Abteilung Biochemie
Leiter: Prof. Dr. Dr. W. Knöchel

Struktur und Regulation der fork head/winged helix FoxD5 Gene von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis*

Dissertation

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

von
Christian Schön
aus Augsburg
2004

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Walter Knöchel
2. Berichterstatter: PD Dr. Eckhard Kaufmann
Tag der Promotion: 20.01.2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Die frühe Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* 1
1.2 Die fork head/winged helix Transkriptionsfaktoren 3
1.3 Die fork head/winged helix Transkriptionsfaktoren der Subklasse D5 5
1.4 Problemstellung 7

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Lösungen und Geräte 8
2.2 Biologisches Material 13
2.3 Arbeiten mit Bakterien 15
2.4 Arbeiten mit Phagen 16
2.5 Southern Blot 18
2.6 Isolierung von Plasmid-DNA 18
2.7 Reinigung von DNA 19
2.8 Enzymatische Modifikationen von DNA 20
2.9 Polymerase Kettenreaktion 20
2.10 Isolierung und Reinigung von RNA 21
2.11 In vitro Transkription von RNA 22
2.12 Reverse Transkription 22
2.13 Schnelle Amplifikation von cDNA 5´-Enden 23
2.14 Whole-mount in situ Hybridisierung 23
2.15 Arbeiten mit *Xenopus laevis* 24
2.16 Luciferase Assay 25
2.17 Präparation animaler Kappen 25
2.18 Herstellung transgener Embryonen 26

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung und Charakterisierung der FoxD5 Gene von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* 27
3.1.1 Vervollständigung der DNA-Sequenz des FoxD5b-Phagenklons F12.2 27
3.1.2 Der genomische *Xenopus laevis* FoxD5a-Phagenklon O1 28

3.1.3	Der genomische *Xenopus tropicalis* FoxD5-Phagenklon F1	31
3.1.3.1	Isolierung eines *Xenopus tropicalis* Gens der FoxD5-Gruppe	31
3.1.3.2	Die Expression des xtFoxD5 Gens	35
3.2	Strukturelle und funktionelle Analyse des FoxD5b-Promotors in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*	37
3.2.1	Die 5´-Region	37
3.2.1.1	Promotoraktivität der 5´-Region	39
3.2.1.2	Räumliche Kontrolle	41
3.2.2	Die 3´-Region	43
3.2.2.1	Enhanceraktivität der 3´-Region	43
3.2.2.2	Räumliche Kontrolle	45
3.2.2.3	Eingrenzung eines Enhancerelements	47
3.3	Die Regulation des FoxD5b Gens und des Promotors	50
3.3.1	Die Regulation des FoxD5 Gen durch den BMP-4 Signalweg	50
3.3.2	Der Einfluss des FGF-Signalwegs	53
4.	**Diskussion**	
4.1	Genomische Struktur der FoxD5 Gene von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis*	56
4.2	Die Expression des *Xenopus tropicalis* Gens xtFoxD5	58
4.3	Vergleichende Promotoranalyse	59
4.4	Die Regulation der FoxD5 Gene und der Promotoren	60
5.	**Zusammenfassung**	62
6.	**Literatur**	64
7.	**Anhang**	
7.1	Danksagung	73
7.2	Lebenslauf	74
7.3	Sequenzen der genomischen Phagenklone F12.2, O1 und F1	75

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
BMP-4	Bone morphogenetic protein 4
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	copy DNA
CDTA	trans-1,2-Diamino-cyclohexan-N-N,N´,N´-tetraacetat
CHAPS	3-3-Cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propansulfonat
CTP	Cytosin-5´-triphosphat
Depc	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxy ribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5´-triphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
XeFGF	Xenopus embryonic fibroblast growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis-2-aminoethylether-tetraacetat
GFP	green fluorescent protein
HCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
i.E.	internationale Einheiten
kb	Kilobasen
m	milli
M	Mol pro Liter

MBSH	Modified Barth solution high salt
MBT	Midblastula Transistion
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
msx	muscle segment homeobox
n	nano
OD	optische Dichte
p	pico
p. a.	zur Analyse
PCR	polymerase chain reaction
RLU	relative light units
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS	sodium dodecyl sulfat
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
TGF-ß	Transforming growth factor beta
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyoxyethylen-p-t-octylphenol
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-Monolaurat
U	Unit
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
w/v	Masse pro Volumeneinheit
z.B.	zum Beispiel
μ	mikro

1. Einleitung

1.1 Die frühe Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*

Die Eier des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* sind asymmetrisch; man kann die animale, dunkel pigmentierte Hemisphäre von der vegetalen, hellen Hemisphäre unterscheiden. Nach der Befruchtung der Eizelle kommt es nach wenigen Minuten zur Kortikalrotation, einer Verschiebung der Zellmembran einschließlich einer dünnen Schicht des Zytoplasmas (Kortex) gegenüber dem inneren Zytoplasma. An der Eintrittsstelle des Spermiums schiebt sich dabei das vegetale Zytoplasma unter den animalen Kortex (ventraler Pol), am gegenüberliegenden dorsalen Pol das animale Zytoplasma unter den vegetalen Kortex (Abb. 1A). Damit ist die anteroposteriore Körperachse festgelegt. An die Kortikalrotation schließen sich die ersten Furchungsteilungen an. Nach der fünften Teilung spricht man vom Morulastadium. Im Verlauf weiterer Zellteilungen bildet sich durch Sekretion von Flüssigkeit ins Innere des Embryos eine Hohlkugel, die Blastula (Abb. 1B).

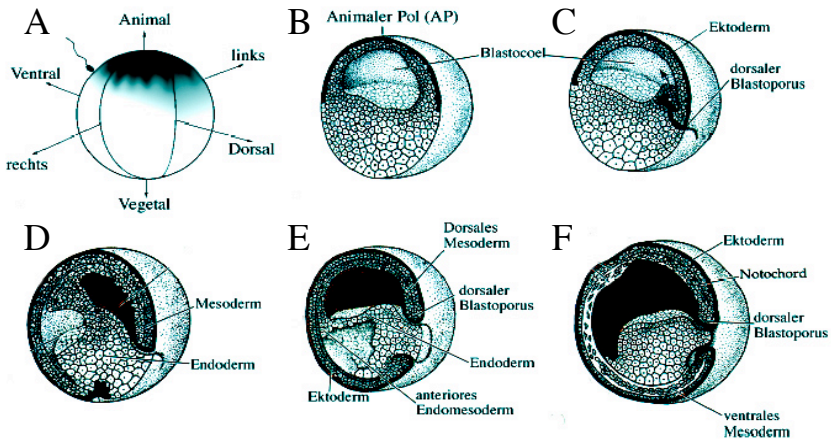


Abb. 1: Die Entwicklung des Froschembryos vom 4 Zellstadium bis zum späten Gastrulastadium (verändert nach Gilbert, 2000)

A: Nach den beiden radiären Furchungsteilungen sind die Körperachsen festgelegt.

B: Im Stadium der Blastula bildet sich das Blastocoel.

C: Mit dem Einwandern mesodermaler Zellen beginnt die Gastrulation.

D/E/F: Durch die Ausbreitung des einwandernden Mesoderms nach anterior bildet sich das Gastrocoel.

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 Transkription des zygotischen Genoms. Dieser Zeitpunkt wird als Midblastula Transition (MBT) bezeichnet (Newport und Kirschner, 1982). Im späten Blastulastadium (Abb. 1C) entwickeln sich die drei Keimblätter entlang der Animal-Vegetal-Achse. Am animalen Pol entsteht das Ektoderm und am vegetalen Pol das Endoderm. 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 "3-Signal-Modells" der Mesoderminduktion. Demnach werden aus dem Endoderm zwei Signale ausgesandt; ein ventrales Signal, das ventrales Mesoderm induziert und ein dorsales aus dem Bereich des sogenannten Nieuwkoop-Zentrum, das im überliegenden Mesoderm den Spemann-Organisator induziert (Nieuwkoop, 1973; Boterenbrood und Nieuwkoop, 1973; Harland und Gerhart, 1997). Der Spemann-Organisator selbst sendet während der frühen Gastrulation (Abb. 1C) das dritte Signal aus, das zur weiteren Differenzierung des Mesoderms beiträgt (Smith und Slack, 1983; Harland und Gerhart, 1997; Heasman, 1997). An der Bildung des dritten Signals sind zahlreiche Moleküle beteiligt (De Robertis et al., 1997; Harland und Gerhart, 1997). Während der Gastrulation wandern dann mesodermale und endodermale Zellen ins Innere des Embryos, es bildet sich der Blastoporus, der Urmund. Die Einwanderung der Zellen beginnt an der auf der Dorsalseite gelegenen Blastoporuslippe. Nach Abschluß der Gastrulation ist die Oberfläche des Embryos vollständig mit Ektoderm bedeckt (Abb. 1F), während sich im Inneren das Endoderm befindet. Zwischen diesen beiden Keimblättern befindet sich eine Schicht mesodermaler Zellen.

An der Entstehung eines komplexen Organismus aus einer befruchteten Eizelle sind also viele Differenzierungs- und Wachstumsprozesse beteiligt. Für die korrekte Ausbildung des Körperbauplans müssen die dafür verantwortlichen Gene zeitlich und räumlich koordiniert exprimiert werden. Die Erkenntnisse der molekularen Entwicklungsbiologie während der vergangenen 20 Jahre haben gezeigt, dass für die Differenzierungs- und Wachstumsprozesse während der Embryonalentwicklung neben Wachstumsfaktoren eine Reihe von Genen verantwortlich sind, die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Diese Proteine assoziieren mit spezifischen Sequenzmotiven in den Promotoren ihrer Zielgene und können so die Transkription reprimieren oder aktivieren. Die Transkriptionsfaktoren werden aufgrund ihrer Sequenzhomologie und ihrer räumlichen Struktur in verschiedene Familien eingeteilt. Dazu zählen beispielsweise die Zink-Finger-Proteine, die Leucin-Zipper-Proteine, die Helix-Loop-Helix-Proteine und die fork head/winged helix-Proteine.

1.2 Die fork head/winged helix Transkriptionsfaktoren

In der vorliegenden Arbeit kommt durch die Untersuchung der FoxD5 Gene den Transkriptionsfaktoren der fork head/winged helix Familie eine besondere Bedeutung zu. Die Namensgebung "fork head" beruht auf dem Phänotyp einer *Drosophila melanogaster*-Mutante, die im Darmbereich Kopfstrukturen aufwies. Weigel und Jäckle (1989) fanden in einem zum damaligen Zeitpunkt noch unbekannten Gen die verantwortliche Mutation und gaben diesem Gen den Namen "fork head" (fkh). Dass es sich bei diesem Protein um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte, wurde aufgrund der Kernlokalisation des Proteins vermutet. Wenig später wurde von der Arbeitsgruppe von Darnell (Costa et al., 1989; Lai et al., 1990) das Gen HNF-3α beschrieben, dessen Genprodukt in einem Bereich von 110 Aminosäuren, der DNA-Bindungsdomäne, eine starke Homologie zum fork head-Protein fkh aufwies. Clark et al. gelang es 1993 anhand von Kokristallisationsexperimenten die Struktur der DNA-Bindungsdomäne des fork head Proteins HNF-3γ zu charakterisieren (Abb. 2). Sie besteht aus drei α-Helices (H1-H3), drei β-Faltblättern (S1-S3) und zwei Flügelstrukturen (W1 und W2).

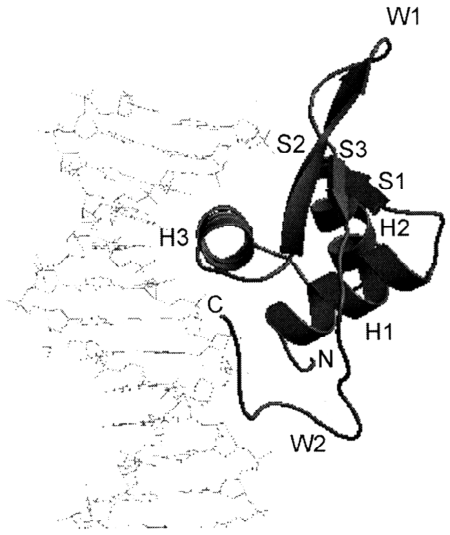


Abb. 2: Schematische Darstellung der DNA-Bindungsdomäne des winged helix Proteins HNF-3γ (aus Clark et al., 1993)

In der Abbildung ist die räumliche Struktur der DNA-Bindungsdomäne des HNF-3γ Proteins beim Kontakt mit der DNA dargestellt. Zwischen den drei α-Helices (H1-H3) befinden sich die drei β-Faltblätter. Die Flügelstrukturen (W1 und W2) sind deutlich zu erkennen. Die DNA-Interaktion erfolgt hauptsächlich durch die Helix-3 in der großen Furche.

Die Anordnung der Flügelstrukturen innerhalb der Domäne, die an die Form eines Schmetterlings erinnert, führte zu der Namensgebung der "winged helix"-Proteine. Die DNA-Bindung der winged helix-Domäne erfolgt hauptsächlich über die α-Helix 3, die sich dabei in der großen Furche der DNA-Doppelhelix befindet. Häcker et al. (1995) konnten zeigen, dass der Übergangsbereich von Helix 3 zu Faltblatt 2 für die DNA-Bindung notwendig ist. In diesem Bereich befinden sich vier Aminosäuren, die ein Magnesiumion komplexieren. Neben der DNA-Bindungsdomäne enthalten einige winged helix Proteine weitere Domänen, die als Transaktivatoren oder Repressoren fungieren (Yang et al, 2000; Schubert et al., 2001; Sullivan et al., 2001). Von Brennan wurde 1993 gezeigt, dass die winged helix Proteine als Monomere an DNA binden.

Mit PCR-gestützten Methoden konnten die DNA-Interaktionssequenzen für verschiedene fork head/winged helix Gene charakterisiert werden (Kaufmann et al., 1994). Der Vergleich der Sequenzmotive ergab die Konsensus-Sequenz (G/A)(T/A)(C/A)AA(C/T)A. Diese Konsensus-Sequenz ist für die Bindung der winged helix Proteine an DNA zwar notwendig, jedoch für die spezifische Bindung nicht ausreichend.

Aufgrund der vielen unterschiedlichen Namensgebungen (FKH, FD, HNF, XFD, HFH, FREAK u.v.a.) werden die fork head/winged helix Gene der Chordaten seit 2000 als Fox für "forkhead box" bezeichnet (Kästner et al., 2002) und entsprechend der Sequenzhomologie innerhalb der winged helix Domäne in phylogenetische Klassen eingeteilt. Gene des Menschen (*Homo sapiens*) werden in der neuen Nomenklatur mit kursiven Großbuchstaben gekennzeichnet, solche aus der Maus (*Mus musculus*) sind daran erkennbar, dass die Bezeichnung kursiv und nur der erste Buchstabe groß geschrieben wird.

Bis heute sind Fox Gene in vielen verschiedenen Spezies gefunden und charakterisiert worden, unter anderem sind beim Menschen über 40 verschiedene Gene dieser Familie bekannt. Die Fox Gene spielen in vielen biologischen Prozessen eine Rolle, unter anderem im Glucosestoffwechsel (Foxo1, Nakae et al., 2002), in der Kontrolle des Zellzyklus (FoxO4, FoxO3a, FoxO1a, Schmidt et al., 2002) und in der Embryonalentwicklung (Lehmann et al., 2003). Mittlerweile sind beim Menschen Erb- und Tumorerkrankungen bekannt, die mit Funktionsstörungen einzelner Fox Gene in Verbindung gebracht werden. Bekannte Erberkrankungen sind schwere Sprachstörung durch Mutationen im FoxP2 Gen (Lai et al., 2001), die Axenfeld-Rieger-Anomalie, eine Missbildung der Vorderkammer des Auges durch die Haploinsuffizienz des Gens FoxC1 (Smith et al., 2000) oder das Lymphödem-Distichiasis-Syndrom, dem eine Haploinsuffizienz des FoxC2 Gen zugrunde liegt (Fang et al. 2000).

