assay in *Xenopus laevis* nachweisen (siehe Abbildung 9). Die Bindung des Co-Repressors CtBP1 kann die Repression der Transkription durch die Gene *Foxp1* und *Foxp2* erhöhen, ist jedoch nicht essenziell für die transkriptionale Repression, wie in der Maus gezeigt werden konnte (Li et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass CtBP1 Homodimerisierungen ausbilden kann und damit als Brücke zwischen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren und anderen, nicht DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren dienen kann (Turner und Crossley, 2001). Die *FoxP1b* Splicevariante in *Xenopus laevis* könnte somit durch das funktionell inaktive CtBP1-Bindungsmotiv diese Modulation der Transkriptionsaktivität nicht ausüben.

Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten *FoxP1* Splicevarianten weicht die von uns isolierte *FoxP1c* Variante in *Xenopus laevis* stark von den bereits bekannten Isoformen ab, da sie mit 10 Exons und 356 Aminosäuren im korrespondierenden Protein deutlich kürzer ist. Durch ein zusätzliches erstes Exon mit Translationsstartsignal (ATG) erhält die *FoxP1c* Variante eine N-terminale Verlängerung um 93 Aminosäuren, bricht jedoch im C-

terminalen Bereich durch Verwendung einer alternativen Splicesite im Exon Nummer 9+ frühzeitig ab. Dadurch fehlt der *FoxP1c* Variante sowohl das vollständige Leucin-Zipper Motiv, als auch die komplette Forkhead-/Winged-helix DNA-Bindungsdomäne (siehe Abbildung 7). Eine ähnlich verkürzte *Foxp1* Splicevariante konnte in der Maus (Shu et al., 2001), als auch eine kurze, forkheadlose *FOXP2* Variante im Menschen (Bruce und Margolis, 2002) beschrieben werden. Die Entdeckung dieser kurzen *FoxP1* Splicevariante in *Xenopus laevis* könnte von besonderem Interesse sein, da durch den Leucin-Zipper und durch das Zinkfinger Bindungsmotiv eine Heterodimerisierung der *FoxP* Transkriptionsfaktoren ermöglicht wird und dadurch eine Beeinflussung der Transkriptionsaktivität (Wang et al., 2003 ; Li et al., 2004). Durch die kurze *FoxP1c* Variante könnte die Aktivität der Transkription durch einen Verlust der Heterodimerisierung zwischen den einzelnen Forkhead Transkriptionsfaktoren der Subklasse P reguliert werden. Auch in der Maus konnten unterschiedliche Isoformen des *FoxP* Gens mit verschiedenen Transkriptionsstartpunkten beschrieben werden (Wang et al., 2003).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von FoxP1 in *Xenopus laevis*, Mensch, Maus und Zebrafisch zeigt die höchste Homologie, die jemals für Forkhead Gene zwischen verschiedenen Spezies beschreiben wurde (Pohl et al., 2005). Dabei besteht eine 86%ige Identität zwischen dem *Xenopus laevis* und dem Maus, als auch dem menschlichen FoxP1 Ortholog und eine 70%ige Identität zwischen *Xenopus laevis* FoxP1 und Zebrafisch FoxP1 Protein. Wobei sowohl die Forkhead-/Winged-helix DNA-Bindungsdomäne, als auch das Zinkfinger Bindungsmotiv höchst konserviert sind (Pohl et al., 2005).

Wir konnten zeigen, dass das zeitliche Expressionsmuster der einzelnen *FoxP1* Splicevarianten in *Xenopus laevis*, welches mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht wurde, nicht einheitlich ist. So werden das *FoxP1* und das *FoxP1b* Transkript von Stadium 1 bis zum Zeitpunkt der Gastrulation (Stadium 13), dann erst wieder ab Stadium 20 mit steigender Expressionsstärke bis Stadium 45 exprimiert, wohingegen sich die *FoxP1c* RNA-Transkripte nur in den höheren Entwicklungsstadien von *Xenopus laevis* (Stadium 30-45) zum Zeitpunkt der Organogenese zeigen. Das temporale Expressionsmuster zeigt, dass das verkürzte *FoxP1c* Transkript während den frühen Entwicklungsstadien von

Xenopus laevis keine Rolle zu spielen scheint und erst in späteren Embryonalstadien eine vermehrte Transkriptionsaktivität der kurzen, forkheadlosen *FoxP1c* Splicevariante zu verzeichnen ist. Im Gegensatz dazu werden die *FoxP1* und die *FoxP1b* Variante der FoxP1 Subklasse bereits in den ersten Teilungsstadien der Embryogenese von *Xenopus laevis* maternal transkribiert.

Die räumliche Expression von *FoxP1* in der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* stellt sich für all drei *FoxP1* Transkripte in identischer Lokalisation dar. Sie betrifft vor allem das Gehirn (Mesenzephalon), den Augenbereich und mesodermale Strukturen um den Darm (Pohl et al., 2005). Eine *FoxP1* Überexpression in *Xenopus laevis* Embryonen führt zu einer starken Reduktion der Körperachse und zu einem Verlust von Kopfstrukturen (Abbildung 11). In der embryonalen Entwicklung der Maus konnte eine *Foxp1* Expression sowohl im Lungenepithel und umliegenden Mesenchym, als auch in der Mucosa und der Tunica muscularis des embryonalen Gastrointestinaltraktes, einschließlich des Oesophagus, gezeigt werden (Lu et al., 2002; Shu et al., 2007). Weiterhin wurde eine *Foxp1* Expression im sich entwickelndem Gehirn der Maus, v.a. im Hippocampus, im Thalamus, in den Basalganglien und im zerebralen Kortex, gezeigt (Ferland et al., 3003; Tamura et al., 2003). Im Modellorganismus Zebrafisch konnte eine embryonale *foxp1* Genexpression mittels Whole Mount *in situ* Hybridisierung im Zentralen Nervensystem (v.a. Mittel-Hinterhirn-Übergang, Hinterhirn und Rückenmark), in der Retina, den Branchialbögen und im Darm gezeigt werden (Cheng et al., 2007), und entspricht damit weitgehend der räumlichen *FoxP1* Expression in der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis*. Somit reflektiert sich die Verwandtschaft der *FoxP1* Transkriptionsfaktoren der verschiedenen Spezies wie *Xenopus laevis*, Fisch und Säugetier nicht nur in der Sequenzhomologie, sondern auch in den ähnlichen räumlichen Expressionsdomänen während der embryonalen Entwicklung. Neueste Studien konnten belegen, dass der Transkriptionsfaktor *FoxP1* eine entscheidende Determinante bei der Hox-abhängigen Entwicklung der Diversität und Konnektivität von spinalen Motorneuronen spielt (Dasen et al., 2008). Eine *FoxP1* Expression im embryonalen Herzen konnte in *Xenopus laevis* nicht gezeigt werden. In der Maus, und auch im Zebrafisch, zeigt sich dagegen eine myokardiale und endokardiale Expression des Transkriptionsfaktors

FoxP1/foxp1, und Mausembryonen mit einer Mutation im *FoxP1* Gen zeigen eine kardiale Fehlentwicklung und einen frühen embryonalen Tod (Wang et al., 2004; Cheng et al., 2007).

Einen wichtigen Einblick in die Funktion des Forkhead Transkriptionsfaktors *FOXP1* gewährt die Erkenntnis, dass *FOXP1* ein Androgen-reguliertes Gen ist. Zu diesem Zwecke beinhaltet das *FOXP1* Gen eine Androgenrezeptor DNA-Bindungsstelle in einer Intronregion der Nukleotidsequenz und es reguliert den Androgenrezeptor Signalweg in Prostatakarzinom Zellen negativ (Takayama et al., 2008). Somit könnte der Forkhead Transkriptionsfaktor *FOXP1* zu der Tumorgenese von Zellen des Prostatakarzinoms beitragen. Im diffus-großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*) des Menschen konnte eine hohe *FOXP1* Expression nachgewiesen werden und in zwei Studien konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um eine Subgruppe des DLBCL mit sehr ungünstiger Prognose zu handeln (Barrans er al., 2004; Banham et al., 2005). In nachfolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass ein hohes *FOXP1* Expressionsniveau auch in Patienten mit kutanen B-Zell-Lymphomen (Kodama et al., 2005; Senff et al., 2007) oder mit MALT-Lymphomen (Sagaert et al., 2006) mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Ein Funktionsverlust des *Foxp1* Transkriptionsfaktors in der Maus führt zu einem profunden Defekt der frühen B-Zell Entwicklung, mit einem Entwicklungsstopp im Übergang von der Progenitor-B-Zelle (Pro-B) in die Prä-B-Zelle (Hu et al., 2006). So könnte zukünftig das *FoxP1* Gen in der klinischen Anwendung als unabhängiger prognostischer Faktor bei Patienten mit B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL) dienen. In diesem Zusammenhang kann vermutet werden, dass der Forkhead Transkriptionsfaktor *FOXP1* als Onkogen in der Hämatopoese fungiert. Im Gegensatz dazu wurde allerdings gezeigt, dass das *FOXP1* Gen an einem typischen Tumorsuppressor-Genort von soliden Tumoren, nämlich auf Chromosom 3p14.1, lokalisiert ist (Banham et al., 2001). Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass ein Expressionsverlust des *FOXP1* Gens in Zellen des Mammakarzinoms mit einer schlechten Prognose assoziiert zu sein scheint (Fox et al., 2004). Somit könnte dem *FOXP1* Gen in diesem Zusammenhang die Funktion eines Anti-Onkogens bzw. Tumorsuppressorgens zugeschrieben werden. Eine Erklärung für die vermeintlich gegensätzlich Hypothese, dass der Transkriptionsfaktor

FOXP1 sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressorgen auftreten kann, bietet die Entdeckung einer potenziell onkogenen, N-terminal kürzeren Splicevariante des *FOXP1* Gens in diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen (Brown et al., 2008). Um die biologische Funktion der verschiedenen *FoxP1* Splicevarianten in *Xenopus laevis* und ihren Mechanismus, durch den sie die transkriptionale Regulation beeinflussen, zu untersuchen, sind weitere experimentelle Studien erforderlich. Der Transkriptionsfaktor *FOXP1* könnte im klinischen Gebrauch zukünftig für Patienten sowohl als vorteilhafter Prognosefaktor bei Mammakarzinomen und als ungünstiger Risikofaktor bei B-Zell Lymphomen, als auch als potentielles Targetgen bei malignen Erkrankungen wie den B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen dienen.

4.3 FoxP2

Zwei cDNA Klone konnten von uns in *Xenopus laevis* als *FoxP2a* und als *FoxP2b* Varianten identifiziert werden, die zu zwei unterschiedlichen korrespondierenden Forkhead Proteinen führen. Der längere *FoxP2a* cDNA Klon beinhaltet im Gegensatz zum *FoxP2b* Transkript die Exons 1 und 2 im 5´-Bereich, ihm fehlen jedoch Exon 4 und Exon 18 (siehe Abbildung 6). Auch im Säugetier Organismus wurde über zahlreiche Splicevarianten des *FoxP2* Gens berichtet. Eine genaue Analyse der Exonstruktur zeigte, dass sich diese Splicevarianten teilweise mit denen gleichen, die wir in *Xenopus laevis* ermitteln konnten. Im Menschen ist beispielsweise ein *FOXP2* cDNA Klon beschrieben, der durch Gebrauch von zusätzlichen Leader-Exons im 5´-Bereich zu einem *downstream* lokalisierten Translationsstartsignal führt; analog zu der von uns identifizierten *FoxP2a* Variante in *Xenopus laevis*. Allerdings unterscheiden sich alle im Menschen beschriebenen *FOXP2* Varianten zu den *FoxP2* Splicevarianten aus *Xenopus laevis* durch eine ständige Präsenz des Exons Nummer 18 (Bruce und Margolis, 2002). Dieses 90 Basenpaare beinhaltende Exon konnte in *Xenopus laevis* nur in dem kürzeren *FoxP2b* Klon detektiert werden und führt zu einem Einschub aus 30 Aminosäuren in der korrespondierenden Proteinsequenz. Die funktionelle Bedeutung dieses Einschubs in der *FoxP2b* Variante ist noch ebenso ungeklärt, wie die N-terminale Verlängerung um 92 Aminosäuren in der

FoxP2a Variante. Die Charakterisierung möglicher funktioneller Domänen innerhalb dieser *FoxP2a* und *FoxP2b* Inserts könnten zukünftig Aufschluss über die Bedeutung dieser Splicevarianten des *FoxP2* Gens erbringen. Bemerkenswerterweise konnte auch die *FoxP2b* Variante mit dem um 60 Basenpaare verkürzten Exon Nummer 6 (Exon 6-), die zu einem Verlust von 20 Aminosäuren in der korrespondierenden Proteinsequenz führt (siehe Abbildung 7), sowohl in *Xenopus laevis*, als auch in *Homo sapiens* als eine Splicevariante beschrieben werden. Im Menschen konnte eine verkürzte FOXP2 Splicevariante nachgewiesen werden, der die charakteristische Forkhead-/Winged-helix DNA-Bindungsdomäne fehlt (Bruce und Margolis, 2002). Eine ähnliche Splicevariante konnten wir in *Xenopus laevis* für das Forkhead Protein FoxP1 nachweisen. Diese kurze FoxP1c Variante bricht im Leucin-Zipper Bindungsmotiv ab, und es fehlt ihr damit die komplette Forkhead-DNA-Bindungsdomäne (siehe oben).

Das in dieser Arbeit gezeigte Expressionsmuster des *FoxP2* Gens in *Xenopus laevis* ist denen sehr ähnlich, die für die Mensch, Maus und Zebrafisch Orthologen beschrieben werden. Dieses schließt die Expression in den verschiedenen Gehirnbereichen, Vorderhirn (Prosenzephalon), Mittelhirn (Mesenzephalon), Rautenhirn (Rhombenzephalon) und im Augenfeld ein (Shu et al., 2001; Ferland et al., 2003; Lai et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Teramitsu et al., 2004). Das *Foxp2/FOXP2* Gen wird im Sensiblen System im Bulbus olfactorius der adulten Maus (Ferland et al., 2003), in den unteren und oberen Zweihügeln des Mittelhirns und im Corpus geniculatum laterale und mediale des Zwischenhirns der adulten Maus und des menschlichen Embryos expremiert (Ferland et al., 2003; Lai et al., 2003). Die Expression dieses Gens wurde weiterhin in Strukturen des Limbischen Systems des fetalen und adulten Nagetiers (Lai et al., 2003; Takahashi et al., 2003) und des menschlichen Embryos gefunden (Teramitsu et al., 2004). Im Pros- bzw. späterem Telencephalon konnte eine Expression der *Foxp2* mRNA in der inneren Schicht der Kortikalplatte, sowie in mehreren Strukturen des Motorischen Systems, wie zum Beispiel im Corpus striatum, im Pallidum und im Subthalamus, sowie dem Cerebellum (Kleinhirn) und der unteren Olive in allen Spezies nachgewiesen werden (Vargha-Khadem et al., 2005; Takahashi et al., 2008 a).