Translokationen des FoxO1a Gens (ehemals FKHR) werden für die Entstehung von Rhabdomyosarkomen verantwortlich gemacht (Gil-Benso et al., 2003). Von *Xenopus laevis* sind mittlerweile über 25 verschiedene Gene beschrieben, die eine winged helix Struktur enthalten. Bisher zeigten die meisten isolierten Fox Gene eine Expression in der Embryogenese, ihre funktionelle Bedeutung in der Embryogenese ist aber nur in Einzelfällen bekannt. (Knöchel et al., 1992; Dirksen und Jamrich 1995; Ruiz i Altaba und Jessel, 1992; Friedle et al., 1998; Pohl und Knöchel, 2001, 2002, 2004).

1.3 Die fork head/winged helix Transkriptionsfaktoren der Subklasse D5

Als erstes Gen der Subklasse D5 wurde das fork head domain 3 Gen (FD3) von *Drosophila melanogaster* isoliert (Häcker et al., 1992). Das FD3 Gen weist eine Struktur aus zwei Exons und einem Intron auf. In der winged helix Domäne teilt es mit dem ursprünglich isolierten fkh Genprodukt von *Drosophila melanogaster* eine Homologie von 55%. Das Gen ist während des späten Gastrulstadiums im Bereich der Neuroblastenzellen und später in der ventralen Mittellinie sowie in anterioren Hirnstrukturen exprimiert. Von *Xenopus laevis* isolierten King und Moore (1994) auf der Suche nach Genen, die durch den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) induzierbar sind, vier fork head cDNA-Fragmente. Eines dieser Fragmente mit einer Länge von 95 bp wies eine hohe Homologie zum Drosophila FD3 Gen auf. In RT-PCR-Experimenten zeigte sich für das noch unvollständig bekannte Gen eine Expression in der dorsalen Urmundslippe, weshalb sie das Gen als XFLIP (*Xenopus* forkhead expressed in the dorsal lip) bezeichneten.

Odenthal und Nüsslein-Vollhard beschrieben 1998 neun cDNA-Klone der forkhead Gene (fkd1-fkd9) des Zebrafischs Danio rerio. Eines dieser Gene, das fkd8 Gen (nach neuer Nomenklatur Foxd5), wies eine starke Homologie zu FD3 und XFLIP auf. In situ whole-mount Experimente zeigten eine fkd8-Expression im Neuroektoderm.

Ein Jahr später gelang es Sölter et al. (1999) drei *Xenopus laevis* cDNA-Klone der FoxD5 Gruppe zu isolieren und zu charakterisieren: XFD-12, XFD-12´ und XFD-12´´ (nach neuer Nomenklatur: FoxD5a/5b/5c). Die Sequenz des XFLIP-Fragments stellte sich als Teilsequenz des FoxD5b cDNA-Klons heraus. Anhand von RT-PCR- und whole-mount in situ Hybridisierungs-Experimenten wurde die räumliche und zeitliche Expression der FoxD5 Gene untersucht. Die Regulation des FoxD5b Gens wurde im Modellsystem der animalen Kappe analysiert. In den Expressionsanalysen ergab sich für alle drei Gene ein zeitlich wie räumlich nicht zu unterscheidendes Muster. Die FoxD5 Gene sind sowohl maternal als auch zygotisch

exprimiert. Die maternalen FoxD5 Transkripte sind in der Oozyte und während der ersten Zellteilungen in geringer Anzahl vorhanden und in der animalen Hemisphäre des Embryos lokalisiert. Im Morula- und frühen Blastulastadium sind sie nicht mehr nachweisbar. Die zygotische Transkription der FoxD5 Gene beginnt kurz nach dem Einsetzen der zygotischen Transkription im Bereich des Spemann-Organisators auf der Dorsalseite des Embyos und erreicht während der Gastrulation ihr Maximum. Zu Beginn der Gastrulation demarkieren die FoxD5-Transkripte diejenigen Zellen der dorsalen Urmundslippe, die während des Gastrulationsvorgangs ektodermal bleiben und nicht als mesendodermale Zellen ins Innere des Embryos wandern, sowie einen Bereich der dorsalen Marginalzone. Mit der Wanderung der mesendodermalen Zellen nach anterior verdichtet sich die FoxD5-Expression in der Mittellinie der entstehenden Neuralplatte. Nach dem Schluß des Neuralrohr sind Transkripte in Bereichen der Schwanzspitze und der Grenzregion zwischen Mittelhirn und Nachhirn lokalisiert. In Studien zur Regulation zeigte sich im animalen Kappen Assay eine Aktivierung des FoxD5b Gens durch Aktivin und bFGF. Whole-mount in situ Experimente zeigten einen reprimierenden Effekt durch die ektopische Expression von BMP-4 und durch die Bestrahlung mit UV-Licht. Die ektopische Expression von Chordin und die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade durch Lithiumchlorid führte zu einer ektopischen Expression des FoxD5b Gens (Sölter et al., 2000).
Die Untersuchungen zur Regionalisierung und neuroektodermalen Spezifizierung des Spemann-Organisators von Fetka et al. (2000) legen dem FoxD5b Gen eine Funktion bei den Bewegungen der Vorläuferzellen der Neuralplatte während des Gastrulationsvorgangs nahe. Sie konnten zeigen, dass die FoxD5b-Expression in der Neuralplatte vom "Nodal related"-Signalweg und in der dorsalen Marginalzone von einem funktionierender FGF-Signalweg abhängig ist. Diese Erkenntnisse zur Funktion und Regulation des FoxD5a Gens konnten Sullivan et al. (2001) erweitern. Sie untersuchten die Funktion des FoxD5a Gens sowohl im ganzen Embryo als auch mit dem Modellsystem der animalen Kappe. Im Modellsystem der animalen Kappe führt die Überexpression des FoxD5a Gens zur Induktion von mesodermalen, neuralinduzierenden und neuralen Markergenen. Im ganzen Embryo bewirkte die FoxD5a-Überexpression auf der Ventralseite die Bildung einer partiellen zweiten Körperachse. Auf der Dorsalseite überexprimiert, verursacht FoxD5a eine Hypertrophie der Neuralplattenzellen. Als Grundlage dieser Hypertrophie wird eine Hemmung der Zelldifferenzierung nach der Neuralinduktion durch das FoxD5a Gen vermutet. Des weiteren wurde untersucht, ob die beschriebenen Effekte auf einer aktivatorischen oder einer reprimierenden Funktion des Transkriptionsfaktors FoxD5a beruhen. Dazu wurde die FoxD5a DNA-Bindungsdomäne hinter

eine (engrailed-) Repressor-Domäne bzw. hinter eine (VP16-) Aktivator-Domäne kloniert. Die Autoren schlossen aus der Funktionsanalyse dieser chimären Proteine, dass es sich bei FoxD5a vorwiegend um einen Repressor handelt. Um herauszufinden, welche Abschnitte des FoxD5a Proteins für die Funktion als Repressor verantwortlich sind, untersuchten sie die Funktion von N-terminalen und C-terminalen Deletionsmutanten des FoxD5a Proteins. Die Resultate zeigen, dass die C-terminale Domäne für die Funktion des FoxD5a Proteins benötigt wird. Den Einfluß verschiedener Morphogene auf die Expression des FoxD5a Gens untersuchten die Autoren im Modellsystem der animalen Kappen. Eine stark induzierende Wirkung wird durch Siamois erzeugt, eine mittelstarke durch das Siamois-Zielgen Cerberus sowie durch Xwnt-8, wohingegen das indirekt von Siamois aktivierte Gen Chordin zu keiner Steigerung der FoxD5a-Expression führt.

1.4 Problemstellung

Verschiedenen Arbeitsgruppen war es gelungen, die cDNA-Sequenzen der FoxD5 Gene FoxD5a, FoxD5b und FoxD5c zu isolieren (Sölter et al.,1999; Fetka et al., 2000; Sullivan et al., 2001). Sie charakterisierten deren Sequenzen, konnten regulatorische Faktoren identifizieren und analysierten die räumliche und zeitliche Expression. Da die *Xenopus laevis* FoxD5 Gene in der frühen Embryonalentwicklung ein nicht zu unterscheidendes Expressionsmuster zeigen, lag es nahe, dass die FoxD5 Gene ähnlich reguliert werden. Demnach sollten in den Promotoren dieser Gene konservierte Sequenzbereiche existieren, die mit denselben regulatorischen Transkriptionsfaktoren assoziieren.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, anhand einer vergleichenden Promotoranalyse Sequenzabschnitte zu identifizieren, die für die Expression und Regulation der FoxD5 Gene von Bedeutung sind.

Zur Analyse der Promotoren müssen zunächst verschiedene FoxD5 Gene aus genomischen DNA-Banken von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* isoliert und sequenziert werden. Nach der Untersuchung der Genstruktur und der Festlegung des Transkriptionsstartpunktes sollte für eines der isolierten FoxD5 Gene mit Hilfe von Reportergenuntersuchungen und Koinjektionsexperimenten der Promotor charakterisiert und cis-regulatorische Elemente identifiziert werden, die für die zeitliche Aktivierung oder für die räumliche Kontrolle von Bedeutung sind.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Lösungen und Geräte

2.1.1 Reagenzien und Lösungen

Die verwendeten Reagenzien wurden in p.a. Qualität von den folgenden Firmen bezogen:

Aldrich (Steinheim)
Amersham (Braunschweig)
Bender und Hohbein (Ulm)
Bio-Rad (München)
Boehringer Mannheim (Mannheim)
Fluka (Buchs, Schweiz)
Gibco BRL (Eggenstein)
Merck (Darmstadt)
Pharmacia (Freiburg)
Promega (Heidelberg)
Pierce (München)
Roth (Karlsruhe)
Schering (Berlin)
Serva (Heidelberg)
Sigma (München)

Alle nicht aufgeführten Reagenzien wurden von den Firmen Bender und Hohbein, Merck oder Sigma bezogen.

Agar (Amersham)
Agarose (Gibco BRL)
Chorionogonadotropin, human (β-HCG, Schering)
Boehringer Mannheim Blocking Reagent (Boehringer Mannheim)
Bovines Serumalbumin (BSA, Sigma)
BM Purple AP Substrate (Boehringer Mannheim)
Chloroform (Merck)
Cysteinhydrochlorid (Bender und Hohbein)
Dimethylpyrocarbonat (DMPC, Sigma)
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT, Gibco BRL)
Essigsäureanhydrid (Sigma)
Ethanol (Merck)
Ethidiumbromid (Sigma)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Merck)
Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N´,N´-Tetraessigsäure (EGTA, Merck)
Ficoll 400 (Amersham)
Glycerin (Sigma)

Hefeextrakt (Amersham)

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-ethansulfonsäure (HEPES, Serva)

d-Luciferin (Promega)

2-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS, Sigma)

Natriumacetat (Sigma)

Natriumdodecylsulfat (SDS, Roth)

Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000, Serva)

Pepton 40 (Difco, Hamburg)

Phenol (Roth)

Polyvinylpyrrolidon (PVPP, Fluka)

Random Hexamer Primer (Amersham)

Rubidiumchlorid (Merck)

Salzsäure (Bender und Hohbein)

Torula-RNA (Sigma)

Triethanolamin (Sigma)

Triethylammoniumacetat (Sigma)

Triton X-100 (Serva)

Tween 20 (Polyethylenorbitanmonolaurat, Sigma)

Lösungen:

- AP-Puffer:
  100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris-HCl, pH 0,5, 0,1% Tween 20
- Assaypuffer (Luciferase Assay): 20 mM Tricine, 1,07 M $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2$ x 5 H_2O,
  2,67 mM $MgSO_4$, 0,1 mM EDTA, 33,3 mM DTT, 270 µM Coenzym A,
  470 µM Luciferin, 530 µM ATP, pH 7,8
  Cysteinchloridlösung: 2% (w/v) Cysteinchlorid in 0,1 x MBSH, pH 8,2
- Denaturierungslösung für das Sreenen von Phagenbanken und Southern Blot:
  0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
- Denhardt´s 100 x:
  2% Ficoll 400, 2% Polyvinylpyrrolidon, 2% BSA
  DMPC-H_2O: 1ml Dimethylpyrocarbonat ü.N. in 1 l H_2O, dann autoklavieren
- Ficoll 400 Injektionspuffer:
  4% Ficoll 400 in 1 x MBSH

- Hybridisierlösung für die whole-mount in situ Hybridisierung:
  50% (v/v) Formamid deionisiert, 5 x SSC, 1mg/ml Torula-RNA, 0,1% (v/v) Tween 20, 1 x Denhardt´s, 0,1% (w/v) CHAPS, 5 mM EDTA, 100 µg/ml Heparin
- Hybridisierungslösung für das Screenen von Phagenbanken und Southern Blot:
  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 Gelelektrophorese:
  Bromphenolblau / Xylenxyanol, 40% Saccharose in H_2O
- 5 x Lysepuffer (Luciferase assay):
  125 mM Tris/H_3PO_4 pH 7,8, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 50% (v/v) Glycerin, Triton X-100
- Lysozymösung: 10 mg/ml H_2O
  MAB-Puffer:
  100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, pH 7,5
- MBSH:
  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 7,38
- MEMPFA:
  0,1 M MOPS, pH 7,4, 2 M EGTA, 1 mM $MgSO_4$, 4% Formaldehyd
- 10 x MMR (Marc´s Modified Ringers):
  1 M NaCl, 20 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM HEPES, pH 7,5
- Neutralisierungslösung für das Screenen von Phagenbanken und Southern Blot:
  1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 5,5
- 2 x NPB (Nuclear Preparation Buffer):
  0,5 M Sucrose, 30 mM HEPES, 1 mM Spermidintrihydrochlorid, 0,4 mM Spermintetrahydrochlorid, 2 mM DTT, 2 mM EDTA
- OCM-Medium (oocyte culture medium):
  50% Leibowitz L15 (L-Glutamin minus), 15 mM HEPES, 0,4 mg/ml L-Glutamin, 1 µg/ml BSA, 50 mg/ml Gentamycinsulfat, 50 U/ml Nystatin, 10% FBS (fetal bovine serum) pH 7,8, sterilfiltriert
- PBS:
  37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,5 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4

- PTW:
  37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,5 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4,
  0,1% Tween-20, pH 7,3
- Qiagenlösungen zur Isolierung von Plasmid DNA:
  Lösung P1: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 P2: µg/ml RNase A
  Lösung P2: 0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS
  Lösung P3: 3 M Kaliumacetat pH 5,5
  Lösung QBT: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% (v/v) Isopropanol,
  0,15% Triton X-100
  Lösung QC: 1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% (v/v) Isopropanol
  Lösung QN: 1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 15% (v/v) Isopropanol
- Proteinase-K Lösungen für whole mount in situ Hybridisierung:
  Proteinase-K Lösung I: 0,2% Proteinase-K (10 µg/ml) in PTW
  Proteinase-K Lösung II: 5 µg/ml Proteinase-K in 1/10 MBSH
- SM-Puffer:
  5,8 g/l NaCl, 2 g/l $MgSO_4$ 50 ml/l 1 M Tris-HCl, pH 7,5
- SSC 20 x :
  3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
- Sperm Storage Buffer:
  1 x NPB, 30% (w/v) Glycerol, 0,3% BSA
- TAE-Puffer:
  40 mM Tris/Acetat pH 8,3, 1 mM EDTA
- Tbf1-Lösung:
  10mM $CaCl_2$, 30mM KAc, 100mM RbCl, 25mM $MnCl_2$, 15% Glycerin, pH 5,8 mit HAc, sterilfiltriert
- Tbf2-Lösung:
  10mM MOPS 10mM RbCl 1M $CaCl_2$, 15% Glycerin pH 6,5 mit KOH, sterilfiltriert
- Teltlösung: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 62,5mM EDTA, 0,4% Triton X-100, 2,5M LiCl
- TE-Puffer:
  10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA

2.1.2 Verwendete Kits

- Cap-Scribe Kit (Boehringer, Mannheim)
- Lambda Midi Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick Spin PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- RNeasy-RNA Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- 5´-/3´-RACE Kit (Ambion, England)
- Plasmid Mini Kit und Endofree Plasmid Buffer Set (Qiagen, Hilden)
- Random-Prime-Labelling Kit (Qiagen, Hilden)

2.1.3 Verwendete Enzyme

Alle verwendeten Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Amersham Life Science (Braunschweig)

Boehringer (Mannheim)

Eurogentec (Seraing, Belgien)

Fermentas (Vilnius, Litauen)

Gibco BRL (Eggenstein)

2.1.4 Antikörper

- Anti-Digoxygenin Antikörper F_{ab}-Fragment AP, Alkalische Phosphatase gekoppelt (Boehringer, Mannheim)

2.1.5 Geräte

- Agarosegelapparatur GNA 100 und 200 (Pharmacia, Freiburg)
- Bio-Imaging-System Fuji Bas 1500 (Fuji, Düsseldorf)
- Biofuge 15, 15R, Megafuge 1.0R (Heraeus Specht, Fellbach)
- DNA Thermal Cycler Cetus (Perklin Elmer, Weiterstadt)
- Gastromaster (Xenotek Engineering, Illinois, USA)
- Injektionsanlage Pneumatic Pico Pump PV 820 (Bachhofer, Reutlingen)
- Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold, Wildbad)
- Zentrifuge RC5B, SS34- und GSA-Rotor (Sorvall Du Pont, Bad Homburg)

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Bakterien

- XL 1-blue Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac
- LE 392 Genotyp: eI4-(mcrA), galK2, galT22, metB1, trpR55, hsdR514,Δ(lacIZY)6, supE44, supF58

2.2.2 Phagen

- genomische Xenopus laevis Phagenbank Lamda-FIX II (Stratagene, Kalifornien, USA)
- genomische Xenopus tropicalis Phagenbank Lamda-FIX II (erhalten von Dr. T. Pieler, Universität Göttingen)

2.2.3 Verwendete Vektoren

- pBluescript II KS+ Stratagene, Heidelberg
- pGL3 basic Promega, Heidelberg
- pSP64T3 Dr. D. A. Melton, Harvard University, Cambrigde, USA (Krieg und Melton, 1984)
- pd2EGFP BD Biosciences Clontech, Heidelberg
- pCS2+NLS MT Dr. R. A. Rupp, München, (Rupp et al., 1994)

2.2.4 Verwendete cDNA-Klone

- BMP-4 Köster, M., Universität Ulm
- Msx-1 Pohl, B. S., Universität Ulm
- Xvent-1 Gawantka, V., Heidelberg
- Xvent-2 Schuler-Metz, A.M., Universität Ulm
- tBR Graff, J.M., Harvard University, USA
- Chordin PCR-amplifiziert
- Siamois Lemaire, P., Universität Marseille, Frankreich
- XeFGF Hollemann, T., Universität Göttingen
- Goosecoid cDNA-Klon selbst isoliert und in pCS2+NLS MT kloniert

2.2.5 Verwendete Primer

- FoxD5b Primer für Promotorkonstrukte:

  Forward-Primer:-1273: 5´-GGGGTACCTACAGTTGTTATCACTAT-3´
  -1168: 5´-GGGGTACCTAGTCTCTTCTAACTCCT-3´
  -68: 5´-GGGGTACCAATTCAAGTGCAGATG-3´
  -60: 5´-GGGGTACCAAGTGCAGATGACTG-3´
  -40: 5´-GGGGTACCAGTGCTCATATAAAG-3´

  Reverse-Primer: +113: 5´-CTAGCTAGCACTGATGCTGGTTG-3´

- RT-PCR-Primer:

  FoxD5b RT-PCR-Primer (Produkt 122 bp):
  Forward-Primer: 5´-GAACCCACCATAATTCCCTG-3´
  Reverse-Primer: 5´-CTGAATGTGTAGGCTGTAGG-3´

  Histon H4 RT-PCR-Primer (Produkt 188 bp):
  Forward-Primer: 5´-CGGGATAACATTCAGGGTATCACT-3´
  Reverse-Primer: 5´-ATCCATGGCGGTAACTGTCTTCTT-3´

- Xenopus tropicalis FoxD5 5´-RACE Primer:

  GSP-1: 5´-ATGCATGCCACTGGAGTCGC-3´
  GSP-2: 5´-CTGCAGGATAGCCATAGTGAT-3´
  GSP-3: 5´-CCCATCTCTGAATGTGTTGGC-3´

- Sequenzierungsprimer:

  SP6 5´-CCCAAGCTTGATTTAGGTGA-3´
  T7 5´-TATAGTGAGTCGTATTAC-3´

2.2.6 Tiere

Xenopus laevis und Xenopus tropicalis; Haltung der Tiere durch das Tierforschungszentrum Oberberghof, Universität Ulm. Bezugsquelle: Nasco, Kalifornien, USA

2.3 Arbeiten mit Bakterien

2.3.1 Kulturmedien

2TY-Medium: 1% Hefeextrakt
1,6% Pepton
0,5% NaCl

NZ-Medium: 0,5% Hefeextrakt
1% Casein
0,2% $MgSO_4$
0,5% NaCl

2TY- und NZ-Agarplatten werden durch Zugabe von 15 g/l Agar hergestellt. Zur Selektion der Bakterien wird dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Im Fall der Resistenz der Bakterien gegen Ampicillin beträgt die Endkonzentration 50 µg/ml.

2.3.2 Herstellung chemokompetenter Bakterien mit Rubidiumchlorid

Für die Transformation von Bakterien benötigt man Zellen, die die Fähigkeit zur Aufnahme von Plasmid-DNA besitzen. Eine Möglichkeit zur Steigerung der Transformationseffizienz ist die Behandlung der Zellen mit Rubidiumchlorid.

Von einer auf einer Tetrazyklin-Platte selektionierten Bakterienkolonie des XL1-blue-Stammes wird zunächst eine gesättigte Vorkultur hergestellt. 1ml der Vorkultur wird auf 100 ml Kulturmedium überimpft und diese bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} 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 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Das überstehende Medium wird verworfen, das Bakterienpellet in 20 ml Tbf1-Lösung resuspendiert und für 5 min auf Eis gestellt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 2500 rpm und 4°C wird der Überstand dekantiert und die Zellen in 2 ml Tfb2-Lösung resuspendiert. Die Bakterien werden für 20 min auf Eis gestellt, in Eppendorf-Reaktionsgefäße à 125 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.3 Transformation von Bakterien

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit ca. 100 ng Plasmid-DNA für 40 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird bei 42°C für 2 min einem Hitzeschock ausgesetzt und dann 5 min auf Eis gestellt. Anschließend werden die Zellen auf Antibiotika-2TY-Agarplatten zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.4 Vorbereiten von Bakterien für die Phageninfektion

Da die verwendeten Phagen über den Maltoserezeptor in die Bakterien eindringen und lysieren, benötigt man für das Screenen einer Phagenbank Bakterien, die eine hohe Maltoserezeptordichte aufweisen. Dazu werden Bakterien des Stammes LE 392 in NZ-Medium, dem 10 mM $MgSO_4$ und 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.

2.4 Arbeiten mit Phagen

2.4.1 Ausplattieren und Titerbestimmung einer Phagenbank

NZ-Topagar: NZ-Medium
0,7 % Agarose
2 min Kochen und lagern bei 4°C

Beim Sreenen einer Phagenbank ist es wichtig, eine möglichst große Anzahl von unterschiedlichen Phagenklonen zu erfassen. Auf einer Platte mit 150mm Durchmesser sollten ca. 50000 Phagenklone vorhanden sein. Zur Optimierung der Phagenanzahl auf einer Platte wird zunächst der Titer der Phagenbank bestimmt. Durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe wird der Gesamttiter der Phagenbank ermittelt. Dazu werden jeweils 200 µl der vorbereiteten Bakterien (siehe 2.3.4) mit 1 µl der Phagenbankverdünnungen bei 37°C für 15 min inkubiert. Anschließend wird 5 ml auf 45 °C abgekühlter Topagar zugegeben, und der Ansatz auf 150 mm durchmessende NZ-Agarplatten gegossen. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C kann die Anzahl der Plaques auf der Platte bestimmt werden und die Anzahl der Phagen pro Milliliter Phagenbank bestimmt werden.

2.4.2 Screening einer genomischen Phagenbank

Insgesamt werden etwa $1x10^6$ Phagenklone auf 15 bis 20 großen NZ-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht werden sie für mindestens eine Stunde auf 4°C abgekühlt und ein Ablösen der NZ-Topagarschicht von der Platte verhindert.

2.4.2.1 Phagen-DNA Transfer auf Nitrocellulosemembranen

Achteckig zugeschnittene Nitrocellulosemembranen werden auf die gekühlten Platten aufgelegt und die Position der Membran durch Einstechen einer mit Tinte gefüllten Injektionsnadel im Agar markiert. Nach einer Minute werden die Filter mit einer Pinzette vorsichtig von der Platte genommen, und die an der Membran haftenden Phagen in einer Lösung aus 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH für zwei Minuten denaturiert. Nach der Neutralisierung in 1,5 M NaCl und 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 werden die Membranen mit 2x SSC-Puffer gewaschen und anschließend die Phagen-DNA mit der Membran durch Backen bei 80°C vernetzt.

2.4.2.2 Hybridisierung der Nitrocellulosemembranen

Die Membranen werden nach dem Backen einzeln in der Hybridisierlösung benetzt, jeweils 10 Filter in einer Plastiktüte mit ausreichend Hybridisierungslösung eingeschweißt und für 2 Stunden bei 60°C vorhybridisiert. Anschließend wird die Hybridisierungslösung erneuert, die radioaktive Sonde zugegeben, die Tüte dicht verschweißt und über Nacht inkubiert. Die Hybridisierung erfolgt zwischen 55°C und 65°C. Nach der Hybridisierung werden die Membranen unter Beibehaltung der Hybridisierungstemperatur mit einer absteigenden SSC/SDS-Reihe gewaschen bis die Radioaktivität gerade die Hintergrundaktivität erreicht. Die Membranen werden nach kurzer Trocknung in Klarsichtfolie verpackt und in einer Filmkassette mit einer "Fuji imaging plate" über Nacht exponiert. Die Auswertung erfolgt mit dem Fuji Bas 1500 Bio Imaging System.

2.4.2.3 Vereinzeln von Phagen und Isolierung der Phagen-DNA

Den Signalen auf der Membran kann nun die exakte Position auf der Agarplatte zugeordnet werden. Nach dem Ausstechen des signalgebenden Areals auf der Platte werden die noch zahlreichen Phagen in 1 ml SM-Puffer in Lösung genommen, verschiedene Verdünnungen erneut ausplattiert und hybridisiert. Diese Prozedur wird solange unternommen, bis ein positives Signal genau einer Phagenplaque zugeordnet werden kann. Die Phagenplaque wird erneut in 1 ml SM-Puffer aufgenommen. Zur Isolierung der Phagen-DNA wird eine

Suspensionskultur angelegt. Zu 50 ml 10 mM $MgSO_4$-NZ-Medium wird 5 µl der vorbereiteten Zellen und 10 µl der Phagenlösung pipettiert, und der Ansatz über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Isolierung der Phagen-DNA erfolgt mit dem Lambda Midi Kit nach dem Protokoll der Firma Qiagen.

2.5 Southern Blot Hybridisierung (Southern, 1975)

Die isolierte Phagen-DNA wird mit geeingneten Restriktionsenzymen geschnitten und die Fragmente in einem Agarosegel (0,9%) getrennt. Das Gel wird für 20 min in 0,25 M HCl, 30 min in Denaturierungslösung und zweimal 20 min in Neutralisierunslösung geschwenkt. Der Transfer erfolgt mit 20 x SSC ü.N. auf eine Nitrocellulosemembran. Anschließend wird die DNA bei 80°C für 90 min an die Membran fixiert.

2.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien stehen verschiedene Methoden zu Verfügung. Ein schnelle Methode zur Gewinnung von Plasmid-DNA für Sequenzierungen und Restriktionen ist die LiCl- oder Telt-Methode.

2.6.1 LiCl-Methode (Wilimzig, 1985)

Eine auf einer 2TY/Ampicillin-Selektivplatte gewachsene Bakterienkolonie wird mit einer Pipettenspitze von der Platte, in 5 ml 2TY/Ampicillin-Medium (50µg/ml 2TY) überführt und über Nacht bei 37 ºC im Schüttler kultiviert. 1,5 ml dieser Kultur wird 30 sec bei 14000 rpm abzentrifugiert, das Medium abgekippt und erneut zentrifugiert. Das restliche Medium wird mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Bakterienpellet wird in 150 µl TELT-Lösung resuspendiert, mit 15 µl Lysozym-Lösung versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Nach zweiminütigem Aufkochen im Wasserbad wird der Ansatz 10 min auf Eis gestellt und 20 min bei 14000 rpm abzenrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die darin befindliche DNA mit 150 µl Isopropanol für 10 min bei 15000 rpm gefällt. Das Pellet wird mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE/RNase (20 µg/ml) gelöst.

2.6.2 Alkalische Lyse

Es werden die Lösungen des Plasmid Mini Kit und die Tip20 Säulen der Firma Qiagen verwendet. Die transformierten E. coli Bakterien werden in 5 ml 2TY/Ampicillin-Medium angezogen. Drei Milliliter Bakterienkultur werden in zwei Eppendorfgefäßen für 1 min bei 15000 rpm abzentrifugiert und das Medium mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Pellet wird in 400 µl P1-Lösung (4 ºC) resuspendiert, mit 400 µl P2-Lösung versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl P3-Lösung (4 ºC) wird 5 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 14000 rpm und 4 ºC abzentrifugiert. 1 ml des Überstands wird in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 100 µl ER auf Eis inkubiert. Die Säule wird mit 1 ml QBT-Lösung äquilibriert und die beiden Ansätze werden auf die Säule gegeben. Sie wird mit 4 ml QC-Lösung gewaschen und die DNA mit 800 µl QN-Lösung eluiert. Das Eluat wird mit 560 µl Isopropanol versetzt und 30 min bei 14000 rpm und RT abzentrifugiert. Das Sediment wird mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl DMPC-H_2O aufgenommen.

2.7 Reinigung von DNA

2.7.1 Reinigung mit Ionenaustauschersäulen

Für Mikronjektionen in Xenopus Embryonen wird endotoxinfreie DNA benötigt. Das Verfahren der DNA-Isolierung basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die DNA wird unter Niedrigsalzbedingungen an eine Ionenaustauscher-Matrix der Säule gebunden und kann nach zwei Waschschritten von der Matrix eluiert werden. Die Reagentien und Säulen werden von der Firma Qiagen (Endofree Plasmid Buffer Set) verwendet.

2.7.2 Reinigung mit Phenolextraktion und Präzipitation

Für DNA-Modifikationen ist es oft erforderlich die Salzkonzentrationen zu verändern oder verwendete Enzyme zu eliminieren. Der DNA-Ansatz wird mit gleicher Menge TE-gesättigtem Phenol versetzt und für 5 min kräftig geschüttelt. Dies führt zu einem Übertritt der zu eleminierenden Enzyme in die Phenolphase. Nach kurzem Zentrifugieren wird die wässrige Phase abgenommen, und die Phenolreste durch zweimalige Chloroformextraktion eliminiert. Die DNA in der wässrigen Phase wird mit 2,5 Volumen Ethanol und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend gelöst.

2.8 Enzymatische Modifikation von DNA

2.8.1 Restriktionsspaltung

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die palindrome DNA-Sequenzen spezifisch spalten. Um unerwünschte Effekte zu minimieren sind die Angaben der Hersteller bezüglich Temperatur, Puffersystem und zusätzlich benötigte Randnukleotide der Palindromsequenzen zu beachten.

2.8.2 Ligation

Für den Reaktionsansatz werden 30 ng linearisierte Vektor-DNA, 100 ng Insert-DNA mit T4 DNA- Ligase (1 U) und 1 µl 10x Reaktionspuffer, der ATP enthält, in einem Gesamtvolumen von 10 µl für mindestens 6 Stunden bei 14°C im Wasserbad inkubiert.