Es konnte gezeigt werden, dass das menschliche *FOXP2* Gen auf dem langen Arm des Chromosom 7 (7q31) lokalisiert ist. Interessanterweise führen Mutationen in diesem Gen beim Menschen zu einer Beeinträchtigung des Spracherwerbs und des Sprechens (KE-Familie) (Lai et al., 2001; MacDermot et al., 2005). Diese Funktion des Transkriptionsfaktors *FoxP2* wird durch die Entdeckung unterstrichen, dass in juvenilen Zebrafinken eine Expression im striatalen Kernbereich, Area X, welche unverzichtbar für die Lernfähigkeit von Liedern für junge Vögeln ist, während der Zeit der Gesangsentwicklung dieser Singvögel gezeigt werden konnte (Haesler et al., 2004). Allerdings variiert in adulten Kanarienvögeln die Stärke der *FoxP2* Expression in der Area X bemerkenswerterweise saisonal (Scharff und Haesler, 2005). Die Erkenntnis, dass eine Mutation im *FOXP2* Gen beim Menschen zu einer Beeinträchtigung der Sprachentwicklung führt, suggeriert, dass der Transkriptionsfaktor *FOXP2* nicht nur in dieser neuralen Entwicklungsstörung eine Rolle spielt, sondern auch in anderen neuropsychiatrischen Störungen beteiligt sein könnte. Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass das FOXP2 Protein eine der längsten N-terminal lokalisierten Polyglutamin-Strecken (Poly-Q-Strech), kodiert durch CAG und CAA Nuklotid-Wiederholungen, des menschlichen Genoms enthält (Bruce und Margolis, 2002). In diesen Poly-Q-Wiederholungen besteht eine erhöhte Mutationsrate, die zu einer Expansion der CAG-/CAA-Basentripletts führen kann und dadurch neurodegenerative Erkrankungen wie beispielsweise Chorea Huntington und Spinozerebellare Ataxien verursacht (Koide et al., 1999; Zoghbi und Orr, 2000). Über diese Polyglutamin-Wiederholungen ist bekannt, dass sie Proteininteraktionen durch Multimerbildung oder durch Bindung an polare Aminosäuresequenzen vermitteln und dadurch an der Entstehung von transkriptionalen Multiproteinkomplexen, sogenannte Mediators, beteiligt sind (Perutz, 1994; Imafuku et al., 1998). Interessanterweise konnten in der Maus verschiedene Forkhead *FoxP1* Splicevarianten beschrieben werden, denen die Glutaminreiche Region/Poly-Q-Strech fehlen (Shu et al., 2001; Wang et al., 2003) und die damit wahrscheinlich nicht zur Vermittlung der Multiproteinkomplexe in der Lage sind. In *Xenopus laevis* konnte bei keiner der Forkhead *FoxP* Subfamilien eine Splicevariante ohne Glutaminreiche Region identifiziert werden. Um die funktionelle Bedeutung dieser um den Poly-Q-Strech

verkürzten *FoxP* Gene besser zu verstehen, sollte ein erneutes Screening einer λZAP-cDNA-Tadpole Bibliothek, gegebenenfalls mit divergierender Hybridisierungssonde, in *Xenopus laevis* erfolgen.

Wie der Transkriptionsfaktor *FoxP2* in der Entwicklung des Gehirns als Genregulator wirkt, ist bis jetzt nicht bekannt. Allerdings ist bekannt, dass sowohl *FoxP2*, als auch die anderen drei Forkhead Familienmitglieder der Subklasse P (*FoxP1*, *FoxP3* und *FoxP4*) als Repressoren der Transkription wirken können, was in Reporterkonstruktstudien in verschiedenen Zelllinien gezeigt wurde (Shu et al., 2001; Li et al., 2004). Alle Forkhead Proteine der Subfamilie P besitzen ein Leucin-Zipper Bindungsmotiv, über welches die Proteine zu einer Homo- und Heterodimerisierung befähigt sind (Wang et al., 2003; Li et al., 2004). Es liegt die Vermutung nahe, dass die transkriptionale Repression von *FoxP1*, *FoxP2* und *FoxP4*, die alle ein sich zum Teil überlappendes neurales Expressionsmuster zeigen, von synergistischen Effekten abhängt. Vielleicht ist ein relatives Gleichgewicht der verschiedenen *FoxP* Familienmitglieder entscheidend, um eine normale Entwicklung des Gehirns sicherzustellen. So könnte eine reduzierte *FoxP2* Funktion eine ausreichende Heterodimerisierung der Forkhead Transkriptionsfaktoren der Subklasse P und damit eine Aktivierung *downstream* gelegener Gene verhindern und so zu einer Fehlentwicklung des entsprechenden Gewebes führen.

Sowohl in *Xenopus laevis*, als auch in der Spezies Maus und Singvogel konnte eine *FoxP2* Expression in der Vorniere (Pronephros) nachgewiesen werden, jedoch nicht in der Spezies Zebrafisch (Shu et al., 2001; Haesler et al., 2004; Bonkowsky und Chien 2005). Eine Expression im sich entwickelnden Herzen bzw. kardiovaskulärem System, im Alveolarepithel der Lunge und in der äußeren medodermalen Schicht des embryonalen Gastrointestinaltraktes sowie in der Tunica muscularis des Oesophagus, wie sie für *foxp2* in der Maus gezeigt wurde, konnte hingegen in *Xenopus laevis* nicht beobachtet werden (Lu et al., 2002; Shu et al., 2005; Shu et al., 2007). Das *Foxp2* Gen dient in der embryonalen Lungenentwicklung der Hemmung der Expression von Genen, welche mit der Differenzierung von Lungenepithelzellen assoziiert sind. Folglich könnte *Foxp2* selbst eine wichtige Rolle in der Spezifizierung und Differenzierung der Epithelzellen der Lunge spielen (Shu et al., 2001). Die gemeinsame Expression der Transkriptionsfaktoren *Foxp1*

und *FoxP2* im embryonalen Lungengewebe und in der oesophagealen Muskelschicht der Maus veranschaulicht die funktionale Kooperativität zwischen den einzelnen Mitgliedern der Forkhead Genfamilie und weist auf ein komplexes Zusammenspiel der Forkhead Gene während der embryonalen Entwicklung hin (Shu et al., 2007).
Das Expressionsmuster von *FoxP2* im Gehirn, im Augenfeld und der Vorniere im sich entwickelndem *Xenopus laevis* Embryo legt nahe, dass dieser Tanskriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung dieser Gewebe spielt. Die Eigenschaft zur Homo- und Heterodimerisierung der Fox P Proteine und ihre potenzielle Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Co-Faktoren führt zu Möglichkeiten für komplexe Muster der Repression von möglichen Targetgenen. Die Familienmitglieder der Forkhead Subklasse P scheinen im Zentrum eines Multiproteinkomplexes zu stehen, der für die Regulation einer gewebespezifischen Genexpression verantwortlich ist (Li et al., 2004). Zukünftige Studien, die sowohl die Promotorelemente und deren Bindungsproteine als auch die *downstream* Targets von *FoxP2* charakterisieren, könnten helfen, die Rolle der *FoxP2* Gene in der Regulation der Gentranskription und Organentwicklung zu klären. Einen wichtigen Beitrag könnten dabei die erst in jüngster Vergangenheit generierte *FoxP2* Nullmutante der Maus (Shu et al., 2005) oder *Loss-of-Function* Experimente mittels *FoxP2* Morpholino-*antisense*-Oligonukleotiden in *Xenopus laevis* leisten.

4.4 FoxP3

Das es nicht gelang, einen *FoxP3* Klon in *Xenopus laevis* zu isolieren, könnte an dem höheren Grad der Divergenz dieses Gens zu der *FoxP2* Hybridisierungssonde, die zum Screenen der λZAP-cDNA-Tadpole Bibliothek eingesetzt wurde, liegen. Der phylogenetische Stammbaum der humanen Forkhead Gene zeigt, dass *FOXP1*, *FOXP2* und *FOXP4* eine relativ enge Verwandtschaft besitzen, während das Forkhead Gen der Subfamilie P3 sich evolutionär früher von der Subklasse P abspalten hat (siehe Abbildung 4). Zu überprüfen wäre zukünftig, ob sich durch Herabsetzen der Screening-Stringenz oder

durch Wahl einer weniger spezifischen Srcreeningsonde das Forkhead *FoxP3* Gen in *Xenopus laevis* identifizieren ließe.

Besonders interessant ist der Transkriptionsfaktor *FoxP3* wegen seiner Eigenschaft die Aktivität der $CD4^+$ $CD25^+$ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) zu regulieren (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003; Campbell und Ziegler, 2007) und damit eine effektive Immunantwort, vermittelt über $CD25^-$ $CD4^+$ T-Helferzellen, die durch T_{reg}-Zellen reguliert werden, nicht in eine überschießende und autoaggressive Immunreaktion übergeht. Ein therapeutischer Einsatz der immunsuppressiven Funktion von *FoxP3* wären beispielsweise bei der Behandlung von Immunerkrankungen, wie zum Beispiel der Rheumatoiden Arthritis, des Asthma bronchiale oder des Typ-I-Diabetes, oder dem Monitoring der immunsuppressiven Therapie bei Organ- oder Stammzelltransplantation denkbar. Somit wäre eine zukünftige Isolierung und Charakterisierung des Transkriptionsfaktors *FoxP3* im Modellorganismus *Xenopus laevis*, zum Zwecke weiterer Studien zur Funktion des *FoxP3* Gens mittels *Gain-of-Function* oder *Loss-of-Function* Studien, besonders bedeutsam.

4.5 FoxP4

In der vorliegenden Arbeit konnten drei verschiedene Splicevarianten des *FoxP4* Gens in *Xenopus laevis* identifiziert werden, *FoxP4a*, *FoxP4b* und *FoxP4c*. Alle drei isolierten *FoxP4* Varianten kodieren für das gleiche, 641 Aminosäuren lange, Forkhead Protein und unterscheiden sich nur durch ihre ersten nicht-kodierenden Exons. In der Maus konnte bisher ein *Foxp4* Gen nachgewiesen werden, das aus 16 Exons besteht, und dessen Aminosäuresequenz mit einer Länge von 685 Aminosäuren eine ähnliche Größe aufweist, wie sein *Xenopus* Ortholog (Lu et al., 2002). Das *Foxp4* Gen in der Maus enthält an charakteristischer Stelle die Forkhead-/Winged-helix DNA-Bindungsdomäne, sowie einen C_2H_2-Zinkfinger. Im sich entwickelnden Mausembryo konnte *Foxp4* im Darmepithel und im Epithel der sich entwickelnden Lunge (Teufel et al., 2003) sowie in der intermediären Zone des Isokortex und den umliegenden Zellen (Lu et al., 2002) nachgewiesen werden. Die *FoxP4* Expression in *Xenopus laevis* wird vor allem in Domänen des Gehirns (Vorder-

, Mittel- und Hinterhirn) und in Kopfstrukturen, wie dem Auge und den Branchialbögen (Schlundbögen), sichtbar (siehe Abbildung 15). Die Eigenschaft der FoxP4, FoxP2 und FoxP1 Proteine bei der transkriptionalen Regulation durch Homo- und Heterodimerisierung und ihre zum Teil überlappende neurale Expression im sich entwickelnden Gehirn suggerieren, dass jedes Forkhead Familienmitglied der Subklasse P, beziehungsweise die verschiedensten Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen FoxP1, FoxP2 und FoxP4 Proteine, eine zentrale Rolle in der Regulation der Gehirnentwicklung spielen (Takahashi et al., 2008 b). In der adulten Maus wurden *Foxp4* Transkripte im Herzen, im Gehirn, in der Milz, in Lunge und Leber, in der Niere und in den Hoden gefunden (Teufel et al., 2003). Während in der räumlichen Expression der verschiedenen *FoxP4* Splicevarianten in der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* keine Unterschiede in den Expressionsdomänen festgestellt werden konnten, zeigt sich sehr wohl eine unterschiedliche zeitliche Transkriptionsaktivität dieser *FoxP4* Gene. Dabei wird die *FoxP4a* Variante durchgängig von Entwicklungsstadium 1 bis 45 in progredienter Stärke exprimiert, während das *FoxP4b* Transkript erst ab Stadium 11, und das *FoxP4c* Transkript ab Entwicklungsstadium 25 eine schwach sichtbare Expression zeigt (siehe Abbildung 14). Alle *FoxP4* Splicevarianten steigern ihre Expressionsstärke bis zum Erreichen des Entwicklungsstadiums 45 in *Xenopus laevis*. Diese Daten weisen darauf hin, dass die unterschiedlichen *FoxP4* Varianten zu verschiedenen Zeitpunkten in die embryonale Transkription eingreifen und in höheren Stadien auch eine Co-Expression aus verschiedenen *FoxP4* Splicevarianten stattfindet. Die biologische Funktion dieser drei Splicevarianten der Forkhead Transkriptionsfaktoren-Familie *FoxP4* in *Xenopus laevis* ist weiterhin unbekannt.

Teufel konnte im Jahr 2003 eine signifikante Reduktion der *FOXP4* Expression bei Patienten mit Nierentumoren zeigen (Teufel et al., 2003), was auf eine Schlüsselfunktion des Transkriptionsfaktors *FOXP4* in der Pathogenese von Nierenzellkarzinomen hindeutet. Somit wäre es denkbar, dass *FOXP4* als Tumorsuppressorgen/Anti-Onkogen in soliden Tumoren fungiert und eine Reduktion beziehungsweise ein Verlust der *FOXP4* Transkription zu einer exzessiven Proliferation mit dem Ergebnis eines erhöhten Risikos der Tumorentstehung führen könnte. Weitere Studien mittels *Knock-down* Versuchen im

Modellorganismus *Xenopus laevis*, beziehungsweise *Knock-out* Versuchen in der Maus, könnten diese Hypothese stützen. Weitere klinisch-statistische Studien könnten zukünftig Aufschluss darüber geben, ob das Ausmaß der *FOXP4* Expression einen Einfluss auf die Prognose der an Nierenzellkarzinom erkrankten Patienten besitzt. Weiterhin wäre zu untersuchen, ob die verschiedenen Forkhead *FoxP4* Splicevarianten eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung besitzen, und wie diese Gene im komplexen Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren und der Balance zwischen transkriptionaler Aktivation und Repression beteiligt sind.