2.8.3 Radioaktive Markierung von DNA

Dieses Verfahren basiert auf dem Einbau eines radioaktiv markierten Nukleotids in einem neu synthetisierten DNA-Strang. Die DNA wird 2 min in kochendem Wasser denaturiert. Um die Renaturierung zu verhindern, wird die DNA anschließend sofort auf Eis gestellt. Durch Zugabe von Random Hexamer-Primern, den Nukleotiden inklusive des radioaktiv markierten Nukleotids und des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I wird das markierte Nukleotid in die neu synthetisierten DNA-Stränge eingebaut. Die Reinigung der DNA von den Einzelnukleotiden erfolgt über Microspin™ G50-Säulen der Firma Pharmacia.

2.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenraktion (PCR: polymerase chain reaction) wird zur Amplifikation von DNA-Fragenten eingesetzt. Sie basiert auf der Verwendung einer hitzestabilen DNA abhängigen DNA-Polymerase, die nach Aufschmelzen der DNA und Annealen der Primer bei 72°C das gewüschte Produkt synthetisiert. Die DNA wird bei 94°C denaturiert. Die Dauer der Denaturierung hängt von der Länge der DNA ab. Das Annealen der Primer erfolgt in Abhängigkeit von der Primerlänge und der Nukleotidzusammensetzung zwischen 50°C und 65°C. Nach dem Annealen der Primer an die zu amplifizierende DNA kann die thermostabile Taq-Polymerase bei 72°C den neuen DNA-Strang synthetisieren. Die Taq-Polymerase kann pro Minute ca. 1000 Nukleotide einbauen. Ein beispielhafter PCR-Ansatz ist im folgenden angeführt:

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

Der Ansatz wird mit Mineralöl überschichtet und in die PCR-Maschine gestellt. Ein mögliches Temperaturprogramm bei einer Annealingtemperatur von 60°C und einer Fragmentlänge von 500 bp ist im folgenden dargestellt:

Denaturierung:	94°C	1 min
Annealen der Primer	60°C	30 sec
Elongation	72°C	30 sec

Nach 25 bis 40 Zyklen wird der Ansatz für 10 min bei 72°C inkubiert, um der DNA-Polymerase Zeit für die Synthese der noch unvollständigen DNA-Fragente zu geben.

2.10 Isolierung und Reinigung von RNA

Für die Isolierung kleiner Mengen von RNA aus Embryonen wird der RNeasy Kit und das Protokoll der Firma Qiagen verwendet. Die Embryonen werden im Lysepuffer homogenisiert, und die freigesetzte RNA an die Matrix einer Ionenaustauschersäule gebunden. Nach zweimaligem Waschen kann die RNA eluiert werden. Die RNA wird von möglichen DNA-Kontaminationen, durch eine DNase-Behandlung mit 2 U DNase I für 20 min bei 37°C gereinigt. Zur Eliminierung der DNase I wird die RNA wiederum an die Ionenaustauschersäule gebunden, gewaschen und eluiert. Um eine Degradation der RNA zu verhindern, ist bei sämtlichen Materialien und Lösungen auf RNase-Freiheit zu achten.

2.11. In vitro Transkription von RNA

2.11.1 Transkription von RNA für Mikroinjektionen

Für die Herstellung der Template DNA wird die entsprechende Plasmid DNA linearisiert. Der Ansatz wird mit H_2O auf 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl Phenol für 5 min extrahiert. Zur Trennung der Phasen wird 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wird zweimal mit 100 µl Chloroform extrahiert, anschließend mit 1/10 Volumen Natriumacetat versetzt und mit dem dreifachen Volumen Ethanol gefällt. Das Pellet wird zweimal mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und in 10 µl DMPC-H_2O gelöst.

- Lösungen/Enzyme: Cap-Scribe Kit (Boehringer Mannheim)
  DNA abhängige RNA-Polymerase (T3, T7, SP6)
  0,2 M EDTA, pH 5
  RNase-Out (Life Technologies, Karlsruhe)
  DNase I [RNase-frei (Boehringer Mannheim)]

1 µg der Template DNA werden mit 4 µl Cap-Mix, 2 µl RNA-Polymerase und 1 µl RNase-Inhibitor versetzt und mit DMPC-H_2O auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 2 h wird die Template DNA für 20 min mit 1,5 µl DNaseI verdaut, die Reaktion mit 2 µl EDTA gestoppt und die RNA aufgereinigt (s. 2.8).

2.11.2 Transkription von RNA für whole-mount in situ Hybridisierung

Für die Herstellung einer in situ Hybridisierungssonde wird der DIG-RNA-Labeling Kit der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Das Prinzip beruht auf dem Einbau des Digoxigenin-markierten Nukleotids UTP in einen neu synthetisierten RNA-Strang. Die Dig-UTP markierte RNA kann später von einem alkalische Phophatase gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin erkannt werden.

2.12 Reverse Transkription

Mit dem Prinzip der reversen Transkription kann die die Konzentration einer spezifischen RNA bestimmt werden. Dies ist für Expressions- und Regulationsstudien eines Gens wichtig.

Die Methode basiert auf der Umschreibung von RNA in cDNA durch die Reverse Transkriptase, ein Enzym, das RNA-Viren für den Einbau ihres Genoms ins Wirtsgenom benötigen. Für die reverse Transkription wird ca. 2 µg RNA in 15 µl H_2O eingesetzt, für die Umscheibung können genspezifische Primer, Zufallsprimer oder Oligo dT-Primer verwendet werden. Um die RNA zu denaturieren, wird sie für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend

sofort auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 1µl dNTP-Mix, 2,5 µl 100 mM DTT, 2,5 µl Reaktionspuffer und 8 U Reverse Transkriptase wird die Reaktion gestartet. Die RNA wird 60 min bei 42°C in cDNA umgeschrieben. Durch anschießende RNase H-Behandlung wird die template-RNA abgebaut. Die cDNA kann nun für quantitave oder semiquantitative PCR eingesetzt werden.

2.13 Schnelle Amplifikation von cDNA 5´-Enden (Maruyama und Sugano, 1994)

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes eines Gens wird die 5´-RACE-Methode eingesetzt (RACE: rapid amplification of cDNA ends). Die isolierte RNA wird zunächst mit einem genspezifischen Primer in einen komplementären cDNA-Strang revers transkribiert. Nach dem Abbau der RNA mit RNase H wird der cDNA-Strang am 5´-Ende mithilfe des Enzyms Terminale Transferase an einen Linker gekoppelt. Im Anschluss kann mit dem spezifischen Genprimer und einem Primer, der an den Linker annealt, die PCR erfolgen. In einer zweiten, sogenannten nested PCR wird durch die Verwendung eines weiter stromaufwärts gelegenen Genprimers die Spezifität für das gesuchte Gen erhöht, das (die) PCR-Fragment(e) auf einem Agarosegel gereinigt, isoliert und sequenziert.

2.14 Whole-mount in situ Hybridisierung (modifiziert nach Harland, 1991)

Zur zeitlichen und räumlichen Darstellung von genspezifischen Transkripten wird die whole-mount in situ Hybridisierung eingesetzt. Sie basiert auf der spezifischen RNA-Bindung eines zum Transkript revers komlementären und Digoxigenin markierten RNA-Fragments. Nach der Hybridisierung werden die RNA-Hybride von einem Alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper erkannt. Durch Zugabe eines Farbsubstrats, das von der Alkalischen Phosphatase umgesetzt wird, kann die Transkriptlokalisation dargestellt werden.

Die whole-mount in situ Hybridisierung wird in DMPC (0,1% in H_2O) behandelten 5ml Gläschen durchgeführt. Das verwendete Protokoll dauert vier Tage. An den ersten beiden Tagen muß RNase-frei gearbeitet werden.

Erster Tag:

Die in Ethanol befindlichen Embryonen werden schrittweise mit PBS und PTW rehydratisiert. Die Vitellinmembran wird durch die Behandlung mit Proteinase-K Lösung I durchlässig gemacht und eine unspezifische Färbung durch Wechselwirkung mit der DIG-RNA verringert. Die Embryonen werden mit Triethanolamin gewaschen und schrittweise Essigsäureanhydrid hinzugefügt. Es wird zweimal mit PTW gewaschen und die Embryonen in MEMPFA refixiert.

Fünf Waschschritte mit PTW schließen sich an. Zur Vorhybridisierung werden die Embryonen in Hybridisierungspuffer versetzt und ü.N. bei 60 ºC im Wasserbad geschwenkt.
Zweiter Tag:
20 µl der DIG-markierten antisense-RNA-Sonde werden mit 20 µl deionisiertem Formamid vermischt. Die Inkubation bei 96 ºC für 30 sec und die sofortige Abkühlung auf Eis minimiert die Bildung von störenden Sekundär- und Tertiärstrukturen. Nach der Zugabe von 460 µl Hybridisierpuffer werden die Sonden auf die Embryonen gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 60°C im Wasserbad.
Dritter Tag:
Die Sonde wird abgenommen und bei -20 ºC gelagert. Um überschüssige DIG-RNA zu entfernen, wird zuerst mit Hybridisierungspuffer und anschließend mit 2x SSC gewaschen. Die einzelsträngigen RNA-Formen und DNA-RNA-Hybride werden mit RNase-A, RNase-T1 und RNase-H abgebaut. Nach mehreren Waschschritten mit 2x SSC werden die Embryonen für die Antikörperreaktion mit MAB-Puffer, Boehringer Mannheim Blocking Reagenz und Lammserum vorbereitet. Die Inkubation mit dem Antikörper beträgt etwa 4 h bei RT. Nicht gebundene Antikörper werden durch Waschen mit MAB-Puffer über Nacht entfernt.
Vierter Tag:
Die Embryonen werden noch zweimal mit MAB-Puffer gewaschen und in AP-Puffer geschwenkt. Die Färbung erfolgt durch Zugabe von BM-purple AP Substrat. Bei ausreichender Färbung werden die Embryonen in MEMPFA fixiert und in Methanol überführt.

2.15 Arbeiten mit Xenopus laevis

2.15.1 Gewinnung von Embryonen / In vitro Fertilisation

Die weiblichen Frösche werden zur Stimulation der Oogenese vier Wochen vor der Eiablage mit 50 i.E. und 15 Stunden davor mit 500 i.E. zur Oozytenreifung in den dorsalen Lymphsack mit hCG (1 mg/ml in 0,5% NaCl, sterilfiltriert) injiziert. Die Eiablage wird durch Massieren der Rückenregion forciert. Um Spermien zu gewinnen, müssen die männlichen Frösche dekapitiert werden und die Hoden präpariert werden. In OCM-Medium sind die Spermien bei 4 ºC etwa eine Woche vital. Zur in vitro Fertilisation wird ein Stück des Hodens in 1x MBSH mazeriert und auf die abgelegten Eier gegeben. Durch Verdünnen auf 1/10 MBSH wird die Salzstarre der Spermien aufgehoben und so die Befruchtung eingeleitet.

2.15.2 Entfernen der Gallerthülle und Mikroinjektionen

Zur Mikroinjektion in Xenopus laevis Embryonen muß die Gallerthülle, die die Eier umschließt, entfernt werden. Dazu schwenkt man die Eier in Cysteinchloridlösung, bis sie eng aneinander zu liegen kommen und wäscht mit 1/10 MBSH. RNA- und DNA-Lösungen können in Embryonen injiziert werden. Sie werden über eine Glasnadel mittels Stickstoffdruck mit einem Maximalvolumen von 10 nl in die Blastomeren injiziert. Um den Wundverschluß nach der Injektion zu beschleunigen, werden die Embryonen eine Stunde im Ficoll-Injektionspuffer gehalten und anschließend wieder in 1/10 MBSH überführt.

2.15.3 Fixieren von Embryonen

Für whole-mount in situ Hybridisierungsexperimente werden Embryonen fixiert. Um die widerstandsfähige Vitellinmembran, die die Embryonen in den frühen Entwicklungsstadien umgibt, für den Eintritt der Digoxigenin markierten Sonde zu permeabilisieren, werden die Embryonen für etwa 5 min in Proteinase K-Lösung II gegeben. Danach werden die Embryonen in MEMPFA bei 4 °C ü.N. fixiert und anschließend schrittweise in Ethanol überführt.

2.16 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay erlaubt als etabliertes Reportergensystem die Aktivität eines Promotors darzustellen. Das zu untersuchende Promotorfragment wird vor das Luciferase Gen kloniert und damit die Transkription des Luciferase Reportergens reguliert.

Xenopus Embryonen, die mit pGL3-Promoterkonstrukten injiziert wurden, werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt. Je Embryo werden 30 µl Lysepuffer zugegeben und die Embryonen mit einem Homogenisator aufgeschlossen. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis, wird bei 12800 rpm für 5 min abzentrifugiert. 90 µl des klaren Überstandes werden im Lumat LB 9507 (Berthold) vermessen. Die angegebenen Werte werden in RLU (relative Lichteinheit) ausgedruckt.

2.17 Präparation animaler Kappen

Die animale Kappe umfasst den animalen, dunkelpigmentierten Pol des Embryos und wird lateral von der marginalen Randzone begrenzt. Mit Hilfe des Modellsystems der animalen Kappe kann der Einfluss von Morphogenen auf die Genexpression in pluripotentem ektodermalen Gewebe untersucht werden. Der Einfluss kann im Ein- bis Vierzellstadium

durch die Mikroinjektion von mRNA, oder nach der Präparation der Kappe durch die Inkubation mit Protein erzeugt werden. Die animale Kappe wird im Stadium 7-8 (Nieuwkoop und Faber, 1967), also vor der Bildung der Keimblätter, präpariert. Mit zwei Pinzetten wird die den Embryo umgebende Vitellinmembran vorsichtig entfernt. Anschließend wird mit einem Mikrodissektor (Gastromaster) die animale Kappe präpariert. Für den Heilungsprozess des sich nun abkugelnden Zellverbands wird die animale Kappe ca. 6 h in einer BSA beschichteten Mikrotiterplatte in Barth-Lösung inkubiert. Parallel dazu werden Kontrollembryonen zur Bestimmung des Entwicklungsstadiums kultiviert. Im entsprechenden Stadium kann die Expression des untersuchten Gens sowohl in whole-mount in situ Hybridisierungsexperimenten, als auch in RT-PCR Experimenten untersucht werden.

2.18 Herstellung transgener Embryonen (nach Sparrow et al., 2000)

Eine Möglichkeit, die räumliche und zeitliche Promotoraktivität im Embryo zu verfolgen besteht in der Restriktionsenzym vermittelten Integration eines Promotor-Reportergen-Konstrukts in das Genom. Die Methode basiert auf der intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI). Der Hoden wird zunächst in kaltem 1 x MMR gewaschen, und unter einem Mikroskop mit feinen Pinzetten die Hoden von umgebenden Gefäßen und Fettanteilen befreit. Nach der Inkubation in 1 x NPB für 5 min wird der Hoden in einer Gewebekulturschale mit einer sterilen Schere mazeriert. Nach zwei Waschschritten in 1 x NPB wird die Spermiensuspension für 10 min bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Das Spermienpellet wird in 250 µl Sperm Storage Buffer aufgenommen, zu 40 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Zur Integration in die genomische DNA werden 200 ng des Promotor-Reportergen-Konstrukt mit einem Restriktionsenzym linearisiert und der vorbereitete Spermienextrakt mit ca. 250000 Zellkernen (Kroll et al., 1996) mit demselben Restriktionsenzym für 15 min bei RT partiell verdaut. Der Spermienextrakt wird mit dem Promotor-Reportergen-Konstrukt inkubiert und mit einer Glaskanüle in die Eizellen injiziert. Die Expression des Transgens kann je nach Reporter unter UV-Licht (GFP) oder durch in situ whole-mount Hybridisierung mit einer antisense Probe untersucht werden.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung und Charakterisierung der FoxD5 Gene von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis*

3.1.1 Vervollständigung der DNA-Sequenz des FoxD5b-Phagenklons F12.2

Die Nukleotidsequenz des FoxD5b-Phagenklons F12.2 war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht vollständig bekannt (Brey A., Diplomarbeit, 1999). Durch Sequenzierungen konnte sowohl eine bestehende Lücke von ca. 0,4 kb geschlossen, als auch die Orientierung des 1,6 kb großen Eco RI-Fragments (Nukleotidposition: 8551-10195) ermittelt werden. Die F12.2-Sequenz umfasst 13687 bp. Der Transkriptionsstart wurde durch ein 5´-RACE-Experiment ermittelt und stimmt mit dem Beginn des am 5´-Ende längsten FoxD5b cDNA-Klons g11.5 (Brey A., Diplomarbeit, 1999) überein.

Die Abbildung 3A zeigt den Aufbau des genomischen FoxD5b Klons F12.2. EcoRI Schnittstellen sind mit E gekennzeichnet. In Abbildung 3B sind die Lage des transkribierten und des translatierten Bereichs (grau unterlegter Bereich) dargestellt.

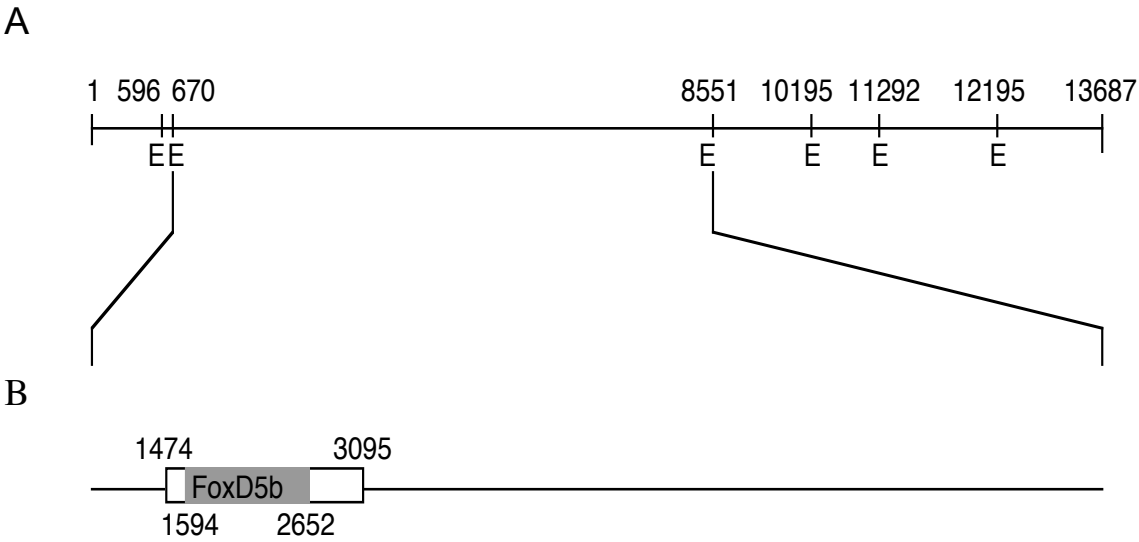


Abb. 3: Aufbau des genomischen Klons F12.2, der das FoxD5b Gen enthält.

A: Darstellung der Lage der Eco RI-Schnittstellen innerhalb des genomischen Klons F12.2.

B: Lage des transkribierten (weiße Box) und translatierten (graue Fläche) Bereichs. Sämtliche Nukleotidpositionen beziehen sich auf den genomischen Klon F12.2.

Die Abbildung 4 zeigt einen Ausschnitt der genomischen Sequenz des Phagenklons F12.2, der das FoxD5b Gen enthält (die vollständige Sequenz ist im Anhang hinterlegt). Die Sequenz beginnt 1474 bp vor dem Transkriptionsstart, der mit +1 angegeben ist. Der transkribierte Bereich umfasst 1621 bp. Die TATA-Box, Startkodon (ATG) und Stopkodon (TAA) sowie das Polyadenylierungssignal sind unterstrichen.

```
AGAGAATTAG TAAATTCAAA GAGATATATA TCACGTTTCA AGGGTGGCAC ACTGCTTCAG ACATTCACTC CGGTGCAAGT TAATAAATAC ATGAAGTTAT          -375
TCAAATACAT TAATGACCAG GAGTTTTTTT CAAATATATA TATACTGCAT TATTAAATCA AGTTGAATAG TGCTGTTCAT ATTGGATTGC AAGTTAGTGG          -275
CTCTTCAGAC CTTGTTGGAC TACAGATTCT AACATCACAT AGATGCATAA GACTTAATTA ATGGTTTATC AATGTATAGC ACAGATACCC CAACTTCATT          -175
CAGCAAAAGC ACAGCCCATG CAAGATCTGA CCCCCCCTCA CTGCCCCTCC CTCCCAGGTG CAGGACCCTC TCACACAAAG GCTTATCTGA TAGATTAGCT          -75
CCAATTCAAG TGCAGATGAC TGCCGGGGCA CAGCAGTGCT CATATAAAGA GGAGGGGGAG AGAGCAAAGA CGT                                    -1

ATCAGTTATC CCCTTAGCCC TTTGGAGACT ACACATTCAC AGAGAGCAGT GGGGAAGCAC AACTCTCACT GGAGATCCTG CTGTCTACTA CCTACTGCCA          100
ACCCAGCATC AGTGCTAGCA ATGAGCTTTA GCCAGGAGTC TGGAACCCAC CATAATTCCC TGGATTATGC AGGAGTCTCT GATGAGGAGG ATGAAATTGA          200
TATTCTTGGA GAAGATGACC CCTGCAGCCT GAAGTCACAC TTTTACCTAC AGCCTACACA TTCAGACATG GGAGACAGTG GGATGCTGAG TCCTTCCAAG          300
CTAAGCTGCA CTGAAAGTGA GAGCGATTCC TCGGGAGAGA GTGAAGGAGG TACTTCTAAA GACTCCCCAG CTACCTCACC TGGTGGCAAA GCCAAAAGGG          400
CCCTGGTAAA GCCTCCTTAC TCTTACATTG CTCTGATCAC CATGGCTATC CTGCAGAGCC CACACAAGAA ACTGACTCTT AGTGGCATCT GTGATTTTAT          500
CAGCAGCAAG TTCCCTTACT ACAAGGACAA GTTCCCTGCT TGGCAGAACT CTATCAGGCA CAACCTGTCC CTTAATGACT GCTTCATTAA AATACCACGG          600
GAACCAGGAA ATCCAGGAAA AGGCAATTAT TGGACACTGG ATCCTGCTTC TGAGGACATG TTTGATAATG GAAGCTTCCT TAGAAGGAGG AAAAGGTTTA          700
AGAGGCACCA ACAGGAGTTC TTTAAGGATG GACTCATGAT GTACAACTCT CTGCCTTACT ACAGACCCTA CAGTGCCCTC CAACCACAGC CAATGCTCCA          800
GCAGACACCA CTGGCATGCA TGGCAATCCC AGAGACCTTG TCTATGCCAA CTAACCTTAC ACCCTACCCA GACATAAAGA GGAAGGCTCA TTACCCAGAC          900
CAGGGGGCAC ACAGGGGTTT TGAGGGCCAG GATGCTAATA ACCATCCAAA TAAGTCTCAG AGCAAGTGTT CATTCAGTAT TGAGAACATC ATGAAGAAAC         1000
CCAAGGAACC AGAGCCAAGT TTTCCAAGCT TCAACTCACA CTGGAACTAT AATAATCACT TATTGCAGAG ACCAAGTTCC TGCTTTCTCC CAGCTGTACT         1100
TAACCTATCC ACTGGCCCTC TGCTAGCTAA TGTCCAGGGC ACCAGGCAAT ACAACCTAAT CAAATTCCCT GGGAGTTATT AAAGTAAGTC ACTTTGGGTC         1200
TCACATAGCC CCAGTACACA GTATGTATTC TGCTACTAGG ACCTTTTTTG TCCAACCCCA AAGACTTTAT TTATTGTCAA AGACAAGGTT ATACAATCTG         1300
TGTCCCTCCA GTTTGTACTG AAGTAACATT TCCAGCACTC CCTAAATTCC ATGGTTGTCA GGGGAAGATG GAAGTTGCAG TTGAATAACA ACTAGAGGGC         1400
TGCTGGTTGT ACATACCTGG ATAGTCATAT GTATTTGTAT GACAACCCCA TGTGGCACAT GTGCTGCTGG ATGCTTGAAT CACTATGGAT TTCCATTCTT         1500
TTGTTTTGTC TTATTTTTCT GTTAATATAT AATGTAAATA GAAATGTAAT CTATTGAACT ATTTATTATC AAAGTTATTG CAACTTTTCA GTCTACTCAT         1600
GCTAAATAAA ATAATTCACA TG                                                                                            1621

AATATACGGA CTGTACATAT TTATTTGCAT ACACAAACAT CCATATAAAC ATTGCTGTAA ATTCTAACAT TATTATGTAC AATCTTGACC ATTTGCCATT         1721
CTTTACCAAA GTATATTCAT ATCTTTCAGG CTGTCTGCCT ATATACCTGT CTGTCCATCT ATCTATCAAT TGCTGTCTAT CTATCTGTCT GTCTGTCTGT         1821
CTCTCTCTCT ATCTATCTAT CTATTATCTA TCTATTGCTG TATATCTATC TATCTATCTA TCTATCTATC TATCTATCTA TCTATCTATC TATCTATCTA         1921
```

Abb. 4: Auschnitt der genomischen Sequenz des Phagenklons F12.2, der das FoxD5b Gen enthält.

3.1.2 Der genomische *Xenopus laevis* FoxD5a-Phagenklon O1

Das Screenen einer genomischen DNA-Bibliothek von *Xenopus laevis* führte zur Isolierung des Phagenklons O1. Als Sonde diente ein Eco RI/Nhe I-Fragment des Phagenklons F12.2 aus dem 5´-Bereich des FoxD5b Gens (Sequenzbereich 670-1587). Restriktionsverdau der Phagen-DNA mit Xba I und Eco RI (Abb. 5A) und anschließender Southern Blot mit derselben DNA-Sonde ergab drei hybridisierende Fragmente, ein Xba I-Fragment von ca. 9 kb Größe und zwei Eco RI-Fragmente von ca. 1,4 kb. Die hybridisierenden Fragmente wurden subkloniert und sequenziert. Ein Sequenzvergleich mit dem am weitesten stromaufwärts reichenden FoxD5a-cDNA-Klon g22.1 (A. Brey, Diplomarbeit, 1999) zeigte, dass die genomische Sequenz 3203 bp vor der cDNA-Sequenz beginnt. Der Transkriptionsstartpunkt wurde durch ein 5´-RACE-Experiment ermittelt. Er befindet sich gegenüber dem Beginn des cDNA-Klons g22.1 um 15 bp

stromaufwärts. Eine TATA-Box befindet sich bei Nukleotidposition 3157, also 31 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt.

Die Abbildung 5B zeigt den Aufbau des hybridisierenden Xba 8,7 kb Fragments. Eco RI Schnittstellen sind mit E gekennzeichnet. In Abbildung 5C sind die Lage des transkribierten Bereichs und die kodierende Region (grau schraffierte Fläche) dargestellt.

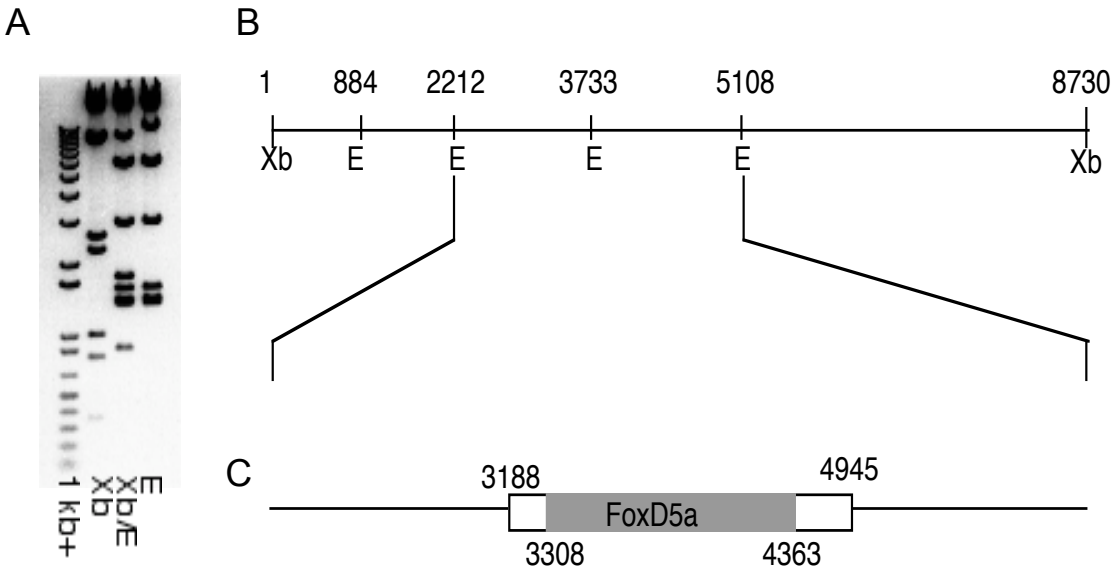


Abb. 5: Aufbau des genomischen Phagenklons O1, der das FoxD5a Gen enthält.

A: Restriktionsverdau der O1-Phagen-DNA mit Xba I, Xba I/Eco RI und Eco RI und anschließende elektrophoretische Auftrennung in einem 0,9%-Agarosegel.

B: Darstellung der Lage der Eco RI-Schnittstellen innerhalb des Xba I 8,7 kb Fragments.

C: Lage des transkribierten (weiße Box) und translatierten (graue Fläche) Bereichs. Sämtliche Nukleotidpositionen beziehen sich auf das genomische Xba I 8,7 kb Fragment.

In Abbildung 6 ist ein Ausschnitt der genomischen Sequenz des FoxD5a Gens dargestellt. Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf den Beginn der Transkription, der mit +1 angegeben ist. Die TATA-Box, Startkodon (ATG) und Stopkodon (TGA) sowie das Polyadenylierungssignal sind unterstrichen. Die vollständige Sequenz des Xba 8,7 kb Fragments ist im Anhang hinterlegt.

```
TGCAACCACC TTTATTATAT GCTATATATA TATACACACA TACATATACA CACACACACA TACACATACT ACATTATTGA ACCATGGCAT GTATTGCAGT          -287
TAATGTTAGA TTGCAAGTTT GTGGTTCTTC AGATCATGTT TGATTACAGA TTCTAGCATC CTATAGATAC ACAAGACTTA TGTAATAGTT TATCAATGTA          -187
TAAAACAGAG ACCCTATCCT TATTCAGCAA CAGCACAACC CATGCAAGGT CTGACTTCCC CTCCCTCCCA GGTGCAGGAC CCTCTCACAC AAAGGGTTAT          -87
CTGACAGATT AACTCCAATT CAAGTGCAGA TGACTGCTGG GGCACACCAG TGCTCATATA AAGAGGAGGG GGAGAGAGCA GGGATAT                       -1

ATCAGTTATC CCCTTAGCCA TTTGGAAACT ACACATTCAC AGAGAGCAGT GGGGAAGCAC AACTCTCACT GGAGATCCTG CTGTCTACTA CTTACTGCCA          100
ACCAAGCATT AGTGCTAACA ATGAGCTTTA GCCAGGAGTC TGGTGCCCAT CATCACCCCC AGGATTATGC AGGACTTTCT GATGAGGAGG ATGAAATTGA          200
TATTCTTGGA GAAGATGATC CCTGCAGCCT AAAGTCACAC TTTTACCTAC AGCCCACACA TTCAGTGATG GGGGACAGTG AGATGCTGAG TCCTTCCAAG          300
CTCAGCTGCA CTGAAAGTGA GAGTGATTCC TCTGGAGAGA GTGAAGGAGG TACTTCTAAA GACTCCTCAA CCACCCCAAC TGGTAGCAAA GCCAAAAGGA          400
CTCTGGTAAA GCCTCCTTAC TCTTACATTG CTCTAATCAC CATGGCTATC CTGCAGAGTC CCCACAAGAA ACTGACTCTC AGTGGCATCT GTGATTTTAT          500
CAGCAGCAAG TTCCCTTACT ACAAGGACAA GTTCCCTGCT TGGCAGAATT CCATCAGGCA CAACCTGTCC CTTAATGACT GCTTTATTAA AATACCACGG          600
GAACCAGGAA ATCCAGGAAA AGGCAATTAT TGGACACTGG ACCCTGCTTC TGAGGACATG TTTGATAACG GAAGCTTCCT TAGAAGGAGG AAAAGGTTTA          700
AGAGGCACCA ACAGGAGTTC TTTAAGGATG GACTTATGAT GTACAACTCT CTGCCTTACT ACAGACCCTA CAGTGCTATC CAACCTCAGC CAGTGCTCCA          800
GCAGACTTCA CTGACATGCA TGGCAATACC AGAGACCTTG CCCATGTCAA CTCACCTTGC ACCCTACCCA GACATAAAGA GGAAGGTTTC TTACCCTGCC          900
CAGGGGGTAC ACAGGGGTTT TAAAGCCCAG GATGCTGATA ACCATCCCAA TAATTCACAG AGCAAATGTT CATTCAGTAT TGAGAACATC ATGAGGAAAC         1000
CCAAGGAGCC AGAGCCAAAT ATTCAAAGCT TCAACTCACA CTGGAACTAT AATCATGTAT TCCAGAGGCC AAGTTCCTGC CTTCTCCCAG CTGTGCTTAA         1100
CTTATCCACT GGCCCTCTGC TAGCCAATAC TCAGGGTGCC AGGCAATACA ACCTCATACA ATTCCCTGGG TGTTACTGAA GTAAGTGACT TTGGGTCTCA         1200
TACAACTCCA GTACTGCCCT CCCATTTTCT TAATATGTTA TTGCTCATGG ATTCTACAAC TAGGACCTTC TTGTGTCCAA ATCCAAAGAC TTTAATTTTA         1300
TTTTTTATTT ATTGTCGAAG ACAAGGTTAT CCAATCTGTG ACCCTCCACT TTGTACTAAA GTAAAATTTC TAGCACCCCC TAAATTACAA GGTTGTCCGG         1400
GAAGGACGGA AGTTGCAGTT CAATAACAGC TAGAGGACCG CTGGTTATAC ATAACCAGAC AGTCATATGT ACTTGTATGA CAACCCAAAC GTGGCACATG         1500
TGCTGCTGGA GGCTTGAATT ACGCTTGAAT CACTATGGAT TTTATGTATA TGTGTGTGAA ATTGTGGCTT AGGATGGCTT AGGATGTCAC TTGGCCCCAG         1600
TGGGCAACGG GTATGCAGTT TTGTAACACC ATCCTTTTGT TTTGTCTTAT TTTACTGTTA ATATATAATG TAAATAGAAA TGTAATCTAT TCAACTATTT         1700
ATTATAAAAG TTATTGCAAC TTTTCAGTCT ACTTATGCTA AATAAAATAA TTCACCTG                                                      1758

AATATACAGA CTGCTAATAT TTATTTCCAT ACACATTCAT TTTCGATTAT CTATCTCTCT TATCTATCTC TCTAGGACAG GGGTCCCCAA CCTTTTTTAC         1858
```