4.6 Aussichten

Da die Forkhead Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle in der Embryogenese, der Gewebsdifferenzierung und der Karzinogenese spielen, können Mutationen dieser Gene zu den verschiedensten Funktionsstörungen und zu der Entstehung von malignen Erkrankungen führen. Zukünftig sollte im Detail untersucht werden, auf welche Weise die Forkhead Transkriptionsfaktoren an embryonalen Entwicklungsschritten und Differenzierungsprozessen beteiligen sind und wie sie in der regulatorischen Kaskade der Transkriptionsfaktoren, die zur Differenzierung und Spezifizierung der Gewebe führen, integriert sind. Dazu sollte die Analyse von Expressionsmustern, genetische Alterationen und epigenetischen Veränderungen, sowie die Charakterisierung von Bindungsproteinen, Co-Faktoren und potenziellen Targetgenen der Forkhead Transkriptionsfaktoren für jedes Familienmitglied umfassend untersucht werden. Somit können neue therapeutische und gegebenenfalls auch präventive Maßnahmen bei menschlichen Erkrankungen, wie beispielsweise (Auto-) Immunerkrankungen oder malignen Erkrankungen, entwickelt werden.

5. Zusammenfassung

Evolutionär konservierte Fox (*Forkhead box*) Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei vielen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen. Darüber hinaus haben sie eine zentrale Rolle in der Immunregulation und in der Pathogenese verschiedener immunologischer Störungen. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Identifizierung und Charakterisierung mehrerer Mitglieder der Fox Subklasse P in *Xenopus laevis*. DNA-Datenbankanalysen und das Screening einer λZAP-cDNA-Tadpole Bibliothek führten zur Isolierung von insgesamt sieben unterschiedlichen *FoxP* cDNA Klonen. Diese *FoxP* Varianten erwiesen sich als Splicevarianten des *FoxP1* Gens (*FoxP1b* und *FoxP1c*), des *FoxP2* Gens (*FoxP2a* und *FoxP2b*) und des *FoxP4* Gens (*FoxP4a*, *FoxP4b* und *FoxP4c*). Für die *FoxP1b* Variante konnte mittels GST-Pulldown Assay gezeigt werden, dass durch den Gebrauch eines zusätzlichen Exons (Exon 13) die Bindungsstelle des Co-Repressors CtBP1 (*C-terminal binding protein 1)* unterbrochen wird und dadurch dieses Protein nicht mehr an *FoxP1b* binden kann. Der verkürzten *FoxP1c* Variante fehlt durch Verwendung einer alternativen Splicesite die komplette Forkhead-/Winged-helix DNA-Bindungsdomäne. Die beiden *FoxP2* Transkripte unterscheiden sich darin, dass die *FoxP2a* Variante im 5´-Bereich zwei zusätzliche Exons enthält (Exon 1 und 2), ihr dafür aber Exon 4 und 18 fehlen, die der *FoxP2b* Klon einschließt, und der Gebrauch einer alternativen 3´-Splicestelle im *FoxP2b* Gen, was zu einem verkürzten Exon 6- führt und in der korrespondierenden Proteinsequenz einen Verlust von 20 Aminosäuren zur Folge hat. Die drei *FoxP4* cDNA Varianten unterscheiden sich jeweils in ihrem ersten nicht-kodierenden Exon. Das zeitliche und räumliche Expressionsmuster der *FoxP* Gene während der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* wurde mittels RT-PCR und Whole Mount *in situ* Hybridisierung analysiert. Die *FoxP1b* und die *FoxP1* Varianten zeigen eine identische zeitliche Expression. Beide Varianten werden maternal transkribiert, während der Neurulation nehmen die RNA-Transkripte ab, bis die zygotische Transkription in der Organogenese wieder einsetzt. Im Gegensatz dazu kann das *FoxP1c* Transkript erst ab dem Tadpole-Stadium nachgewiesen werden. Die räumliche Expression

der *FoxP1b* und *FoxP1c* Varianten entspricht der, des aus der Literatur bekannten *FoxP1* Expressionsmusters. Um einen *Gain-of-Function* zu bewirken, wurde *FoxP1* mRNA in die dorsalen Blastomeren eines *Xenopus laevis* Embryos im Vier-Zell-Stadium injiziert. Die sich entwickelnden Embryonen zeigten eine starke Reduktion der Körperachse und einen Verlust der Kopfstrukturen. Die Injektion von *FoxP1* mRNA in die ventralen Blastomeren des *Xenopus laevis* Embryos und *FoxP1b Loss-of-Function* Experimente mittels Morpholino-*antisense*-Oligonukleotiden erbrachten keinen signifikanten Phänotyp. Die zeitliche Expression des *FoxP2a* Gens beginnt im Midgastrula-Stadium, die des *FoxP2b* Gens erst während der Neurulation, und die Transkripte akkumulieren bis zum späten Tadpole-Stadium. *FoxP2* Transkripte befinden sich im Pronephros, den Branchialbögen, der Retina, der Schwanzspitze und in distinkten Hirnregionen, wie dem Prosenzephalon, dem Mesenzephalon und dem Rhombenzephalon. Das *FoxP4a* Transkript wird bereits maternal exprimiert. Gemeinsam mit dem *FoxP4b* Transkript konnte eine progrediente Zunahme der Expression während der Gastrulation und der Neurulation nachgewiesen werden. Alle drei isolierten *FoxP4* Varianten werden im Tadpole-Stadium exprimiert. *FoxP4* Transkripte befinden sich in der anterioren Neuralfalte, dem Pros-, Mes- und Rhombenzephalon, der Retina, den Branchialbögen und im Pankreas des *Xenopus laevis* Embryos. Die Funktion der Proteine in diesen Strukturen muss in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Adama CC, Workman JL: Nucleosome Displacement in Transcription. Cell 72: 305-308 (1993)
2. Alvarez B, Martinez AC, Burgering BM, Carrera AC: Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. Nature 413: 744-747 (2001)
3. Andel F 3rd, Ladurner AG, Inouye C, Tjian R, Nogales E: Three-dimensional structure of the human TFIID-IIA-IIB complex. Science 286: 2153-2156 (1999)
4. Aparicio S: Exploding vertebrate genomes. Nature Genet 18: 301-303 (1998)
5. Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN: The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 10148-10152 (1991)
6. Banham AH, Beasly N, Campo E, Fernandez PL, Fidler C, Gatter K, Jones M, Mason DY, Prime JE, Trougouboff P, Wood K, Cordell JL: The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. Cancer Res 61: 8820-8829 (2001)
7. Barnes PJ: Nuclear factor-kappa B. Int J Biochem Cell Biol 29: 867-870 (1997)
8. Barrans SL, Fenton JA, Banham A, Owen RG, Jack AS: Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. Blood 104: 2933-2935 (2004)
9. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD: The immune dysregulation, polyendocrinopathy,enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet 27: 20-21 (2001)
10. Birnboim HC, Dolly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523 (1979)
11. Boehm T, Bleul CC, Schorpp M: Genetic dissection of thymus development in mouse and zebrafish. Immunol Rev 195: 15-27 (2003)
12. Bonkowsky JL, Chien CB: Molecular cloning and developmental expression of foxP2 in zebrafish. Dev Dyn 234: 740-746 (2005)
13. Brandenberger R, Wei H, Zhang S, Lei S, Murage J, Fisk GJ, Li Y, Xu C, Fang R, Guegler K, Rao MS, Mandalam R, Lebkowski J, Stanton LW: Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. Nat Biotech 6: 707-716 (2004)
14. Brennan RG: The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. Cell 74: 773-776 (1993)
15. Brice G, Mansour S, Bell R, Collin JR, Child AH, Brady AF, Sarfarazi M, Burnand KG, Jeffery S, Mortimer P, Murday VA: Analysis of the phenotypic abnormalities in lymphoedema-distichiasis syndrom in 74 patients with FOXC2 mutations or linkage to 16q24. J Med Genet 39: 478-483 (2002)

16. Brown PJ, Ashe SL, Leich E, Burek C, Barrans S, Fenton JA, Jack AS, Pulford K, Rosenwald A, Banham AH: Potentially oncogenic B-cell activation-induced smaller isoforms of FOXP1 are highly expressed in the activated B cell-like subtype of DLBCL. Blood 111: 2816-2824 (2008)
17. Bruce HA, Margolis RL: FOXP2: novel exons, splice variants and CAG repeat length stability. Hum Genet 111: 136-144 (2002)
18. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME: Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell 96: 857-868 (1999)
19. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F: Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet 27: 68-73 (2001)
20. Burgering BM, Kops GJPL: Cell cycle and death control: long live Forkheads. Trends Biochem Sci 27: 352-360 (2002)
21. Burke TW, Kadonaga JT: Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. Genes Dev 10: 711-724 (1996)
22. Campbell DL, Ziegler SF: FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. Nat Rev Immunol 7: 305-310 (2007)
23. Carlsson P, Mahlapuu M: Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. Dev Biol 250: 1-23 (2002)
24. Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Léger J, Lyonnet S, Pelet A, Czernichow P, Chatterjee K, Polak M: A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. Hum Mol Genet 11: 2051-2059 (2002)
25. Cederberg A, Grønning LM, Ahrén B, Taskén K, Carlsson P, Enerbäck S: FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. Cell 106: 563-573 (2001)
26. Chalita TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, Bowcock AM: JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic disregulation syndrome. J Clin Invest 106: R75-R81 (2000)
27. Chen FE, Ghosh G: Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. Oncogene 18: 6845-6852 (1999)
28. Cheng L, Chong M, Fan W, Guo X, Zhang W, Yang X, Liu F, Gui Y, Lu D: Molecular cloning, characterization, and developmental expression of foxp1 in zebrafish. Dev Genes Evol 217: 699-707 (2007)
29. Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK: Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. Nature 364: 412-420 (1993)
30. Clarke ND, Berg JM: Zinc fingers in Caenorhabditis elegans: finding families and probing pathways. Science 282: 2018-2022 (1998)
31. Coffer PJ, Burgering BM: Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. Nat Rev Immunol 4: 889-899 (2004)

32. Costa RH, Grayson DR, Darnell, JE: Multiple hepatocyteenriched nuclear factors function in the regulation of transthretin and alpha-1 antitrypsin genes. Mol Cell Biol 9: 1415-1425 (1989)
33. Cramer P, Bushnell DA, Fu J, Gnatt AL, Maier-Davis B, Thompson NE, Burgess RR, Edwards AM, David PR, Kornberg RD: Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. Science 288: 640-649 (2000)
34. Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G: The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. Nat Genet 27: 159-166 (2001)
35. Darnell JE Jr: RNA. Sci Am 253: 68-78 (1985)
36. Dasen JS, De Camilli A, Wang B, Tucker PW, Jessell TM: Hox repertoires for motor neuron diversity and connectivity gated by a single accessory factor, FoxP1. Cell134: 304-316 (2008)
37. Dawid IB: Intercellular signaling and gene regulation during early embryogenesis of Xenopus laevis. J Biol Chem 269: 6259-6262 (1994)
38. De Baere E, Dixon MJ, Small KW, Jabs EW, Leroy BP, Devriendt K, Gillerot Y, Mortier G, Meire F, Van Maldergem L, Courtens W, Hjalgrim H, Huang S, Liebaers I, Van Regemorter N, Touraine P, Praphanphoj V, Verloes A, Udar N, Yellore V, Chalukya M, Yelchits S, De Paepe A, Kuttenn F, Fellous M, Veitia R, Messiaen L: Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype--phenotype correlation. Hum Mol Genet 10: 1591-1600 (2001)
39. De Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B: CD4+CD25(bright) regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. J Immunol 172: 6435-6443 (2004)
40. Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, Coffer PJ: FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. J Cell Biol 156: 531-542 (2002)
41. Dirksen ML, Jamrich M: Differential expression of fork head genes during early Xenopus and zebrafish development. Dev Genet 17: 107-116 (1995)
42. Dugaiczyk A, Boyer HW, Goodman HM: Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. J Mol Biol 96: 171-176 (1975)
43. Dynan WS, Tjian R: Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. Nature 316: 774-778 (1985)
44. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C: Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFα therapy. J Exp Med 200: 277-285 (2004)

45. Eickbush TH, Moudrianakis EN: The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids. Cell 13: 295-306 (1978)
46. Erickson RP, Dagenais SL, Caulder MS, Downs CA, Herman G, Jones MC, Kerstjens-Frederikse WS, Lidral AC, McDonald M, Nelson CC, Witte M, Glover TW: Clinical heterogeneity in lymphoedema-distichiasis with FOXC2 truncating mutations. J Med Genet 38: 761-766 (2001)
47. Fang J, Dagenais SL, Erickson RP, Arlt MF, Glynn MW, Gorski JL, Seaver LH, Glover TW: Mutations in FOXC2 (MFH-1), a forkhead family transcription factor, are responsible for the hereditary lymphedema-distichiasis syndrome. Am J Hum Genet 67: 1382-1388 (2000)
48. Ferland RJ, Cherry TJ, Preware PO, Morrisey EE, Walsh CA: Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. J Comp Neurol 460: 266-279 (2003)
49. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol 4: 330-336 (2003)
50. Fox SB, Brown P, Han C, Ashe S, Leek RD, Harris AL, Banham AH : Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated with estrogen receptor alpha and improved survival in primary human breast carcinomas. Clin Cancer Res 10: 3521-3527 (2004)
51. Frank J, Pignata C, Panteleyev AA, Prowse DM, Baden H, Weiner L, Gaetaniello L, Ahmad W, Pozzi N, Cserhalmi-Friedman PB, Aita VM, Uyttendaele H, Gordon D, Ott J, Brissette JL, Christiano AM: Exposing the human nude phenotype. Nature 398: 473-474 (1999)
52. Friedle H, Rastegar S, Paul H, Kaufmann E, Knöchel W: Xvent-1 mediates BMP-4-induced suppression of the doral-lip-specific early response gene XFD-1´ in Xenopus embryos. Embo J 17: 2298-2307 (1998)
53. Friedle H, Knöchel W: Cooperative interaction of Xvent-2 and GATA-2 in the activation of the ventral homeobox gene Xvent-1B. J Biol Chem 277: 23872-23881 (2002)
54. Frohman MA, Dush MK, Martin GR: Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 8998-9002 (1988)
55. Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ 3rd, Emanuel BS, Rovera G, Barr FG: Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. Nat Genet 5: 230-235 (1993)
56. Gehring W, Affolter M, Bürglin T: Homeodomain proteins. Annu Rev Biochem 63: 487-526 (1994)
57. Geiduschek EP, Gray I: Non-aqueous solutions of sodium deoxyribose-nucleate. J Am Chem Soc 78: 879-880 (1956)
58. Geiduschek EP, Tocchini-Valentini GP: Transcription by RNA polymerase III. Annu Rev Biochem 57: 873-914 (1988)
59. Gilbert SF: Life Cycles and the Evolution of Developmental Patterns. In: Gilbert SF (Hrsg) Developmental Biology, Eighth Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Chapter 2, S. 26-31 (2006)

60. Gilley J, Coffer PJ, Ham J: FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. J Cell Biol 162: 613-622 (2003)
61. Gould DB, Mears AJ, Pearce WG, Walter MA: Autosomal dominant Axenfeld-Rieger anomaly maps to 6p25. Am J Hum Genet 61: 765-768 (1997)
62. Greenblatt J: RNA polymerase-associated transcription factors. Trends Biochem Sci 16: 408-411 (1991)
63. Greer EL, Brunet A: FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. Oncogene 24: 7410-7425 (2005)
64. Grunstein M: Histones as Regulators of Genes. Scientific American X: 40-47 (1992)
65. Haesler S, Wada K, Nshdejan A, Morrisey EE, Lints T, Jarvis ED, Scharff C: FoxP2 expression in avian vocal learners and non-learners. J Neurosci 24: 3164-3175 (2004)
66. Haesmann J: Patterning the Xenopus blastula. Development 124: 4179-4191 (1997)
67. Harland RM: In situ hybridization: an improved whole-mount method for Xenopus embryos. Methods Cell Biol 36: 685-695 (1991)
68. Harland RM, Gerhart J: Formation and function of Spemann's organizer. Annu Rev Cell Dev Biol 13: 611-667 (1997)
69. Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Aittomäki K, Shelling AN: Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. Mol Hum Reprod 8: 729-733 (2002)
70. Häcker U, Kaufmann E, Hartmann C, Jürgens G, Knöchel W, Jäckle H: The Drosophila fork head domain protein crocodile is required for the establishment of head structures. Embo J 14: 5306-5317 (1995)
71. Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA: AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. Blood 90: 3714-3719 (1997)
72. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 299: 1057-1061 (2003)
73. Hu H, Wang B, Borde M, Nardone J, Maika S, Allred L, Tucker PW, Rao A: Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. Nat Immunol 7: 819-826 (2006)
74. Imafuku I, Waragai M, Takeuchi S, Kanazawa I, Kawabata M, Mouradian MM, Okazawa H: Polar amino acid-rich sequences bind to polyglutamine tracts. Biochem Biophys Res Commun 253: 16-20 (1998)
75. Jackson DA, Pombo A, Iborra F: The balance sheet for transcription: an analysis of nuclear RNA metabolism in mammalian cells. FASEB J 14: 242-254 (2000)
76. Johnson PH, Grossman LI: Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. Biochemistry 16: 4217-4225 (1977)
77. Jonsson H, Peng SL: Forkhead transcription factors in immunologie. Cell Mol Life Sci 62: 397-409 (2005)

78. Jürgens G, Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, Kluding H: Mutation affecting the pattern of larval cuticle in Drosophila melanogaster. Roux's Arch Dev Biol 193: 283-295 (1984)
79. Kaestner KH, Knöchel W, Martinez DE: Unifield nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. Genes Dev 14: 142-146 (2000)
80. Kass SU, Pruss D, Wolffe AP: How does DNA methylation repress transcription? Trends Genet 13: 444-449 (1997)
81. Katoh M, Katoh M: Human FOX gene family. Int J Oncol 25: 1495-1500 (2004)
82. Kaufmann E, Müller D, Knöchel W: The interaction of DNA with the DNA-binding domain encoded by the Drosophila gene fork head. Eur J Biochem 223: 329-337 (1995)
83. Kaufmann E, Knöchel W: Five years on the wings of fork head. Mech Dev 57: 23-20 (1996)
84. Kessler DS, Melton DA: Vertebrate embryonic induction: mesodermal and neural patterning. Science 266: 594-604 (1994)
85. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F: An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. Nat Immunol 4: 337-342 (2003)
86. Khoury G, Gruss P: Enhancer elements. Cell 33: 313-314 (1983)
87. Knöchel S, Lef J, Clement J, Klocke B, Hille S, Köster M, Knöchel W: Activin A induced expression of a fork head related gene in posterior chordamesoderm (notochord) of Xenopus laevis embryos. Mech Dev 38: 157-165 (1992)
88. Kodama K, Massone C, Chott A, Metze D, Kerl H, Cerroni L: Primary cutaneous large B-cell lymphomas: clinicopathologic features, classification, and prognostic factors in a large series of patients. Blood 106: 2491-2497 (2005)
89. Koide R, Kobayashi S, Shimohata T, Ikeuchi T, Maruyama M, Saito M, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S: A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? Hum Mol Gen 8: 2047-2053 (1999)
90. Kronberg RD, Lorch Y: Chromatin Structure and Transcription, Annu Rev Cell Biol 8: 563-587 (1992)
91. Kronberg RD: Eukaryotic transcriptional control. Trends Cell Biol 9: 46-49 (1999)
92. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)
93. Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Khadem F, Monaco AP: A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. Nature 413: 519-523 (2001)
94. Lai CS, Gerrelli D, Monaco AP, Fisher SE, Copp AJ: FOXP2 expressing during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. Brain 126: 2455-2463 (2003)
95. Lai E, Prezioso VR, Smith E, Litvin O, Costa RH, Darnell JE: HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. Genes Dev 4: 1427-1436 (1990)
96. Lai E, Prezioso VR, Tao WF, Chen WS, Darnell JE: Hepatocyte nuclear factor 3α belongs to a gene family in mammals that is homologous to the Drosophila homeotic gene fork head. Genes Dev 5: 416-427 (1991)

97. Lang JC, Spandidos DA: The structure and function of eukaryotic enhancer elements and their role in oncogenesis. Anticancer Res 6: 437-449 (1986)
98. Lantz KA, Vatamaniuk MZ, Brestelli JE, Friedman JR, Matschinsky FM, Kaestner KH: Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. J Clin Invest 114: 512-520 (2004)
99. Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS: Fox's in development and disease. Trends Genet 19: 339-344 (2003)
100. Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villen J, Becker EB, DiBacco S, de la Iglesia N, Gygi S, Blackwell TK, Bonni A: A conserved MSTFOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. Cell 125: 987-1001 (2006)
101. Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG: Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. J Biol Chem 273: 28545-28548 (1998)
102. Li S, Weidenfeld J, Morrisey EE: Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. Mol Cell Biol 24: 809-822 (2004)
103. Lin L, Miller CT, Contreras JI, Prescott MS, Dagenais SL, Wu R, Yee J, Orringer MB, Misek DE, Hanash SM, Glover TW, Beer DG: The hepatocyte nuclear factor 3 alpha gene, HNF3alpha (FOXA1), on chromosome band 14q13 is amplified and overexpressed in esophageal and lung adenocarcinomas. Cancer Res 62: 5273-5279 (2002)
104. Lin L, Spoor MS, Gerth AJ, Brody SL, Peng SL: Modulation of Th1 activation and inflammation by the NF-kappaB repressor Foxj1. Science 303: 1017-1020 (2004)
105. Loser K, Hansen W, Apelt J, Balkow S, Buer J, Beissert S: In vitro-generated regulatory T cells induced by Foxp3-retrovirus infection control murine contact allergy and systemic autoimmunity. Gene Ther 12: 1294-1304 (2005)
106. Lu MM, Li S, Yang H, Morrisey EE: Foxp4: a novel member of the Foxp subfamily of winged-helix genes co-expressed with Foxp1 and Foxp2 in pulmonary and gut tissues. Mech Dev 119: 197-202 (2002)
107. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature 389: 251-260 (1997)
108. MacDermot KD, Bonora E, Sykes N, Coupe AM, Lai CS, Vernes SC, Vargha-Khadem F, McKenzie F, Smith RL, Monaco AP, Fisher SE: Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. Am J Hum Genet 76: 1074-1080 (2005)
109. Maniatis T, Goodbourn S, Fischer JA: Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. Science 236: 1237-1245 (1987)
110. Maruyama K, Sugano S: Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. Gene 138: 171-174 (1994)
111. McKnight S, Tjian R: Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. Cell 46: 795-805 (1986)

112. Mears AJ, Mirzayans F, Gould DB, Pearce WG, Walter MA: Autosomal dominant iridogoniodysgenesis anomaly maps to 6p25. Am J Hum Genet 59: 1321-1327 (1996)
113. Mears AJ, Jordan T, Mirzayans F, Dubois S, Kume T, Parlee M, Ritch R, Koop B, Kuo WL, Collins C, Marshall J, Gould DB, Pearce W, Carlsson P, Enerbäck S, Morissette J, Bhattacharya S, Hogan B, Raymond V, Walter MA: Mutations of the forkhead/winged-helix gene, FKHL7, in patiens with Axenfeld-Rieger anomaly. Am J Hum Genet 63: 1316-1328 (1998)
114. Mitchell PJ, Tjian R: Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. Science 245: 371-378 (1989)
115. Morris BJ: A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer. J Hypertens 23: 1285-1309 (2005)
116. Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335-350 (1987)
117. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, Hartono C, Li B, Sharma VK, Seshan SV: Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. N Engl J Med 353: 2342-2351 (2005)
118. Nakamuta T, Furukawa Y, Nakagawa H, Tsunoda T, Ohigashi H, Murata K, Ishikawa O, Ohgaki K, Kashimura N, Miyamoto M, Hirano S, Kondo S, Katoh H, Nakamura Y, Katagiri T: Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. Oncogene 23: 2385-2400 (2004)
119. Nehls M, Pfeiffer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T: New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. Nature 372: 103-107 (1994)
120. Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschutz R, Schuddekopf K, Smith AJ, Boehm T: Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. Science 272: 886-889 (1996)
121. Nelson DL, Cox MM: Regulation der Genexpression. In: Nelson DL, Cox MM (Hrsg) Lehninger Biochemie, 3. Aufl, Springer, Berlin Heidelberg New York, Kapitel 28, S. 1169-1217 (2005)
122. Newport J, Kirschner M: A major developmental transition in early Xenopus embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. Cell 30: 675-686 (1982)
123. Nieuwkoop PD, Faber J: Normal table of Xenopus laevis (Daudin), 2nd ed. Elsevier/North Holland, Amsterdam (1967)
124. Nieuwkoop PD: The organization center of the amphibian embryo: its origin, spatial organization, and morphogenetic action. Adv Morphog 10: 1-39 (1973)
125. Nolte RT, Conlin RM, Harrison SC, Brown RS: Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 2938-2943 (1998)
126. Novina CD, Roy AL: Core promoters and transcriptional control. Trends Genet 12: 351-355 (1996)

127. Ogbourne S, Antalis TM: Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. Biochem J 331: 1-14 (1998)
128. Ormestad M, Blixt A, Churchill A, Martinsson T, Enerbäck S, Carlsson P: Foxe3 haploinsufficiency in mice: a model for Peters' anomaly. Ophthalmol Visual Sci 43: 1350-1357 (2002)
129. Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D: The general transcription factors of RNA polymerase II. Genes Dev 10: 2657-2683 (1996)
130. Overdier DG, Porcella A, Costa RH: The DNA-binding specifity of the hepatocyte nuclear factor3/fork head domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix. Mol Cell Biol 14: 2755-2766 (1994)
131. Parry P, Wei Y, Evans G: Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. Genes Chromosomes Cancer 11: 79-84 (1994)
132. Perutz M: Polar zippers: their role in human disease. Protein Sci 3: 1629-1637 (1994)
133. Pierrou S, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerbäck S, Carlsson P: Cloning and characterization of seven human fork head proteins: binding site specifity and DNA bending. Embo J 1354: 5002-5012 (1994)
134. Pignata C, Gaetaniello L, Masci AM, Frank J, Christiano A, Matrecano E, Racioppi L: Human equivalent of the mouse Nude/SCID phenotype: long-term evaluation of immunologic reconstitution after bone marrow transplantation. Blood 97: 880-885 (2001)
135. Pohl BS, Knöchel W: Overexpression of the transcriptional repressor FoxD3 prevents neural crest formation in Xenopus embryos. Mech Dev 103: 93-106 (2001)
136. Pohl BS, Knöchel W: Of Fox and Frogs: Fox (fork head/winged helix) transcription factors in Xenopus development. Gene 344: 21-32 (2004)
137. Pohl BS, Rössner A, Knöchel W: The Fox gene family in Xenopus laevis: FoxI2, FoxM1 and FoxP1 in early development. Int J Dev Biol 49: 53-58 (2005)
138. Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A, Donovan A, Egan ES, Force A, Gong Z, Goutel C, Fritz A, Kelsh R, Knapik E, Liao E, Paw B, Ransom D, Singer A, Thomson M, Abduljabbar TS, Yelick P, Beier D, Joly JS, Larhammar D, Talbot WS: Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. Nature Genet 18: 345-349 (1998)
139. Prakken BJ, Samodal R, Le TD, Giannoni F, Yung GP, Scavulli J, Amox D, Roord S, de Kleer I, Bonnin D, Lanza P, Berry C, Massa M, Billetta R, Albani S: Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci USA 101: 4228-4233 (2004)
140. Ptashne M: How eukaryotic transcriptional activators work. Nature 335: 683-689 (1988)
141. Real PJ, Benito A, Cuevas J, Berciano MT, de Juan A, Coffer P, Gomez-Roman J, Lafarga M, Lopez-Vega JM, Fernandez-Luna JL: Blockade of epidermal growth factor receptors chemosensitizes breast cancer cells through up-regulation of Bnip3L. Cancer Res 65: 8151-8157 (2005)

142. Roeder RG: The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. Trends Biochem Sci 21: 327-335 (1996)
143. Sagaert X, de Paepe P, Libbrecht L, Vanhentenrijk V, Verhoef G, Thomas J, Wlodarska I, De Wolf-Peeters C: Forkhead box protein P1 in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas predicts poor prognosis and transformation to diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol 24: 2490-2497 (2006)
144. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354 (1985)
145. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature 234: 163-166 (1986)
146. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH Jr, Erlich HA: Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. N Engl J Med 319: 537-541 (1988)
147. Saltzman AG, Weinmann R: Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription. FASEB J 3: 1723-1733 (1989)
148. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
149. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74: 5463-5467 (1977)
150. Schaefer BC: Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. Anal Biochem 227: 255-273 (1995)
151. Scharff C, Haesler S: An evolutionary perspective on FoxP2: strictly for the birds? Curr Opin Neurobiol 15: 694-703 (2005)
152. Schön C, Wochnik A, Rössner A, Donow C, Knöchel W: The FoxP subclass in Xenopus laevis development. Dev Genes Evol 216: 641-646 (2006)
153. Semina EV, Brownell I, Mintz-Hittner HA, Murray JC, Jamrich M: Mutations in the human forkhead transcription faktor FOXE3 associated with anterior segment ocular dysgenesis and cataracts. Hum Mol Genet 10: 231-236 (2001)
154. Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM, Vermeer MH, van Baarlen J, Blokx WA, Canninga-van Dijk MR, Geerts ML, Hebeda KM, Kluin PM, Lam KH, Meijer CJ, Willemze R: Reclassification of 300 primary cutaneous B-Cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. J Clin Oncol 25: 1581-1587 (2007)
155. Shen W, Scearce LM, Brestelli JE, Sund NJ, Kaestner KH: Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast. J Biol Chem 276: 42812-42817 (2001)
156. Shi C, Zhang X, Chen Z, Sulaiman K, Feinberg MW, Ballantyne CM, Jain MK, Simon DI: Integrin engagement regulates monocyte differentation though the forkhead transcription factor Foxp1. J Clin Invest 114: 404-418 (2004)