Abb. 6: Sequenzausschnitt aus dem genomischen *Xenopus laevis* Phagenklon O1, der das FoxD5a Gen enthält.

Ein Sequenzvergleich der genomischen FoxD5a Sequenz mit der des Phagenklons F12.2 zeigt für den Bereich der korrespondierenden Anteile eine Homologie von 69%. Im transkribierten Bereichs beträgt die Homologie 84% (Abb. 7).

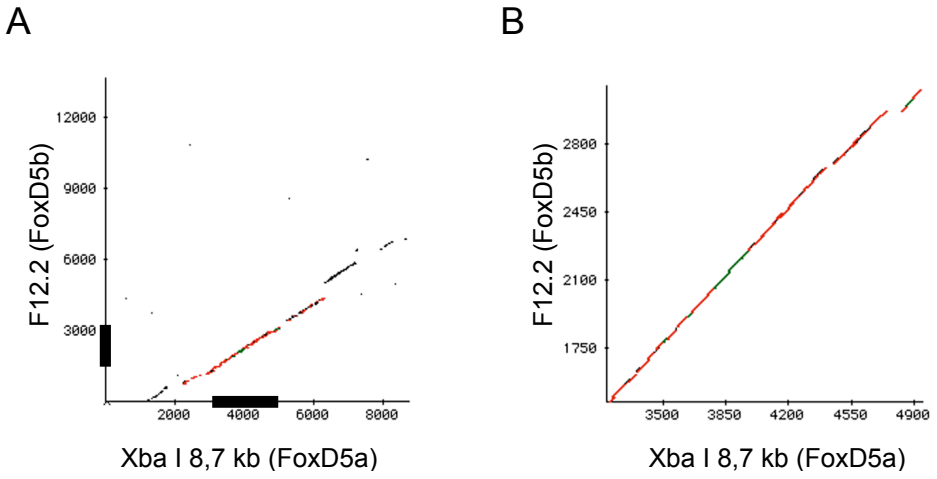


Abb. 7: Sequenzvergleich des Xba I 8,7 kb Fragments (FoxD5a) mit F12.2 (FoxD5b).

A: Vergleich der vollständigen Sequenzen; die Lage des transkribierten Bereichs ist als schwarze Box ersichtlich (MacMolly Tetra 20:3).

B: Ausschnitt von Abb. 7A im Bereich der transkribierten Region.

3.1.3 Der genomische *Xenopus tropicalis* FoxD5-Phagenklon F1

3.1.3.1 Isolierung eines *Xenopus tropicalis* Gens der FoxD5-Gruppe (xtFoxD5)

Das Screenen einer genomischen DNA-Bibliothek von *Xenopus tropicalis* mit der in Kapitel 4.1.2 beschriebenen FoxD5b Eco RI/Nhe I-Sonde führte zur Isolierung des Phagenklons F1. Die Phagen-DNA wurde nach Restriktion mit Eco RI in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt (Abb. 8A) und ein Southern Blot mit derselben Sonde durchgeführt. Es zeigte sich ein hybridisierendes Eco RI-Fragment von ca. 4 kb. Anschließende Subklonierungen und Sequenzierung aller Eco RI-Fragmente ergab eine 10455 bp umfassende Sequenz. Durch ein 5´-RACE-Experiment konnte ein Transkriptionsstartpunkt ermittelt werden, der sich im Vergleich mit den Transkriptionsinitiationsstellen der Gene FoxD5a bzw. FoxD5b 31 bp stromabwärts befindet. In Abbildung 8B ist der Aufbau des Phagenklons F1 dargestellt. Die Eco RI-Schnittstellen sind mit E gekennzeichnet. In Abbildung 8C sind die Lage des transkribierten Bereichs und die kodierende Region (grau schraffierte Fläche) veranschaulicht.

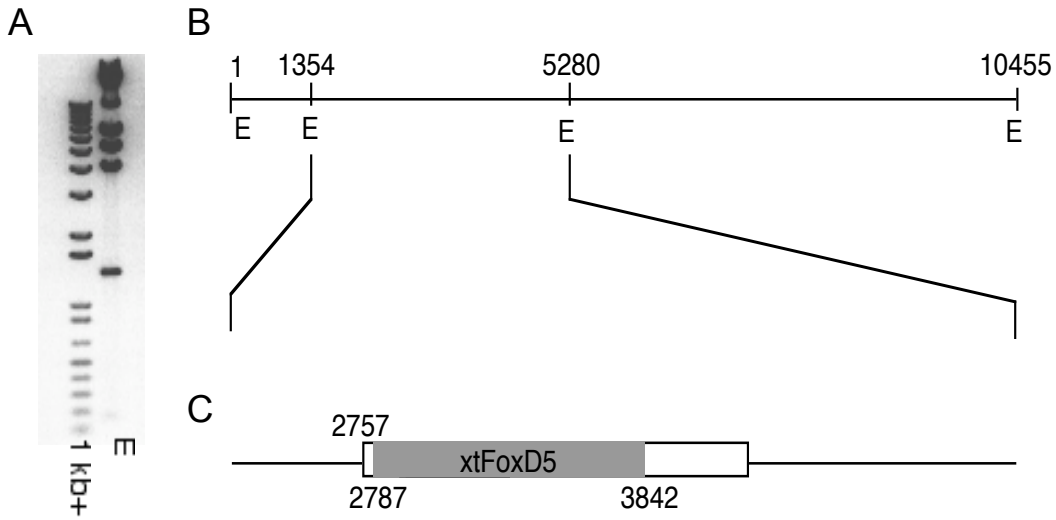


Abb. 8: Aufbau des genomischen *Xenopus tropicalis* FoxD5-Klons F1.

A: Restriktionsverdau der F1-Phagen-DNA mit Eco RI und anschließende elektrophoretische Auftrennung in einem 0,9 % Agarosegel.

B: Darstellung der Lage der Eco RI-Schnittstellen innerhalb des Phagenklons F1.

C: Die Lage des transkribierten (weiße Box) und translatierten (graue Fläche) Bereichs. Sämtliche Nukleotidpositionen beziehen sich auf den Beginn des Phagenklons F1.

In Abbildung 7 ist ein Sequenzausschnitt des Phagenklons F1 dargestellt, der das *Xenopus tropicalis* FoxD5 Gen enthält. Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf die Transkriptionsinitiationsstelle, die mit +1 angegeben ist. Eine TATA-Box (TATAT) befindet sich bei -33, das Startkodon (ATG) bei +31 und das Stopkodon (TGA) bei +1086. Ein mögliches Polyadenylierungssignal ist unterstrichen. Die vollständige Sequenz des Phagenklons F1 ist im Anhang hinterlegt. Die aus der Nukleotidabfolge abgeleitete FoxD5 Proteinsequenz umfasst 352 Aminosäuren.

```
ATATTTTTTT TATTTATTTA TTCTCTCACA AATGTATAAA ATCTGCTATA CAATTTTTAT TTGTAAACCC CTTAGCATAT TTATTTTCAT AAGCTATATA        -356
TATATGTATA TATACATTTG CATTGTTTGA TAATGCAGTT TAGGTTAGAT TTGTTTGCAA GTTTGGTTAG ACTACAGATC CCATACATGC AGTAGACTTA        -256
AGTGATAGTT CATCAGAACT ATATAACAGA TACCCCATCC TCATTCAACA ACAGCACAGC CCATGCAAGT TCTGACCCCC CCCCCTCCCT CAGCTGCCCC        -156
TCCCTCCCAG GTGCAGGACC CTCTCACACA AAGGCTTATC TGACAGATTA GCTCCAATTC AAGTGCAGAT GACTGCAGGG GCACAGCAGT GCTTATATAA        -56
AGAGGAGGGG GAGAGAGCAG GGATATATCA TTCATCCCCT TGGCCCTTTG GAGACT                                                      -1

                                  M  S  L  S  Q  E  S  G  A  H  H  D  P  Q  D  Y  P  V  V  S  A  E  E  D           24
ACACATTCAC AGAAAGCATC AGTGCTAGCA ATGAGCCTTA GCCAGGAGTC TGGTGCCCAC CATGACCCCC AGGATTATCC GGTAGTATCT GATGAGGAGG      100

  E  I  D  I  L  G  E  D  D  S  C  S  L  K  S  H  F  Y  L  Q  P  T  H  S  E  M  G  D  S  G  I  L  S           57
ATGAAATTGA TATTCTTGGA GAAGATGATT CTTGCAGTCT AAAGTCACAC TTTTACCTAC AGCCAACACA TTCAGAGATG GGGGACAGTG GCATTCTGAG      200

  P  S  K  L  S  C  T  E  S  E  S  D  S  S  G  E  S  E  G  G  T  S  K  D  S  P  A  T  P  S  G  G  K           90
CCCTTCCAAG CTAAGCTGCA CTGAAAGTGA GAGCGATTCC TCTGGAGAGA GTGAAGGAGG TACTTCTAAA GACTCCCCAG CCACCCCATC TGGTGGCAAA      300

A  K  R  A  L  V  K  P  P  Y  S  Y  I  A  L  I  T  M  A  I  L  Q  S  P  H  K  K  L  T  L  S  G  I  C          124
GCCAAAAGGG CCCTTGTAAA GCCCCCTTAT TCTTATATTG CTCTAATCAC TATGGCTATC CTGCAGAGCC CACACAAGAA ACTGACTCTC AGTGGCATCT      400

  D  F  I  S  S  K  F  P  Y  Y  K  D  K  F  P  A  W  Q  N  S  I  R  H  N  L  S  L  N  D  C  F  I  K          157
GTGATTTTAT CAGCAGCAAG TTCCCTTACT ACAAGGACAA GTTCCCTGCT TGGCAGAACT CCATCAGGCA CAACCTGTCC CTTAATGACT GCTTTATTAA      500

  I  P  R  E  P  G  N  P  G  K  G  N  Y  W  T  L  D  P  A  S  E  D  M  F  D  N  G  S  F  L  R  R  R          190
AATACCACGG GAACCAGGAA ATCCAGGAAA AGGCAACTAC TGGACCCTGG ACCCTGCCTC TGAGGACATG TTTGATAATG GGAGCTTCCT TAGAAGGCGG      600

K  R  F  K  R  H  Q  Q  E  F  F  K  D  G  L  V  M  Y  N  P  L  P  Y  Y  R  P  Y  S  T  I  Q  P  Q  Q          224
AAAAGGTTTA AGAGGCACCA GCAGGAGTTC TTTAAAGATG GACTTGTGAT GTACAACCCA CTGCCTTACT ACAGACCCTA CAGTACCATC CAACCACAGC      700

  V  L  Q  Q  T  P  V  A  C  M  A  I  P  E  N  L  T  M  P  T  H  L  A  P  Y  P  D  I  K  R  K  V  P          257
AAGTGCTCCA GCAGACTCCA GTGGCATGCA TGGCAATACC AGAAAATTTG ACCATGCCAA CTCACCTTGC TCCCTACCCA GACATAAAGA GGAAAGTTCC      800

  Y  P  D  Q  G  V  H  R  G  F  E  A  L  D  A  D  N  H  P  N  K  S  Q  S  K  C  S  F  S  I  E  N  I          290
TTACCCTGAC CAGGGGGTAC ACAGGGGGTT TGAAGCCCTG GATGCTGATA ACCACCCCAA TAAGTCTCAG AGCAAATGTT CATTTAGTAT TGAGAACATC      900

M  R  K  P  K  E  P  E  P  S  F  S  T  F  N  P  H  W  N  Y  N  H  L  L  Q  R  P  N  S  C  L  L  P  A          324
ATGAGGAAAC CCAAGGAGCC AGAGCCAAGT TTTTCAACCT TTAACCCACA CTGGAACTAT AATCACTTAT TGCAGAGGCC AAATTCCTGC CTTCTCCCAG     1000

  V  L  N  L  S  T  G  P  L  L  S  N  A  Q  G  T  R  Q  Y  N  L  I  K  F  P  G  C  Y                          352
CTGTGCTTAA CCTATCCACT GGCCCTCTGC TATCCAATGC CCAGGGCACC AGGCAATACA ACCTCATAAA ATTCCCTGGG TGTTACTGAA GTAAGTCACT     1100
TTGGGTCTCA CATAGCCCCT GTACTGCCCT ACCCATATCC TTTCAGGATT TTTCCTTATA ACTGGTGGAT TCTGCCACTA GGACTTTCTT GTGTCCAACC     1200
CAGAGATTTT CATTTTATTT ATTGTCAAAG ACAGGTTTAT CCAATCTGCA TCTAGCATCC CCTAAATTAT AAGGTTGTCA GGGGAGATGA TAGTTGCAGT     1300
TCATTAACAG CTGAAGGGCC ACCAGTTGTA AATACCTCGA CAGTCATAAG TACTTGTGTG AGAGCCCCAA GTGGCACATG TGATGCTGGA TGCTTGAATC     1400
GCTATGGATT GTATGTGTAT TTAGAGACAC TGAAATGATG GCTGAGGACT TCACTTGGCC CCTGTGGGCA ACGGGTATGC AGTTTTGTAA TGTCATTTGT     1500
TTGCTTTTAT GTCTTATTTT TCTGTTAATA TTTAATGTAA ATAGAAATGT AATCTATTGA ATTATTTATT ATGAAATTTA TTGCAACTTT TCGCTTCTAC     1600
TCACATGAAT AAAATCATTC AAATGAATAT ACGGACTGTA GATATTTCTT TCCATATACA AACATTCATA TAAACTTTAC TTTCCATCAT CACTTTACAT     1700
CATAATCTTA ATTTGTGCAA TTTCAGGTTC TTTAGCACAA TATTTTCACA GCTTTCTGTC TGTCTGTCAA CATACTTGTT TATCTATCTA TCTATCTATC     1800
TATCATCTAT CTATCCATCT TTCTCTATCT ATATAAAATA TACTTTATAG CCTTTTGTTA AATTGTTATT GCAGCGTGGA ACCAGTCTTT CCAAAACCAG     1900
GTTATAGGTT AACCCTGCTG ATCTTAAAAG TACAATATAA ATTTTCAGCA TAGCAAGAAC ATAACTAACA CTAAACTGCC CATCATTTCT CTACAACAAA     2000
TGTAACAAAT GAATAGGGAG TAAAAACTGT GGGAGGTTCA TTATTTGAAG TATTTAATTT TGGGGGAAAT GTAATTAAAC GTCACACAGT TTAAGATATA     2100
ACAACAATAA ATTCAAATTA ACATTTCCTA TGTCCGATAA TATTTAATAT AAAATTTTAT CACTGAAACC AGTACTCATA CCCGTACATG AATATTATTT     2200
```

Abb. 9: Ausschnitt der Sequenz des Phagenklons F1, der das *Xenopus tropicalis* FoxD5 Gen enthält. Der Transkriptionsstart ist mit +1 angegeben. Die Nukleotidsequenz des kodierenden Bereichs ist grau unterlegt. Die abgeleitete Proteinsequenz ist in blau dargestellt.