157. Shiyanova T, Liao X: The dissociation rate of a winged helix protein-DNA complex is influenced by non-DNA contact residues. Arch Biochem Biophys 362: 356-362 (1999)
158. Shu W, Yang H, Zhang L, Lu MM, Morrisey EE: Characterization of a new subfamily of winged-helix/forkhead (Fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors. J Biol Chem 276: 27488-27497 (2001)
159. Shu W, Cho JY, Zhang M, Weisz D, Elder GA, Schmeidler J, De Gasperi R, Sosa MA, Rabidou D, Santucci AC, Perl D, Morrisey E, Buxbaum JD: Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the FoxP2 gene. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 9643-9648 (2005)
160. Shu W, Lu MM, Zhang Y, Tucker PW, Zhoe D, Morrisey EE: Foxp2 and Foxp1 cooperatively regulate lung and esophagus development. Development 134: 1991-2000 (2007)
161. Slack JMW: The nature of the mesoderm-inducing signal in Xenopus: a transfilter induction study. Development 113: 661-669 (1991)
162. Smith HO, Wilcox KW: A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties. J Mol Biol. 51: 379-391 (1970)
163. Smith JC, Slack JM: Dorsalization and neural induction: properties of the organizer in Xenopus laevis. J Embryol Exp Morphol 78: 299-317 (1983)
164. So CW, Cleary ML: MLL-AFX requires the transcriptional effector domains of AFX to transform myeloid progenitors and transdominantly interfere with forkhead protein function. Mol Cell Biol 22: 6542-6552 (2002)
165. So CW, Cleary ML: Common mechanism for oncogenic activation of MLL by forkhead family proteins. Blood 101: 633-639 (2003)
166. Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, Bridge JA, Crist WM, Triche TJ, Barr FG: PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. J Clin Oncol 20: 2672-2679 (2002)
167. Southern E: Gel electrophoresis of restriction fragments. Methods Enzymol 68: 152-176 (1979)
168. Spemann H, Mangold H: Über die Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. Roux´s Arch Entw Mech 100: 599-638 (1924)
169. Sullivan SA, Akers L, Moody SA: FoxD5a, a Xenopus winged helix gene, maintains an immature neural ectoderm via transcriptional repression that is dependent on the C-terminal domain. Dev Biol 232: 439-457 (2001)
170. Summerton J, Weller D: Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7: 187-195 (1997)
171. Takahashi K, Liu FC, Hirokawa K, Takahashi H: Expression af Foxp2, a gene involved in speech and language, in the developing and adult striatum. J Neurosci Res 73: 61-72 (2003)
172. Takahashi K, Liu FC, Oishi T, Mori T, Higo N, Hayashi M, Hirokawa K, Takahashi H: Expression of FOXP2 in the developing monkey forebrain: comparison with the expression of the genes FOXP1, PBX3, and MEIS2. J Comp Neurol 509: 180-189 (2008 a)

173. Takahashi K, Liu FC, Hirokawa K, Takahashi H: Expression of Foxp4 in the developing and adult rat forebrain. J Neurosci Res 86: 3106-3116 (2008 b)
174. Takayama K, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Murakami K, Hayashizaki Y, Ouchi Y, Inoue S: FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 374: 388-393 (2008)
175. Tamura S, Morikawa Y, Iwanishi H, Hisaoka T, Senba E: Expression pattern of the winged-helix/forkhead transcription factor Foxp1 in the developing central nervous system. Gene Expr Patterns 3: 193-197 (2003)
176. Tamura T, Konishi Y, Makino Y, Mikoshiba K: Mechanisms of transcriptional regulation and neural gene expression. Neurochem Int 29: 573-581 (1996)
177. Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL: A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. Science 272: 408-411 (1996)
178. Teramitsu I, Kudo LC, London SE, Geschwind DH, White SA: Parallel FoxP1 and FoxP2 expression in songbird and human brain predicts functional interaction. J Neurosci 24: 3152-3163 (2004)
179. Teufel A, Wong EA, Mukhopadhyay M, Malik N, Westphal H: FoxP4, a novel forkhead transcription factor. Biochim Biophys Acta 1627: 147-152 (2003)
180. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M: Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. Nature 425: 851-856 (2003)
181. Thorne HV: Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA. J Mol Biol 24: 203-211 (1967)
182. Tisné C, Delepierre M, Hartmann B: How NF-kappaB can be attracted by its cognate DNA. J Mol Biol 293: 139-150 (1999)
183. Tsukiyama T, Wu C: Chromatin remodeling and transcription. Curr Opin Genet Dev 7: 182-191 (1997)
184. Turner J, Crossley M: Basic Krüppel-like factor functions within a network of interacting haematopoietic transcription factors. Int J Biochem Cell Biol 31: 1169-1174 (1999)
185. Turner J, Crossley M: The CtBP family: enigmatic and enzymatic transkriptional co-repressors. Bioessays 23: 683-690 (2001)
186. Vargha-Khadem F, Gadian DG, Copp A, Mishkin M: FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. Nat Rev Neurosci 6: 131-138 (2005)
187. Viguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho M-S, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L: Foxp3 Expressing CD4+CD25high regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. J Immunol 173: 1444-1453 (2004)
188. Volloch V, Schweitzer B, Rits S: Ligation-mediated amplification of RNA from murine erythroid cells reveals a novel class of beta globin mRNA with an extended 5'-untranslated region. Nucleic Acids Res 22: 2507-2511 (1994)
189. Wang B, Lin D, Li C, Tucker P: Multiple domains define the expression and regulatory properties of Foxp1 forkhead transcriptional repressors. J Biol Chem 278: 24259-24268 (2003)

190. Wang B, Weidenfeld J, Lu MM, Maika S, Kuziel WA, Morrisey EE, Tucker PW: Foxp1 regulates cardiac outflow tract, endocardial cushion morphogenesis and myocyte proliferation and maturation. Development 131: 4477-4487 (2004)
191. Wei WZ, Morris GP, Kong YC: Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells. Cancer Immunol Immunother 53: 73-78 (2004)
192. Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H: The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein ans is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. Cell 57: 645-658 (1989)
193. Weigelt J, Climent I, Dahlmann-Wright K, Wikström M: Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4). Biochemistry 40: 5861-5869 (2001)
194. Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, Darnell JE Jr: The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. Cell 78: 575-588 (1994)
195. Wijchers PJ, Burbach JP, Smidt MP: In control of biology: of mice, men and Foxes. Biochem J 397: 233-246 (2006)
196. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH: Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. J Med Genet 39: 537-545 (2002)
197. Wilimzig M: LiCl-boiling method for plasmid mini-preps. Trends Genet 1: 158 (1985)
198. Wittenberg C, Reed SI: Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. Oncogene 24: 2746-2755 (2005)
199. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Deibl M, Gastl G, Gunsilius E, Marth C: The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. Clin Cancer Res 11: 8326-8331 (2005)
200. Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M: Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. Nature 432: 1027-1032 (2004)
201. Zawel L, Reinberg D: Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. Annu Rev Biochem 64: 533-561 (1995)
202. Zhang J, Houston DW, King ML, Payne C, Wylie C, Heasman J: The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in Xenopus embryos. Cell 94: 515-524 (1998)
203. Zoghbi HY, Orr HT: Glutamine repeats and neurodegeneration. Annu Rev Neurosci 23: 217-247 (2000)

Anhang

Vollständige Nukleotidsequenzen der *Xenopus laevis* FoxP-Transkripte

xlFoxP1 (AJ853463):

```
...1  tcccacaagaggaatgacaaacaaccatccctccaggttcctatctcagtggctatgatg
..61  acacctcaagtgatcactccgcagcaaatgcaacaaatccttcagcagcaagtgctcaca
.121  ccccagcaactgcaggtcctgctccagcaacagcaggcactaatgctacagcagcagctt
.181  caggagttctataagaaacagcaggaacagttgcagcttcagctgttacagcaacaacat
.241  gcaggaaagcagccgaaagagcaacaacagcagcagcaagtggctactcaacagttggcc
.301  ttccagcagcaacttcttcagatgcagcaactgcagcagcagcacctccttactttacag
.361  agacaaggcctcctgtcaatacagcctggacaacccacccttcctctgcaatctcttgct
.421  caaggcatgattccagctgaactgcagcagctttggaaagaagtgacaggctcgcacacg
.481  gctgacgatgtggtttgcaacaaccacagcaccttggacctgtccacaacctgcgtctcc
.541  tccacggcacagccgaaaacgtccttgcttttgaactcgcaagcttcaaccaatgggcag
.601  gcctcagttcttactcttaaaagagagagctcatcccacgaggaatacacgcacaaccat
.661  cctttatatggacacggcgtgtgcaagtggccgggctgcgaaactatatgtgaagatttc
.721  ccatcatttctaaaacatctcaacagcgagcatgcactggatgacaggagtacggcccaa
.781  tgtcgggttcagatgcaagttgtgcagcaattagagttacagctgtcaaaagacaaggaa
.841  cgtcttcaagccatgatgtcacatttacatgtgaagtccacagaacccaaagcaagtccc
.901  caacctctgaacttagtatcgagtgccacactttcaaagacggcatcagaagcgtctcca
.961  caaagcttacctcatactcccaccaccccaactgcaccactcactcctatcacccaagga
1021  ccttctgtcatcactaccaccagcatccacaatgtgggacccatacggaggcggtactct
1081  gacaaatacaacatccccatctcttccgactttgcacagaaccaagagttttacaaaaat
1141  gcagaagttagaccacccttcacatacgcatctttaattaggcagggaatccttgagtct
1201  ccagaaaagcaactaacactaaacgaaatctacaactggttcacacggcagtttgcctac
1261  ttccgacgcaacgcagcaacatggaagaatgcagtgcgccataatcttagtctacacaag
1321  tgttttgtgcgagtagaaaacgtaaaaggggcagtatggacagtggatgaaatggaattc
1381  caaaaaaggagaccacagaagatcagtggtagccccacgcttattaaaaatattcagaca
1441  agtcacgcctactgctcacctctcagtgccgcgttgcaggcttcaatggcagagaacagt
1501  ttacctctatacactactgcatccatgggaaatcctgctctgaacagcttagcaaatgca
1561  ataagagaagacttaaatggagtcatggagcacacgagtagtaatggaagcgacagcagc
1621  ccgggacgttcccctatgcaaggaatgcaccaagtgcatgttaaggaagaaccactggat
1681  cacgatgataatgacggtccactatcgttagtgacaacagcaaaccacagtcctgatttt
1741  gaccgtgacagagattatgaggatgaccctgtaaatgacgacatggagtaaaactgtctc
1801  atatcaccgtcctgaaaaaggaagacagtccaaggctgttggagctctccccccttattg
1861  tacattctggagaacctacagccgttcaaacgactctgctgtgttaactcttagtgccat
1921  caagtatcccatttgggagtattttgatttttcaactttttttgttgaaaaaaaaaaaa
1981  aaaaaa
```

xlFoxP1b (AJ971473):

```
...1  ctgccgccagtacaagaaggaggccccattgtgtggggtgtttgaagtgattatgtttag
..61  aggctgcttgtgattggtggagcaaggcgtggctgcttgggtgcttttgcatcttgtcag
.121  cccaggagcacccgtgtgtgtgtgtgtatatgtgtgtgttgcaaatctgtctccaaatct
.181  gtctccaacctgagggaaacggaggagccgacaacactttggatcttcccccggcccagc
.241  actttccctgtctctctggtggcagctgctaaatggagtttgtcaggttcccgtctcagt
.301  ggctatgatgacacctcaagtgatcactccgcagcaaatgcaacaaatccttcagcagca
.361  agtgctcacaccccagcaactgcaggtcctgctccagcaacagcaggcactaatgctaca
.421  gcagcagcttcaggagttctataagaaacagcaggaacagttgcagcttcagctgttaca
.481  gcaacaacatgcaggaaagcagccgaaagagcaacaacagcagcagcaagtggctactca
.541  acagttggccttccagcagcaactccttcagatgcagcaactgcagcagcagcacctcct
.601  tactttacagagacaaggcctcctgtcaatacagcctggacaacccacccttcctctgca
.661  atctcttgctcaaggcatgattccagctgaactgcagcagctttggaaagaagtgacagg
.721  ctcgcacacggctgacgatgtggtttgcaacaaccacagcaccttggacctgtccacaac
.781  ctgcgtctcctccacggcacagccgaaaacgtccttgcttttgaactcgcaagcttcaac
.841  caatgggcaggcctcagttcttactcttaaaagagagagctcatcccacgaggaatacac
.901  gcacaaccatcctttatatggacacggcgtgtgcaagtggccgggctgcgaaactatatg
.961  tgaagatttcccatcatttctaaaacatctcaacagcgagcatgcactggatgacaggag
1021  tacggcccaatgtcgggttcagatgcaagttgtgcagcaattagagttacagctgtcaaa
1081  agacaaggaacgtcttcaagccatgatgtcacatttacatgtgaagtccacagaacccaa
1141  agcaagtccccaacctcagttgtgcactacatttgggagggagaatggatggatctgtta
1201  tagccaacagctggaggaaggaatcactggcatacttaaagggctgaacttagtatcgag
1261  tgccacactttcaaagacggcatcagaagcgtctccacaaagcttacctcatactcccac
1321  caccccaactgcaccactcactcctatcacccaaggaccttctgtcatcactaccaccag
1381  catccacaatgtgggacccatacggaggcggtactctgacaaatacaacatccccatctc
1441  ttccgactttgcacagaaccaagagttttacaaaaatgcagaagttagaccacccttcac
1501  atacgcatctttaattaggcagggaatccttgagtctccagaaaagcaactaacactaaa
1561  cgaaatctacaactggttcacacggcagtttgcctacttccgacgcaacgcagcaacatg
1621  gaagaatgcagtgcgccataatcttagtctacacaagtgttttgtgcgagtagaaaacgt
1681  aaaaggggcagtatggacagtggatgaaatggaattccaaaaaaggagaccacagaagat
1741  cagtggtagccccacgcttattaaaaatattcagacaagtcacgcctactgctcacctct
1801  cagtgccgcgttgcaggcttcaatggcagagaacagtttacctctatacactactgcatc
1861  catgggaaatcctgctctgaacagcttagcaaatgcaataagagaagacttaaatggagt
1921  catggagcacacgagtagtaatggaagcgacagcagcccgggacgttcccctatgcaagg
1981  aatgcaccaagtgcatgttaaggaagaaccactggatcacgatgataatgacggtccact
2041  atcgttagtgacaacagcaaaccacagtcctgattttgaccctgacagagattatgagga
2101  tgagcctgtaaatgaggacatggagtaaaactgtctcatatcaccgtcctgaaaaaggaa
2161  gacagtccaaggctgttggagctctccccccttattgtacattctggagaacctacagcc
2221  gttcaaacgactctgctgtgttaactcctagtgccatcaagtatcccatttgggagtatt
2281  tttgatttttctacttttttttgttgaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

xlFoxP1c (AJ971474):