Der Vergleich der Nukleotidsequenz des Phagenklons F1 mit den genomischen Sequenzen der *Xenopus laevis* FoxD5 Gene zeigt neben einer starken Homologie der transkribierten Bereiche, konservierte Regionen stromaufwärts und stromabwärts der FoxD5 Gene auf (Abb. 10A und 10B). Im transkribierten Bereich teilt das xtFoxD5 Gen mit FoxD5a eine Homologie der Nukleotidsequenz von 87% (Abb. 10C), mit FoxD5b von 86% (Abb. 10D) und mit der veröffentlichten cDNA des FoxD5c Gens von 82%.

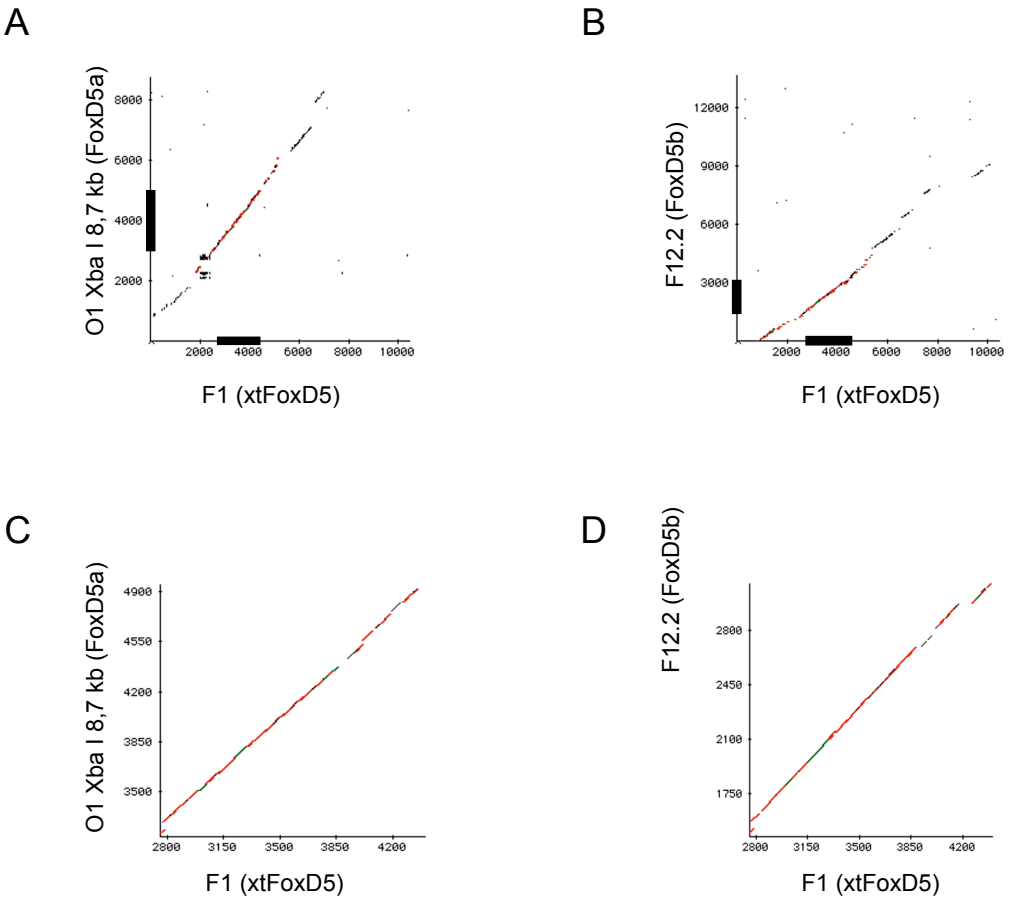


Abb. 10: Vergleich der Nukleotidsequenzen der FoxD5 Gene von *Xenopus tropicalis* und *Xenopus laevis* (MacMolly Tetra 20:3).

A: Graphisches Sequenzalignment der Phagenklone F1 (xtFoxD5) und O1 Xba I 8,7 kb (FoxD5a).

B: Graphisches Sequenzalignment der Phagenklone F1 (xtFoxD5) und F12.2 (FoxD5b).

C: Ausschnitt von Abb. 10A im Bereich der transkribierten Regionen (schwarze Rechtecke).

D: Ausschnitt von Abb. 10B im Bereich der transkribierten Regionen (schwarze Rechtecke).

Auf der Ebene der Proteinsequenz weist das xtFoxD5 Gen mit den Genen FoxD5a und FoxD5b eine Homologie von 88% auf, wohingegen die Homologie mit dem FoxD5c Gen nur 73% beträgt. Wie die *Xenopus laevis* FoxD5 Proteine weist das xtFoxD5 Protein eine charakteristische Aminosäureabfolge auf (Abb. 11). Neben der winged helix Domäne mit zwei Kernlokalisationssignalen (NLS), enthält das xtFoxD5 Protein zwei Regionen, die auch in anderen winged helix Proteinen konserviert sind; eine Häufung saurer Aminoäuren im N-Terminus (Saure Region) und die Region II im C-Terminus (Pani et al., 1992).

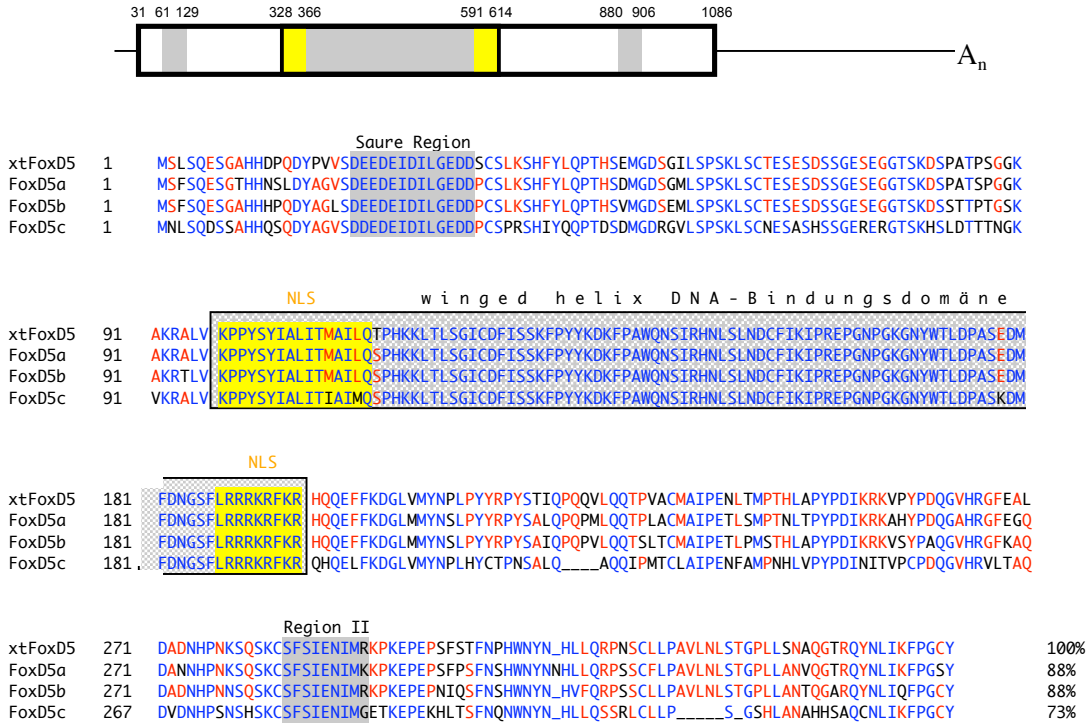


Abb. 11: Schematische Darstellung der *Xenopus tropicalis* FoxD5 mRNA und Vergleich der daraus abgeleiteten Proteinsequenz mit den FoxD5 Proteinen von *Xenopus laevis* (MacMolly Tetra Complign.PPC 3:0).

In blau sind identische Aminosäuren aller 4 Proteine, in rot identische Aminosäuren in 3 der 4 Proteine angegeben. Die winged helix DNA-Bindungsdomäne ist hervorgehoben (schwarzer Kasten). Die Kernlokalisationssignale (NLS) sind gelb und die charakteristischen Regionen (Saure Region und Region II) grau unterlegt.

3.1.3.2 Die Expression des xtFoxD5 Gens in der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus tropicalis*

Die räumliche Expression des *Xenopus tropicalis* FoxD5 Gens während der Entwicklung wurde anhand von whole-mount in situ Hybridisierung-Experimenten studiert.

Als Digoxigenin-markierte Sonde wurde ein Nhe I/Pst I-Fragment aus dem 5´-Bereich innerhalb der transkribierten Region des xtFoxD5 Gens (Phagenklon F1: Nukleotidbereich 2780 - 3121) benutzt.

Die zygotische Transkription des xtFoxD5 Gens beginnt im späten Blastulastadium vor der Entstehung der dorsalen Urmundslippe. Während des frühen Gastrulastadiums können die Transkripte im Bereich des gesamten dorsalen Blastoporus nachgewiesen werden (Abb. 12A und 12B). Die Expression verdichtet sich ab dem mittleren Gastrulastadium in der dorsalen Mittellinie (Abb. 12C) und breitet sich entlang der anteroposterioren Achse aus (Abb. 12D und 12E), wobei die Expression um die dorsale Hälfte des sich schließenden Blastoporus erhalten bleibt. Die Expression beginnt während der Neurulation im Bereich des sich schließenden Neuralrohrs zu verschwinden und bleibt lediglich rostral im Bereich der Kopfregion und kaudal in der Schwanzspitze detektierbar (Abb. 12F). In späteren Entwicklungsstadien finden sich Transkripte in der Grenzregion zwischen Mittel- und Hinterhirn, dem sogenannten Isthmus-Organisator und in der chordoneuralen Umschlagsfalte der Schwanzspitze (Abb. 12G/12H und 12I).

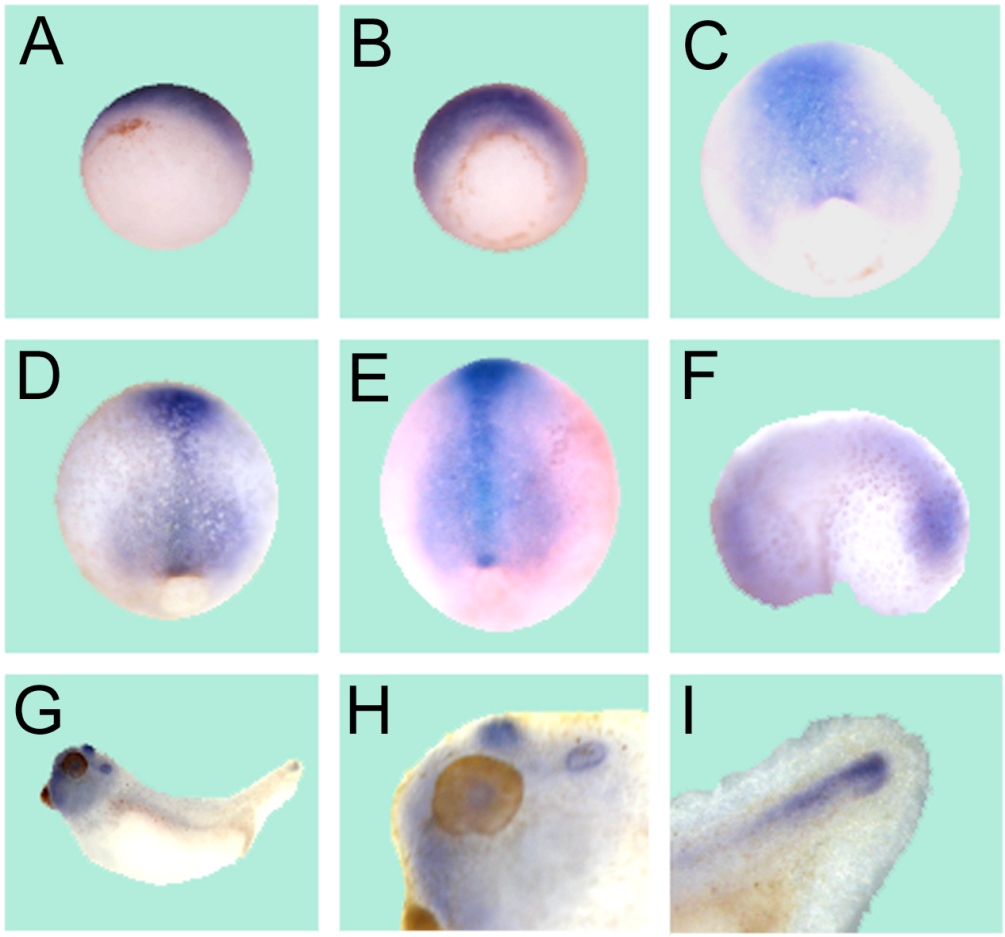


Abb. 12: Whole-mount in situ Hybridisierung zur Analyse der räumlichen Verteilung der xtFoxD5 Transkripte in unterschiedlichen Embryonalstadien. Die Stadienangaben beziehen sich auf die Nomenklatur nach Nieuwkoop und Faber (1967).

A: Stadium 9: Beginn der Expression im Bereich der späteren dorsalen Urmundslippe.

B: Stadium 10,5: Expression um den gesamten dorsalen Blastoporus.

C: Stadium 11,5: Verdichtung der Expression in der dorsalen Mittellinie.

D/E: Stadium 12/12,5: Expression in der Bodenplatte des späteren Neuralrohrs und in der dorsalen Zone um den Blastoporus.

F: Stadium 22: Kaudale Expression in der Schwanzspitze und rostral in der Kopfregion.

G/H/I Stadium 40: Expression in der Grenzzone zwischen Mittelhirn und Nachhirn (G u. H) sowie in der chordoneuralen Umschlagsfalte der Schwanzspitze (I).

3.2 Strukturelle und funktionelle Analyse des FoxD5b-Promotors in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*

Zur Analyse der zeitlichen Aktivierung und der räumlichen Kontrolle der FoxD5 Gene von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* wurde am Beispiel des FoxD5b Gens zunächst eine Analyse der 5´-Promotorregion durchgeführt.

3.2.1 Die 5´-Region

Die stromaufwärts gelegenen Sequenzabschnitte eines Gens spielen für dessen Regulation eine wichtige Rolle. Sie beinhalten den Basalpromotor, der für die Funktion des allgemeinen Transkriptionsapparats notwendig ist, aber auch Sequenzabschnitte, die für die differentielle Genregulation entscheidend sind. Solche Sequenzabschnitte sind zumeist innerhalb verschiedener Organismen konserviert. Ein Vergleich der korrespondierenden 5´-Sequenzen der isolierten FoxD5 Gene zeigt zwei Bereiche großer Sequenzübereinstimmungen (Abb. 13). Einer dieser Bereiche befindet sich unmittelbar vor dem Transkriptionsstart und umfasst ca. 0,2 kb (proximale Region PR). Ein zweiter konservierter Bereich befindet sich beim FoxD5b Gen zwischen -1350 und -1030 (distale Region DR). Die Sequenzvergleiche der proximalen Regionen (PR) und der distalen Regionen (DR) sind in Abb. 14A und 14B ersichtlich.