```
...1  cgcagccgcttactgcctgtgaggctaagacacaagggctttgagtcatgatgcaagaat
..61  ctgggacggagacaaaaagtaacgattcagttattcagaatggagcgggccccggtaacc
.121  acctactagagtgcacgttgcgggaatccaggtccaacggggaaacacctcttgaagtcg
.181  gggcggtggaacttgcacatctccaacagcaacaggctcttcaggctgcccgacaattat
.241  taataaaccagcaaccatttagtggaataaaggccaacaagaggaatgacaaacacccat
.301  ccctacaggttcccgtctcagtggctatgatgacacctcaagtgatcactccgcagcaaa
.361  tgcaacaaatccttcagcagcaagtgctcacaccccagcaactgcaggtcctgctccagc
.421  aacagcaggcactaatgctacagcagcagcttcaggagttctataagaaacagcaggaac
.481  agttgcagcttcagctgttacagcaacaacatgcaggaaagcagccgaaagagcaacaac
.541  agcagcagcaagtggctactcaacagttggccttccagcagcaactccttcagatgcagc
.601  aactgcagcagcagcacctccttactttacagagacaaggcctcctgtcaatacagcctg
.661  gacaacccacccttcctctgcaatctcttgctcaaggcatgattccagctgaactgcagc
.721  agctttggaaagaagtgacaggctcgcacacggctgacgatgtggtttgcaacaaccaca
.781  gcaccttggacctgtccacaacctgcgtctcctccacggcacagccgaaaacgtccttgc
.841  ttttgaactcgcaagcttcaaccaatgggcaggcctcagttcttactcttaaaagagaga
.901  gctcatcccacgaggaatacacgcacaaccatcctttatatggacacggcgtgtgcaagt
.961  ggccgggctgcgaaactatatgtgaagatttcccatcatttctaaaacatctcaacagcg
1021  agcatgcactggatgacaggagtacggcccaatgtcgggttcagatgcaagttgtgcagc
1081  aattagagttacaggtaaaacattcgggtgcctcatagctttacattttgtcgtttttgg
1141  tacaactgtaatttctatacacctgcaaaaatgtgtgtgtgtatttatagtaccaagttt
1201  ggatgcacttatcctttgtatatatgaagcacagcattttaagtgtgttggaggcaaggg
1261  gtggcaaattgtggctttaataaaaactgctttggacacttgggagatatggatccatgc
1321  tgaatcaattttgctatgtatggaaccttgggtggtgcaattggcatttttgatcaacca
1381  tcttgccatcccatcagagttggggtgtttagtctcaaattttcattgaggaacagaaca
1441  gcactatagccgtccaggtggtcagatatcactcaataaccacccttcagtctttgtgc
1501  tgatcaagtatgtctgcctgtgtatggttgcctttaggcttagtgatcagctctgcgaaa
1561  gatgtggccctaacagttccaagttggttgaactatttgattttatggttttatttccta
1621  aacctctatatatgcttaatgtttttgtaactgctgtgtaaccatgtgtcgtatttcaga
1681  gcagtgatccccaaccagttgctcatgagcaacatgttgctctccaaccacaagaacatt
1741  tttcatgctaacgttgctccccaactccttttacatcttaatgttgctcacaggttcaaa
1801  aggttggggatccctgttttagagaatcgaagatcaacagatttggggtagtaactgcac
1861  ccacaatcttgctgccagttgatgttattgtaggggtttgagttaaatataatttttgg
1921  atcaatacagccataaacgtgtgcagaaacaaacaggctcccctggccggctggagaaga
1981  tcagagaccgtctcatttagtgtttgttttcttgtgctatggaaactttcacctgtgcat
2041  gttataatataccccattcatatacaagctgctctttgtgaggctttcttctttgtttgc
2101  ttctttcaagtccacttcaatttaatattcaccatggctaagcatcttccacagcacatg
2161  gtgggttaattttagatctgtttaaggtttatcgacgacgtttcattccaatttaatttt
2221  gccgagtggctcgctgtaagtgtgcactggcataaggtgagaaattaaccccatcatttc
2281  atggctccttgcaaacgctgattatgttccgctttgcaaaatgcgcatgccattgaaatg
2341  cctactttgtatgcatgacaccagtgtgaagatatatagagggcccagggctaaacagaa
2401  aagataattacatttggaattttacagagtttaaagtcatttacagcttcaaatagtcac
2461  agagaaatatctgcaaaaacagactgaaacttttgttgtttccgtcccaggaaaaaaaa
2521  aaaaaaaaaa
```

xlFoxP2a (AJ971475):

```
...1  tgcatctgctgtgtacaggcttggctttgtactctttcctgggggagagaaagtctttc
..61  ttctctgctagttgattcctgtttttgtgaagcagctaagaaaacatctgtggcaggcag
.121  aaaaaaatgacaaaggattgacaaacaccattagctgaaaattttccatttcattgcaac
.181  tatgcattgtttactttactgtaaatatcttaatacatcatcctctgaatatgctggcag
.241  acagactggagcactgtgatttcaattaaggtattaagtcatgatgcaggaatctgcaac
.301  agagacaataagcaacagttcaatgaatcaaaatggaatgagcactctaagcagccaatt
.361  agatgctggcagcagagatggaagatcaagtagtgacacgagcagtgaagtaagcacagt
.421  agaactgctgcatctgcaacaacagcaggcactacaagcagcaaggcaacttcttttaca
.481  acagcaaactagtggactgaaatctccaaagaataacgaaaaacaaagaccactgcaggt
.541  gcctgtttcaatggccatgatgactccccaggtgatcaccccgcagcaaatgcaacagat
.601  acttcagcaacaagtattgtctccccagcagcttcaagcacttctccagcagcaacaagc
.661  tgttatgttacagcagcaacaactacaagagttttacaagaaacagcaagaacagttaca
.721  tcttcagcttttgcagcagcaacagcagcagcagcagcagcaacaacagcaacaaca
.781  acagcaacaacaacaacagcaacaacaacaacagcagcagcaacagcagcagcaacaacc
.841  acagccacatccaggaaagcaagcaaaagagcagcaacaattagcagcacagcagcttgt
.901  cttccaacagcagctccttcagatgcaacaactgcagcagcaacaacatctgctcaacct
.961  tcaacggcagggacttatatccatcccgcctagccaatctgctcttccagtccagtctct
1021  accacaagctggtttgagccctgctgaaattcagcagctatggaaagaagtgactggagt
1081  tcacagtatggaagataatggcattaaacatggagggctagacctcactactaacatttc
1141  ctcttctactacctccaccaccacttccaaagcatccccaccaataacacaccattcttt
1201  attgaatggacaggcatcagtactgagtgcaagaagagacagctcatcacatgaggagac
1261  tggagcttcacatactctttatggccatggtgtctgtaagtggccaggctgtgaaaatat
1321  ttgtgaagattttggacagtttttaaagcaccttaacaatgagcatgctttagatgacag
1381  aagtactgctcaatgtcgagtccaaatgcaagtggttcagcaactggaaatccagctttc
1441  taaagaacgtgagcgtcttcaggcaatgatgacccacttgcacatgcgaccctcagagcc
1501  caagccatctccaaaacctttaaacctggtgtctactgttaccatgtctaagaatatgtt
1561  ggagacatctcctcagagtttacctcagacccccacaacaccaacagcccccgttactcc
1621  acttgcccagggaccttctgtaatcacaccagccagtgtacccaatgttggagccattcg
1681  aagacgacactctgacaaatacaacattcccatgtcatcagaaattgctccaaactatga
1741  gttttataagaatgcagatgttcggcctccattcacttatgcaaccctcataaggcaggc
1801  tatcatggaatcaagtgacaggcagttaacacttaatgaaatttacagctggtttacacg
1861  gacatttgcttacttcaggcgtaatgcagcgacttggaagaatgcagtacgccacaatct
1921  tagcctacacaaatgttttgttcgagtggaaaatgttaaaggggctgtgtggacagtaga
1981  tgaagcagaataccagaaaagaaggtcacaaaagattacagccagtccaacattggttaa
2041  aaacataccaaccagcttaggctatggtgcagctcttaatgcaagcctgcaggctgcatt
2101  ggcagaaagcagtttacctttgttaagtaacacaggcttgttaaacaatgcatccactgg
2161  cttactgcaggcagtgcacgaagacctcaatggttcactggatcacattgacagcaatgg
2221  aaacagcagcgccggctgctcaccacagccacacatacactctattcacgtcaaagagga
2281  gccactgattgcagatgacgaagactgcccaatgtctttggtcaccaccgcaaaccacag
2341  tccagagttagaagaggacagagagcttgaagaagagccattgtcagaagacttggaata
2401  aaaaaagagactcgagagacctcaaatgaagggacatagcactgaccttcacaaccactt
2461  cacaaccatgaatatttgacagattttactgtgactatttattacacatggattatgga
2521  gacagtcctaaaggaacttgttgaaccagccctttgggataaaaaaacagcaggcaaatt
2581  gcttgttgtcttctttttttaaagacaaatacagatttcttgaaaaaaaaaaaaaaaaa
2641  a
```

xlFoxP2b (AJ971476):

```
...1  caacagcaggcactacaagcagcaaggcaacttcttttacaacagcaaactagtggactg
..61  aaatctccaaagaataacgaaaaacaaagaccactgcagatcattaataaataaaaaaga
.121  agtgggcccaggactgaacctagaggtactccacttacagcttctgcccagtttgaaaag
.181  gttccatttataacaactgtaggctgaaatcagagcatcagtgttcaagacccatcaggt
.241  gcctgtttcaatggccatgatgactccccaggtgatcaccccgcagcaaatgcaacagat
.301  acttcagcaacaagtattgtctccccagcagcttcaagcacttctccagcagcaacaagc
.361  tgttatgttacagcagcagcaacagcagcagcagcagcagcagcaacaacagcaacaaca
.421  acagcaacaacaacaacagcaacaacaacaacagcagcagcaacagcagcagcaacaacc
.481  acagccacatccaggaaagcaagcaaaagagcagcaacaattagcagcacagcagcttgt
.541  cttccaacagcagctccttcagatgcaacaactgcagcagcaacaacatctgctcaacct
.601  tcaacggcagggacttatatccatcccgcctagccaatctgctcttccagtccagtctct
.661  accacaagctggtttgagccctgctgaaattcagcagctatggaaagaagtgactggagt
.721  tcacagtatggaagataatggcattaaacatggagggctagacctcactactaacatttc
.781  ctcttctactacctccaccaccacttccaaagcatccccaccaataacacaccattcttt
.841  attgaatggacaggcatcagtactgagtgcaagaagagacagctcatcacatgaggagac
.901  tggagcttcacatactctttatggccatggtgtctgtaagtggccaggctgtgaaaatat
.961  ttgtgaagattttggacagtttttaaagcaccttaacaatgagcatgctttagatgacag
1021  aagtactgctcaatgtcgagtccaaatgcaagtggttcagcaactggaaatccagctttc
1081  taaagaacgtgagcgtcttcaggcaatgatgacccacttgcacatgcgaccctcagagcc
1141  caagccatctccaaaacctttaaacctggtgtctactgttaccatgtctaagaatatgtt
1201  ggagacatctcctcagagtttacctcagacccccacaacaccaacagcccccgttactcc
1261  acttgcccagggaccttctgtaatcacaccagccagtgtacccaatgttggagccattcg
1321  aagacgacactctgacaaatacaacattcccatgtcatcagaaattgctccaaactatga
1381  gttttataagaatgcagatgttcggcctccattcacttatgcaaccctcataaggcaggc
1441  tatcatggaatcaagtgacaggcagttaacacttaatgaaatttacagctggtttacacg
1501  gacatttgcttacttcaggcgtaatgcagcgacttggaagaatgcagtacgccacaatct
1561  tagcctacacaaatgttttgttcgagtggaaaatgttaaaggggctgtgtggacagtaga
1621  tgaagcagaataccagaaaagaaggtcacaaaagattacaggcagtccaacattggttaa
1681  aaacataccaaccagcttaggctatggtgcagctcttaatgcaagcctgcaggctgcatt
1741  ggcagaaagcagtttacctttgttaagtaacacaggcttgttaaacaatgcatccactgg
1801  cttactgcaggcagtgcacgaagacctcaatggttcactggatcacattgacagcaatgg
1861  aaacagcagcgccggctgctcaccacagccacacatatcattcaagttccttgtcactcc
1921  tcttgacaaaaggatcattccagtcccctgtcattccactttgagattgctccagtgcct
1981  acaacgacactctattcacgtcaaagaggagccactgattgcagatgacgaagactgccc
2041  aatgtctttggtcaccaccgcaaaccacagtccagagttagaagaggacagagagcttga
2101  agaagagccattgtcagaagacttggaataaaaaaagagactcgagagacctcaaatgaa
2161  gggacatagcactgaccttcacaaccacttcacaaccatgaatatttgacagattttac
2221  tgtgactatttattacacatggattatggagacagtcctaaaggaacttgttgaaccagc
2281  cctttgggataaaaaaacagcaggcaaattgcttgttgtcttctttttttaaagacaaat
2341  acagattttcttgaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

xlFoxP4a (AJ971477):

```
...1  cttcctctcaactttgcctccctgatatctcgggccagctctgtttttttttctttatt
..61  ctctagtcctttgttctctccctgcttggccaagtgttgtccacctgctcttgtgggata
.121  tcccgaagcctcctggcggccagccgggcgctgtgttagtgaagcgcgtgcagtagctgc
.181  gccaagttctctgtgggagtggagcgtgcgcgtatggatcccggcactggctgctactcg
.241  gggcgcagttaagaggtcataaaatcaagtcatgatggtagaatctgagtccatacggtc
.301  caccccaaccagccaaaatggagttggaagtctccctaaccaatctgacagttgtgttgg
.361  aagagaaggatcaggcagtggagagaccaatggagagctaaacccagctgaacttcttca
.421  ttttcagcaacaacaggctctgcagatggcaaggcaacttcttcttcagcaagcaacatg
.481  tttgaactcccctagcacagataacaagcagccctcagtacaggtcccagtttccgttgc
.541  tatgatgtcccctcagatgatcacccccagcagatgcagcagattctgtccccagcaca
.601  gctccaggctgtcttacagcagcagcaggcactcatgctacaacagttgcaggagtatta
.661  caagaaacaacaggaacagctgcaccttcagcttctctctcaacaacaggcagggaagca
.721  gcaacccaaagagttagctttgggaaacaagcaattggcattccagcagcaactgttaca
.781  aatgcaacaactgcagcaacagcacttaataaacctccagaggcagaacctggtgggact
.841  ccagtctgggcaagggccagtaccaatgcagagtctaccacaagtatccccatcagacct
.901  gcatcagctcttaaaggagatgagcagcagtcaggaagaatccagtaaacaggacactgt
.961  tgacctgatgacctcaatcactacctcattcccaactaccaaggtttcacctcctacaat
1021  gcacccatccttatctaatgggcagaatacacgcagagagagcacatcccattatgaaag
1081  ttcacacctactttatggtcacggtgaatgcagatggccaggctgtgaagctctttgtga
1141  agatatggggcagtttataaagcatttaaacacagagcatgctcttgacgatcgcagcac
1201  tgctcagtgtcgtgtccaaatgcaagtggtgcaacaactcgaaatacagttggcaaagga
1261  gagtgagcgattacaggcaatgatgactcatcttcacatgagaccatcagaaccaaagcc
1321  cttcagtcaaccactgaacttggtatcgagtgcatccaacaacaaaatgtcccatgacac
1381  cttccctgatggcttacctcaacccctacatctgctactgctcctattactccattgag
1441  gcaaggcacctctgtgattagctcctccagcctaccttctgtgggtcctgtgcgtcgacg
1501  aattgtggataagttttgcaccccaatatcatcagaacttgctcaaaatcatgagtttta
1561  taagaatgctgaagtacgtcctccattcacatatgcctcattaattcgacaggctatttt
1621  agaaacaccagacagacagctgacattaaatgagatttacaattggttcacacgcatgtt
1681  tgcatactttcggaggaacactgctacttggaagaatgcagttcgtcataacctgagttt
1741  gcataagtgctttgtacgtgtggagaatgtgaagggagcagtgtggacggtagatgagct
1801  ggaataccaaaagagaagaccaccaaagatgactggtagcccgacccttgttaaaaacat
1861  gatatcggggctgggatacagtgccctgaatgcaagttaccaggctgcccttgcagaaag
1921  tagcttcccacttctcaacagcccaccactgcacaacagttcaggcagtgtcctccatgg
1981  tgggcatgatgatgtaaccagcactggggaacctggaaacagcaatggaagcagccctcg
2041  tctgtctcctcagtatagtcagtccatccatgtcaaggaggagccagcagaagatgatgt
2101  cagacctgcctctatttctgcacctactaaccaaactacagtcctgccagaagatcgtga
2161  cctagagtcagagtcgcccatggaagacttgccttagtggcacctctattttgtaatttc
2221  cattgtcccaaagtccagcacttccaccagagaccaacctgtcctccaagcctcatctac
2281  tctaaaagagacttaaacttgattcttatacatactttgggaccaaccatcatctggca
2341  gcacttctgtggtttatggactgaagggaaactcccagaatcattttccccatggacaaa
2401  gatgggctgggtattgattcttcttctgacctctgacaatgtcagggataaagttccaat
2461  cctgtgtttccccctccccactgcattatatgaaattatggacatatttcaccattgcag
2521  ttagagataaccctgaactccatgaatatgcccttacaatgcatgcaggattgggggtca
2581  cttttgctagccttctgttggtcaattttgaaggtaccaaaaaataaccaaacttttta
2641  tttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

xlFoxP4b (AJ971478):

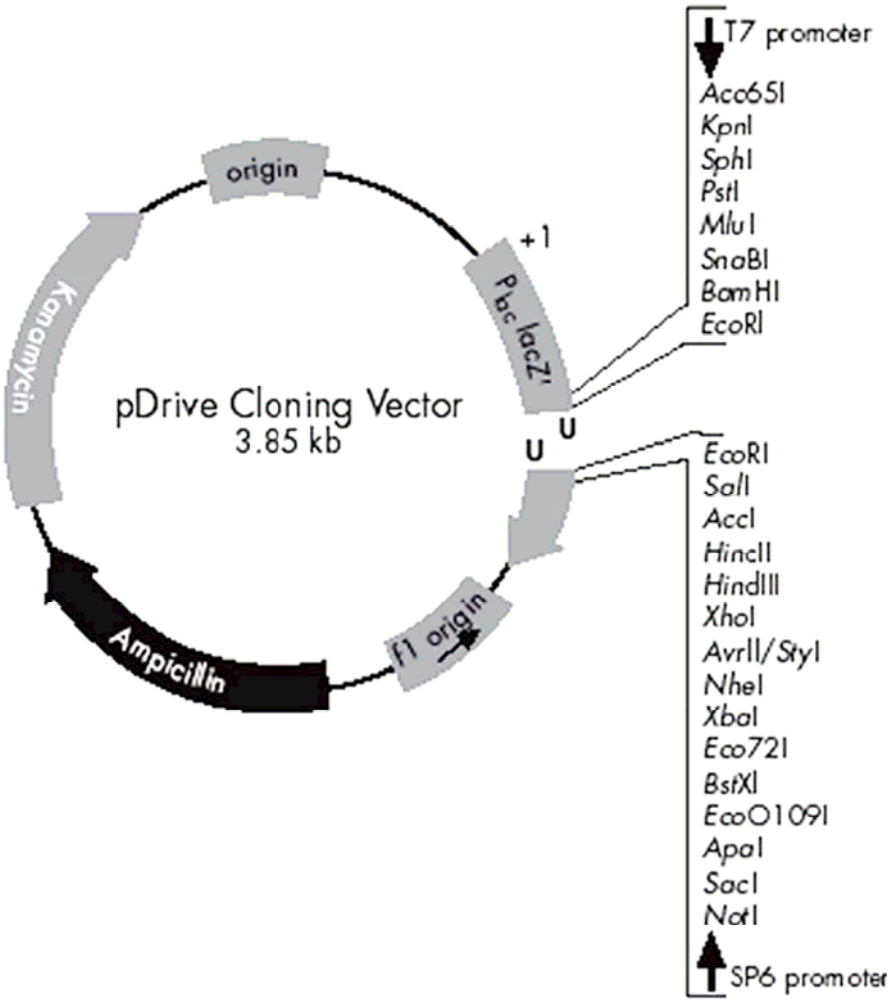
```
...1  gagagctgccctgaccagtctcaaaataatactaagaaagcatatttgttagcaaagtgc
..61  agggtgtttcatctttacttcagagaccatagttatggagtttttttttttttttcgttt
.121  gcccaagggcttgcacagaatgatgggtcataaaatcaagtcatgatggtagaatctgag
.181  tccatacggtccaccccaaccagccaaaatggagttggaagtctccctaaccaatctgac
.241  agttgtgttggaagagaaggatcaggcagtggagagaccaatggagagctaaacccagct
.301  gaacttcttcattttcagcaacaacaggctctgcagatggcaaggcaacttcttcttcag
.361  caagcaacaggtttgaactcccctagcacagataacaagcagccctcagtacaggtccca
.421  gtttccgttgctatgatgtcccctcagatgatcacccccagcagatgcagcagattctg
.481  tccccagcacagctccaggctgtcttacagcagcagcaggcactcatgctacaacagttg
.541  caggagtattacaagaaacaacaggaacagctgcaccttcagcttctctctcaacaacag
.601  gcagggaagcagcaacccaaagagttagctttgggaaacaagcaattggcattccagcag
.661  caactgttacaaatgcaacaactgcagcaacagcacttaataaacctccagaggcagaac
.721  ctggtgggactccagtctgggcaagggccagtaccaatgcagagtctaccacaagtatcc
.781  ccatcagacctgcatcagctcttaaaggagatgagcagcagtcaggaagaatccagtaaa
.841  caggacactgttgacctgatgacctcaatcactacctcattcccaactaccaaggtttca
.901  cctcctacaatgcacccatccttatctaatgggcagaatacacgcagagagagcacatcc
.961  cattatgaaagttcacacctactttatggtcacggtgaatgcagatggccaggctgtgaa
1021  gctctttgtgaagatatggggcagtttataaagcatttaaacacagagcatgctcttgac
1081  gatcgcagcactgctcagtgtcgtgtccaaatgcaagtggtgcaacaactcgaaatacag
1141  ttggcaaaggagagtgagcgattacaggcaatgatgactcatcttcacatgagaccatca
1201  gaaccaaagcccttcagtcaaccactgaacttggtatcgagtgcatccaacaacaaaatg
1261  tcccatgacaccttccctgatggcttacctcaacccctacatctgctactgctcctatt
1321  actccattgaggcaaggcacctctgtgattagctcctccagcctaccttctgtgggtcct
1381  gtgcgtcgacgaattgtggataagttttgcaccccaatatcatcagaacttgctcaaaat
1441  catgagtttataagaatgctgaagtacgtcctccattcacatatgcctcattaattcga
1501  caggctattttagaaacaccagacagacagctgacattaaatgagatttacaattggttc
1561  acacgcatgtttgcatactttcggaggaacactgctacttggaagaatgcagttcgtcat
1621  aacctgagtttgcataagtgctttgtacgtgtggagaatgtgaagggagcagtgtggacg
1681  gtagatgagctggaataccaaaagagaagaccaccaaagatgactggtagcccgacccctt
1741  gttaaaaacatgatatcggggctgggatacagtgccctgaatgcaagttaccaggctgcc
1801  cttgcagaaagtagcttcccacttctcaacagcccaccactgcacaacagttcaggcagt
1861  gtcctccatggtgggcatgatgatgtaaccagcactggggaacctggaaacagcaatgga
1921  agcagccctcgtctgtctcctcagtatagtcagtccatccatgtcaaggaggagccagca
1981  gaagatgatgtcagacctgcctctatttctgcacctactaaccaaactacagtcctgcca
2041  gaagatcgtgacctagagtcagagtcgcccatggaagacttgccttagtggcacctctat
2101  tttgtaatttccattgtcccaaagtccagcacttccaccagagaccaacctgtcctccaa
2161  gcctcatctactctaaaagagacttaaacttgattcttatacatacttttgggaccaacc
2221  atcatctggcagcacttctgtggtttatggactgaagggaaactcccagaatcattttcc
2281  ccatggacaaagatgggctgggtattgattcttcttctgacctctgacaatgtcagggat
2341  aaagttccaatcctgtgtttcccctcccccactgcattatatgaaattatggacatattt
2401  caccattgcagttagagataaccctgaactccatgaatatgcccttacaatgcatgcagg
2461  attgggggtcacttttgctagccttctgttggtcaattttgaaggtaccaaaaaataacc
2521  aaacttttttatttaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

xlFoxP4c (AJ971479):

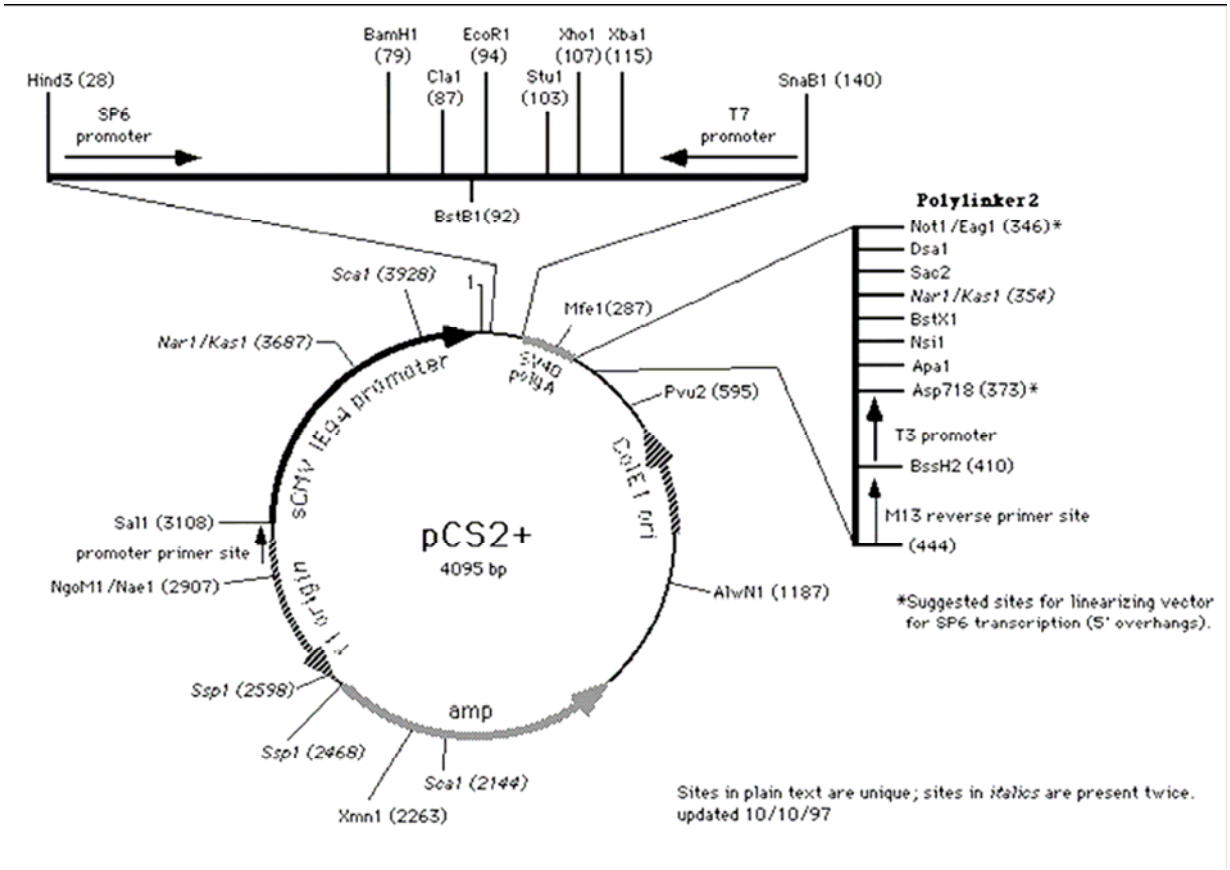
```
...1  tagcaagctacacatacttcatttttagcattctgttctattgtgtgcagaggtgtcaaa
..61  gagtttcatcgttaacaaaagaaaaactttcatgtcagaagtggcgaaaaaaatactagg
.121  ttgctcaatggtcataaaatcaagtcatgatggtagaatctgagtccatacggtccaccc
.181  caaccagccaaaatggagttggaagtctccctaaccaatctgacagttgtgttggaagag
.241  aaggatcaggcagtggagagaccaatggagagctaaacccagctgaacttcttcatttttc
.301  agcaacaacaggctctgcagatggcaaggcaacttcttcttcagcaagcaacatgtttga
.361  actcccctagcacagataacaagcagccctcagtacaggtcccagtttccgttgctatga
.421  tgtcccctcagatgatcacccccagcagatgcagcagattctgtccccagcacagctcc
.481  aggctgtcttacagcagcagcaggcactcatgctacaacagttgcaggagtattacaaga
.541  aacaacaggaacagctgcaccttcagcttctctctcaacaacaggcagggaagcagcaac
.601  ccaaagagttagctttgggaaacaagcaattggcattccagcagcaactgttacaaatgc
.661  aacaactgcagcaacagcacttaataaacctccagaggcagaacctggtgggactccagt
.721  ctgggcaagggccagtaccaatgcagagtctaccacaagtatccccatcagacctgcatc
.781  agctcttaaaggagatgagcagcagtcaggaagaatccagtaaacaggacactgttgacc
.841  tgatgacctcaatcactacctcattcccaactaccaaggtttcacctcctacaatgcacc
.901  catccttatctaatgggcagaatacacgcagagagagcacatcccattatgaaagttcac
.961  acctactttatggtcacggtgaatgcagatggccaggctgtgaagctctttgtgaagata
1021  tggggcagtttataaagcatttaaacacagagcatgctcttgacgatcgcagcactgctc
1081  agtgtcgtgtccaaatgcaagtggtgcaacaactcgaaatacagttggcaaaggagagtg
1141  agcgattacaggcaatgatgactcatcttcacatgagaccatcagaaccaaagcccttca
1201  gtcaaccactgaacttggtatcgagtgcatccaacaacaaaatgtcccatgacaccttcc
1261  ctgatggcttacctcaacccccctacatctgctactgctcctattactccattgaggcaag
1321  gcacctctgtgattagctcctccagcctaccttctgtgggtcctgtgcgtcgacgaattg
1381  tggataagttttgcaccccaatatcatcagaacttgctcaaaatcatgagttttataaaga
1441  atgctgaagtacgtcctccattcacatatgcctcattaattcgacaggctattttagaaa
1501  caccagacagacagctgacattaaatgagatttacaattggttcacacgcatgtttgcat
1561  actttcggaggaacactgctacttggaagaatgcagttcgtcataacctgagtttgcata
1621  agtgctttgtacgtgtggagaatgtgaagggagcagtgtggacggtagatgagctggaat
1681  accaaaagagaagaccaccaaagatgactggtagcccgacccttgttaaaaacatgatat
1741  cggggctgggatacagtgccctgaatgcaagttaccaggctgcccttgcagaaagtagct
1801  tcccacttctcaacagcccaccactgcacaacagttcaggcagtgtcctccatggtgggc
1861  atgatgatgtaaccagcactggggaacctggaaacagcaatggaagcagccctcgtctgt
1921  ctcctcagtatagtcagtccatccatgtcaaggaggagccagcagaagatgatgtcagac
1981  ctgcctctatttctgcacctactaaccaaactacagtcctgccagaagatcgtgacctag
1041  agtcagagtcgcccatggaagacttgccttagtggcacctctattttgtaatttccattg
2101  tcccaaagtccagcacttccaccagagaccaacctgtcctccaagcctcatctactctaa
2161  aagagacttaaacttgattcttatacatactttgggaccaaccatcatctggcagcact
2221  tctgtggtttatggactgaagggaaactcccagaatcattttccccatggacaaagatgg
2281  gctgggtattgattcttcttctgacctctgacaatgtcagggataaagttccaatcctgt
2341  gtttcccctcccccactgcattatatgaaattatggacatatttcaccattgcagttaga
2401  gataaccctgaactccatgaatatgcccttacaatgcatgcaggattgggggtcactttt
2461  gctagccttctgttggtcaattttgaaggtaccaaaaaataaccaaacttttttatttaa
2521  aaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Vektoren

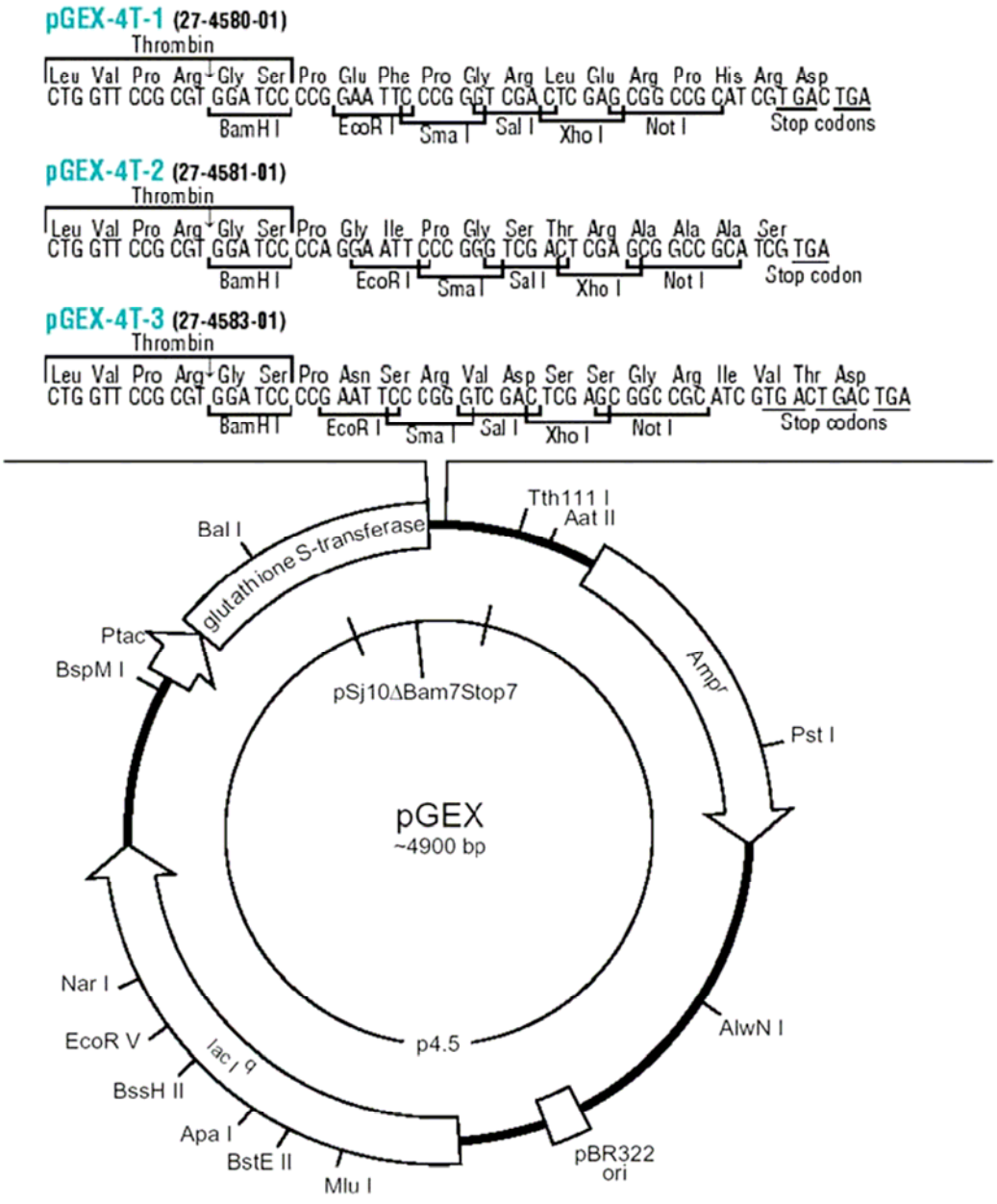
p-Drive Cloning Vektorkarte



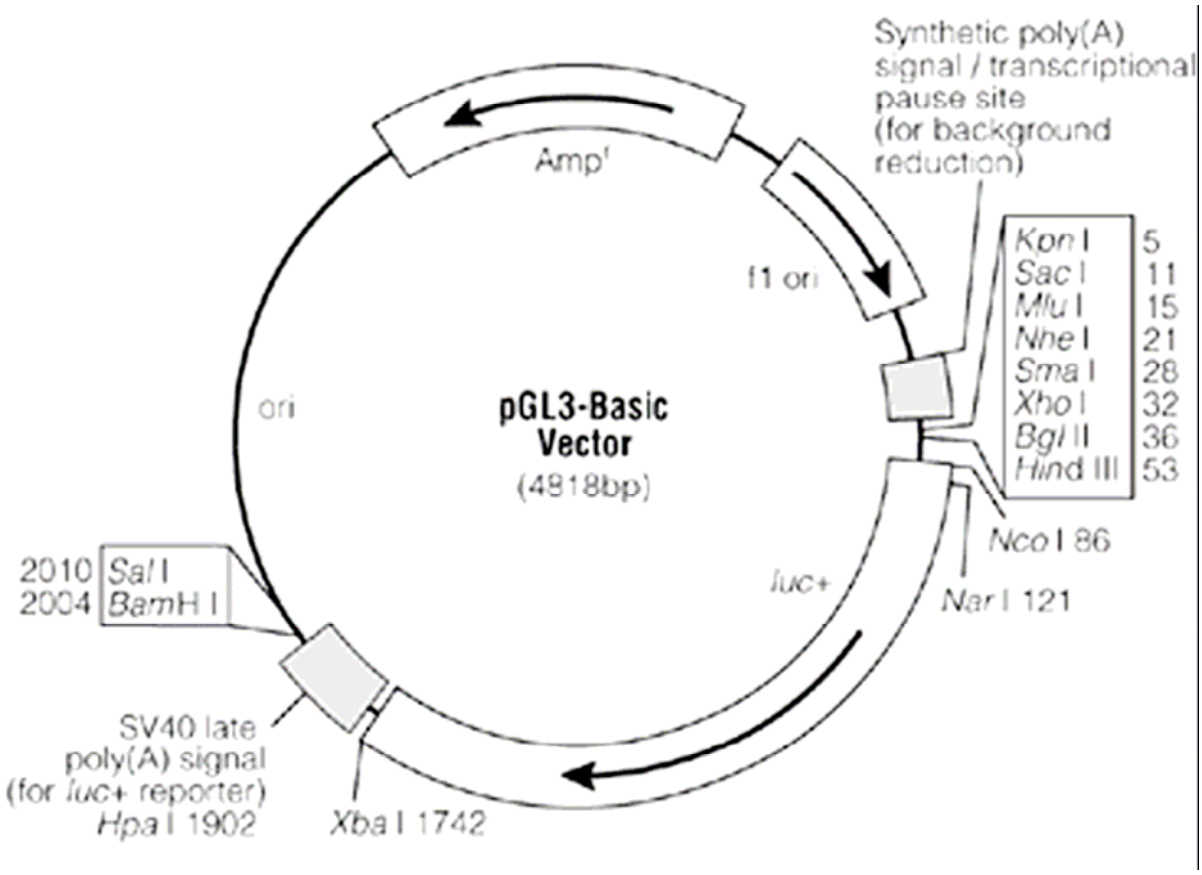
pCS2+ Vektorkarte



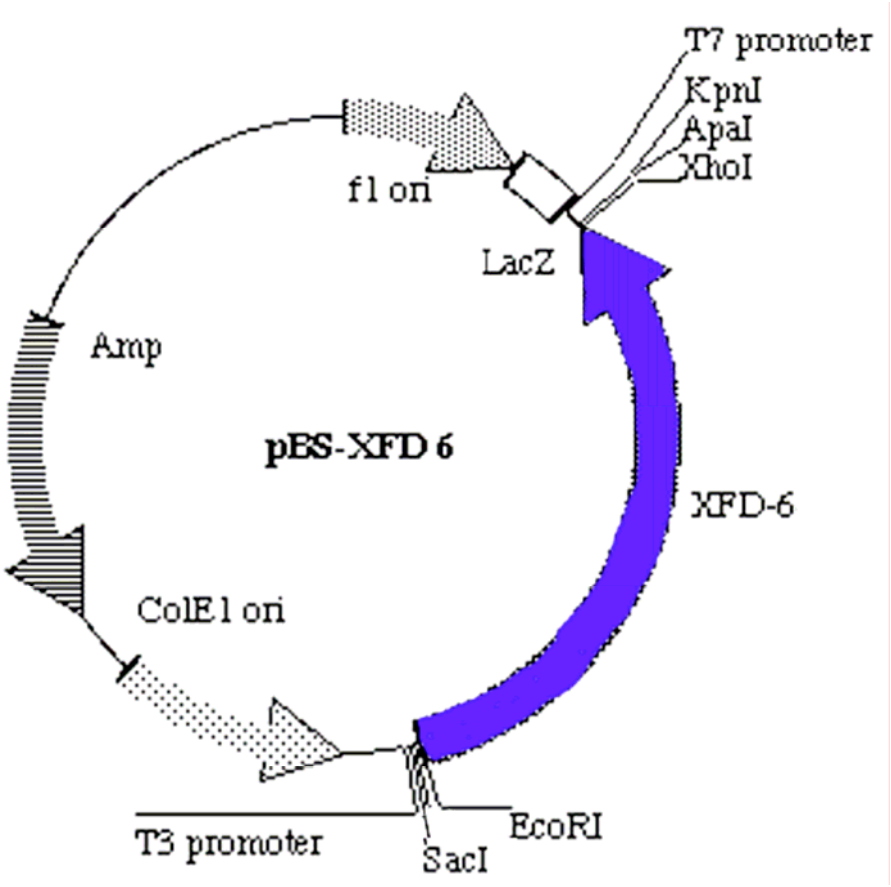
pGEX Vektorkarte



pGL3-Basic Vektorkarte



pBluescript II KS+ Vektorkarte



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Knöchel für die interessante Themenstellung, die aufmerksame Betreuung und dem steten Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Ebenso möchte ich im Besonderen Frau Antje Rößner und Frau Cornelia Donow für ihre tatkräftige Hilfe und Unterstützung bei den Whole Mount *in situ* Hybridisierungen, den Sequenzierungsarbeiten und Proteininteraktionsanalysen meinen Dank aussprechen.

Namentlich möchte ich Frau Dr. Sigrun Knöchel, Frau Dipl.-Biol. Doreen Siegel, Herrn Dr. Maximilian Schuff und Herrn Dipl.-Kfm. Lars Wochnik für ihre Anregungen, ihre große Hilfsbereitschaft und für ihre moralische Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Christian Schön, dessen persönliches Engagement und fachliche Kompetenz mir über diese Arbeit hinaus wertvolle Hilfe und Unterstützung waren.

Herrn Prof. Dr. Donald Bunjes danke ich für die freundliche Erstellung des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich meinem Vater Hartmut Wochnik für seine Unterstützung während der gesamten Ausbildungszeit!

Curriculum Vitae

Personal Data

Name:	Angela Wochnik
Date of Birth:	July 22th, 1980 in Osnabrück, Germany
Official Address:	Dept. of Internal Medicine III Albert-Einstein-Allee 23 89081 Ulm, Germany Tel.: + 49-731-500-45636 Fax: + 49-731-500-45655 E-mail: angela.wochnik@uni-klinik-ulm.de
Private Address:	Herrenkellergasse 18 89073 Ulm, Germany
Family Status:	Single

Education

1987 – 1993	Primary School and Secondary School in Osnabrück
1993 – 2000	Grammar School (Ratsgymnasium Osnabrück)

University Career

10/2000 – 09/2002	Start of Medical Studies at the University of Bochum (Ruhr-Universität Bochum), Preliminary Medical Examination
10/2002 – 05/2007	University of Ulm, 1st, 2nd and 3rd State Examination
08/2004 – 01/2009	Doctoral Thesis in the Department of Biochemie, University of Ulm (Head: Prof. Dr. Dr. W. Knöchel)
06/2007 – 01/2009	Licence as Physican and Intern in the Department of Internal Medicine III, Hematology and Oncology, University Clinic Ulm (Head: Prof. Dr. H. Döhner)

Publications

10/2006 Schön, C., Wochnik, A., et al.: The FoxP subclass in *Xenopus laevis* development. Dev Genes Evol 216 (2006) 641-646.

Language knowledge

Languages German, English, French, Latin

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und die aufgeführten Hilfsmittel und Quellen vollständig aufgeführt worden sind.