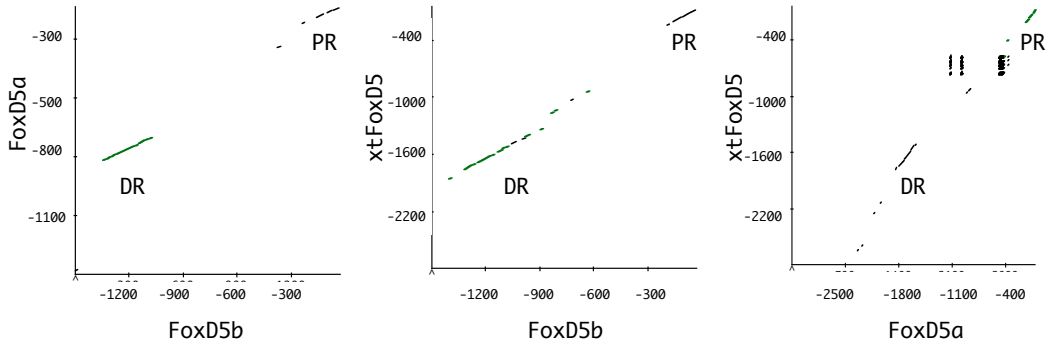
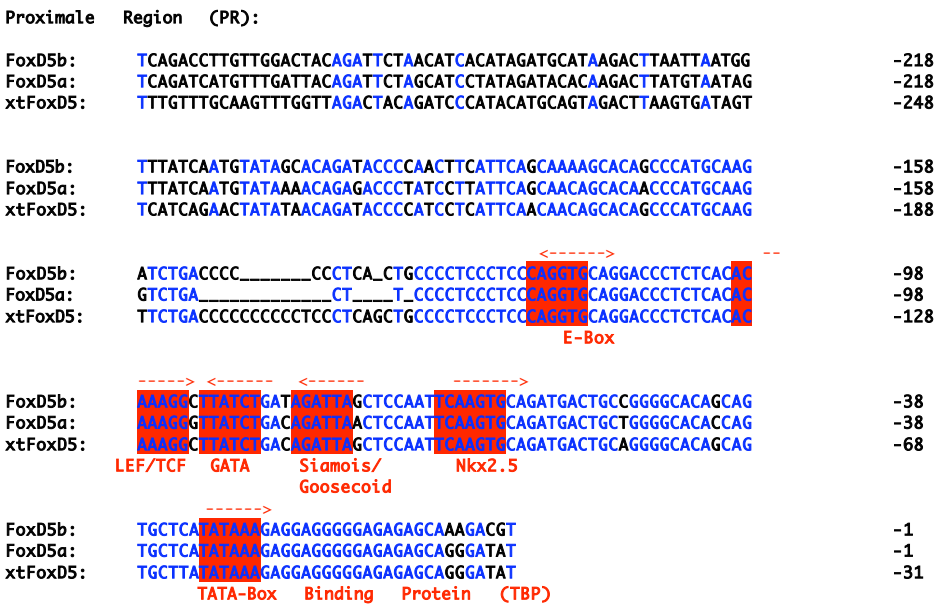


Abb. 13: Graphischer Vergleich der 5´-Promotorsequenzen der FoxD5 Gene von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* (Software: MacMollyTetra Complign.PPC13:0). Die Regionen hoher Homologie sind mit PR für "proximale Region" und DR für "distale Region" gekennzeichnet. Die Nukleotidangaben sind in Relation zum Transkriptionsstart angegeben.

A



B



Abb. 14: Vergleich der 5´-Promotorsequenzen der FoxD5 Gene von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* (sämtliche Nukleotidpositionen in Relation zumTranskriptionsstart).

A: Sequenzalignment der proximalen Regionen der FoxD5 Gene (identische Nukleotide in blau). Mögliche Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren sind rot unterlegt.
Bindungssequenzen: TBP: TATAAA; GATA: (A/T)GATA(A/G); Siamois und Goosecoid: TAATCT; Nkx2.5: TNAAGTG; LEF: (A/T)(A/T)CAA(A/T)GG

B: Sequenzalignment der distalen Regionen der FoxD5 Gene (identische Nukleotide in blau).

3.2.1.1 Promotoraktivität der 5´-Region

Um die Promotoraktivität der 5´-Region des FoxD5b Gens zu untersuchen, wurden aus der genomischen DNA des F12.2-Phagenklons durch Restriktionsverdau oder PCR unterschiedliche Promotorfragmente generiert und vor das Luciferase-Reportergen des pGL3 Vektors (Promega) kloniert. Zu beachten ist dabei, dass die Promotorfragmente des zu untersuchenden Gens den Anfang der transkribierten Region enthalten, aber vor dem Startkodon enden, da sonst bei der Translation des Reporter Gens das Startkodon des zu untersuchenden Gens verwendet wird, was zu einem falschen Leserahmen führen kann. Die für die Injektionsexperimente verwendeten Deletionsmutanten der 5´-Region sind in Abbildung 15 dargestellt.

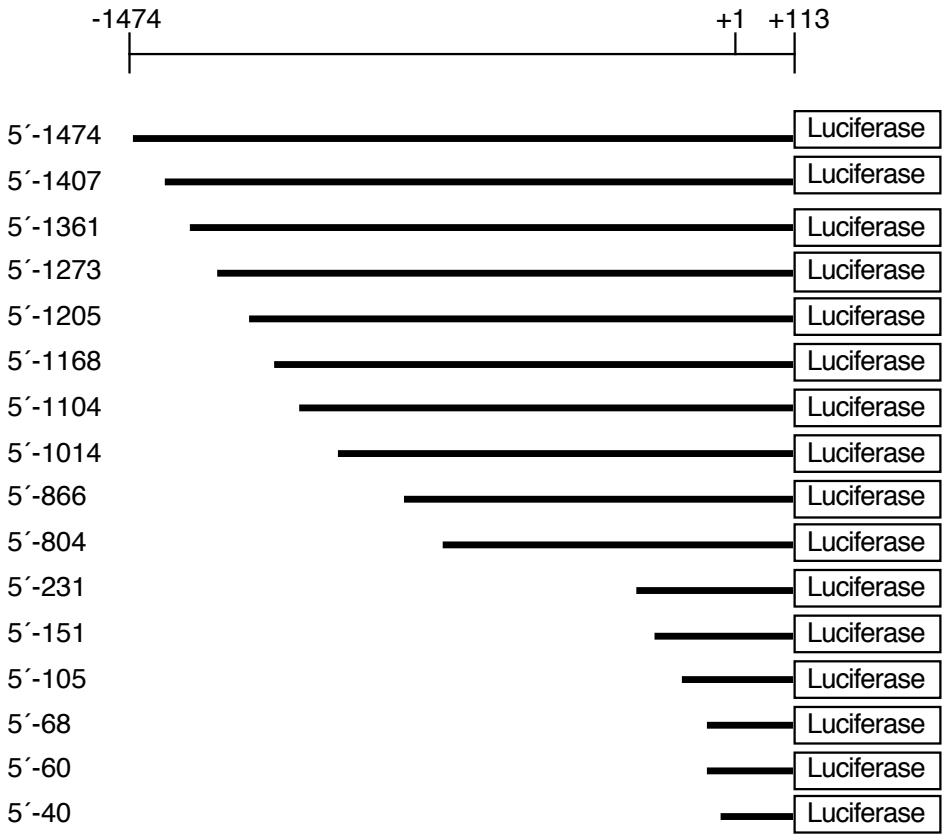


Abb. 15: 5´-Deletionsmutanten des FoxD5b Promotors vor dem Luciferase Gen.
Die Mutanten enden am 3´-Ende mit Nukleotidposition +113 (Translationsstart bei Position +120), der Transkriptionsstart ist mit +1 angegeben.

Zur Angleichung der DNA-Konzentrationen wurden alle DNA-Verdünnungen mittels Restriktionsverdau und Agarosegelelekrophorese dokumentiert und entsprechend angeglichen. Die Konstrukte wurden mit je 20 pg DNA pro Blastomere im Vierzellstadium in beide dorsalen Blastomeren injiziert und die Luciferaseaktivität im Stadium 12 gemessen. Die Δ5´-1474 Deletionsmutante zeigt mit einer 405 fachen Aktivität gegenüber dem Vektor eine starke Promotoraktivität (Abb. 16). Der Abfall der Luciferaseaktivität von der Mutante Δ5´-1474 bis zu der Mutante Δ5´-40 vollzieht sich nicht linear. Ein erster Abfall der Aktivität ist zwischen den Mutanten -1273/-1205 festzustellen. Weitere Aktivitätssprünge kristallisieren sich zwischen den Δ5´-Deletionsmutanten -1014/-1168 und -105/-68 heraus. Unter Berücksichtigung der 5´-Sequenzhomologien der Gene FoxD5a, FoxD5b und xtFoxD5 befinden sich die drei regulatorischen Regionen innerhalb der distalen bzw. proximalen Region hoher Sequenzübereinstimmungen (vgl. Abb. 14).

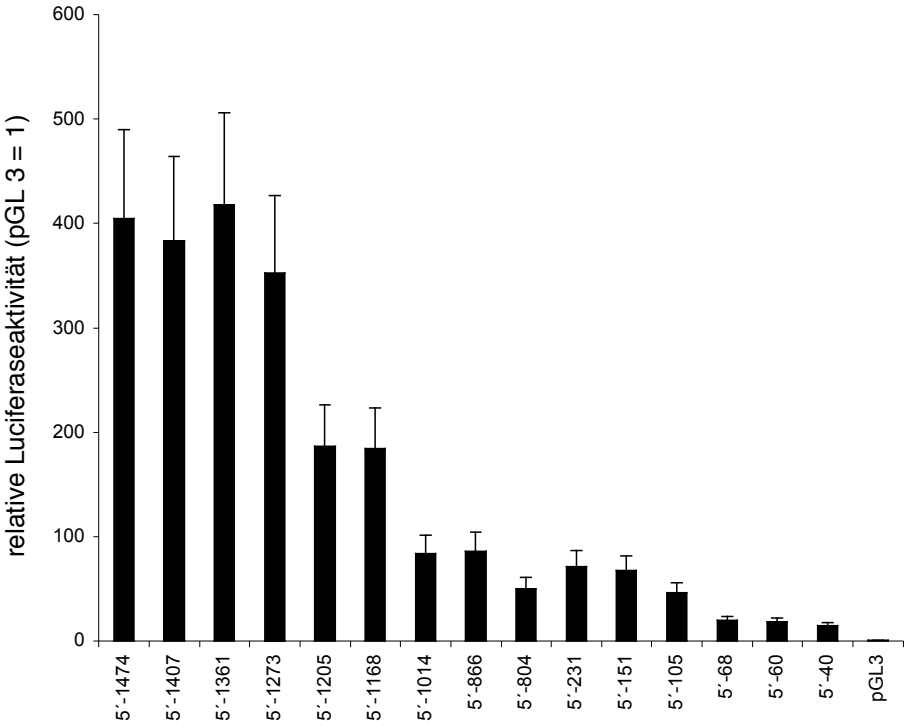


Abb. 16: Promotoraktivität der 5´-Region des FoxD5b Gens. 20 pg DNA der in Abbildung 15 vorgestellten 5´-Deletionsmutanten wurde im Vierzellstadium in beide dorsalen Blastomeren injiziert. Die Embryonen wurden im Stadium 12 homogenisiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Daten ergeben sich aus Mittelwerten von mindestens drei Injektionsexperimenten.

3.2.1.2 Räumliche Kontrolle

Die whole-mount in situ Hybridisierungsdaten zur Lokalisation von Transkripten zeigen am Beginn des Gastrulastastadiums eine vorwiegend dorsale Expression des FoxD5b Gens. Somit stellt sich die Frage, ob die 5´-Promotorregion an dieser räumlichen Kontrolle beteiligt ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurden einige der in Abbildung 15 beschriebenen Deletionsmutanten im Vierzellstadium in beide ventralen oder beide dorsalen Blastomeren injiziert. Die Ergebnisse in Abbildung 17 zeigen, dass die Deletionsmutanten von –231 bis –1361 keinen Unterschied in der räumlichen Expression zeigen. Allein bei der Mutante -1474 ist ein Aktivitätsunterschied von 1,54:1 zugunsten der dorsalen Seite festzustellen. Unter Berücksichtigung der absoluten Aktivitäten weist das Ergebnis auf ein reprimierendes Element zwischen –1361 und –1474 hin, das die Expression auf der Ventralseite unterdrückt.

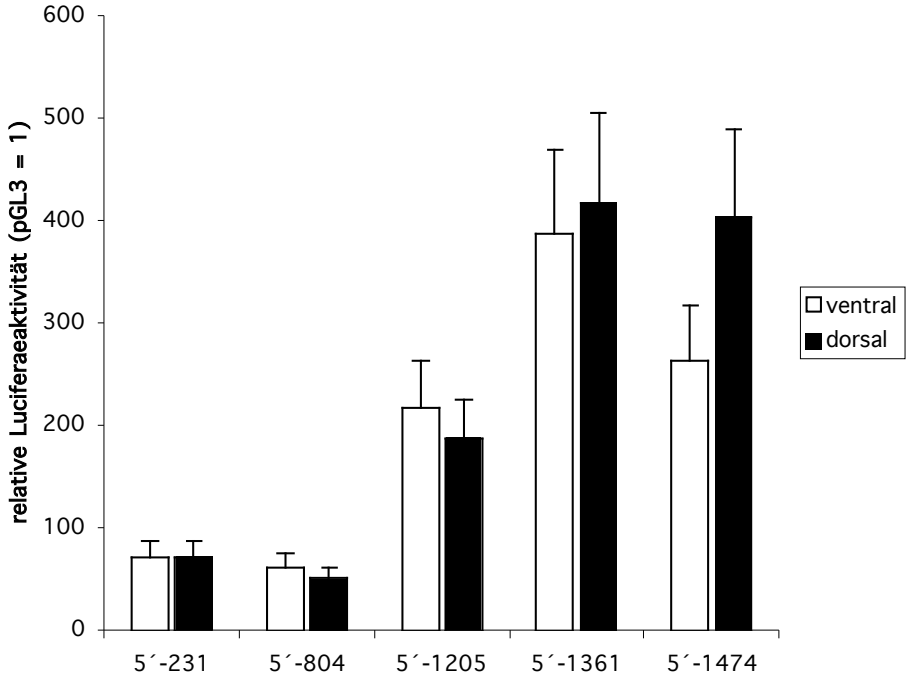


Abb. 17: Promotoraktivität der stromaufwärts gelegenen Region nach ventraler und dorsaler Injektion.
20 pg DNA der in Abb. 12 vorgestellten Deletionsmutanten wurde im Vierzellstadium in beide ventralen oder dorsalen Blastomeren injiziert. Die Embryonen wurden im Stadium 12 homogenisiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Daten ergeben sich aus Mittelwerten von mindestens drei Injektionen.

Zur alternativen Dokumentation der Beteiligung der 5´-Region an der räumlichen und zeitlichen Expression des FoxD5b Gens wurde als Reporter das destabilized enhanced green fluorescent protein d2EGFP (Vektor pd2EGFP-1, Clontech) eingesetzt. Das d2EGFP Protein mit einer kurzen biologischen Halbwertszeit von zwei Stunden ermöglicht gegenüber dem stabilen EGFP Protein die zeitliche Kontrolle der Genexpression besser darzustellen. Die Mutante -1474 wurde vor das d2EGFP Gen kloniert und transgene Xenopusembryonen hergestellt. Die Abbildung 18 zeigt die Verteilung der d2EGFP-Fluoreszenz während verschiedener Entwicklungsstadien. Im Gastrulastadium wird das GFP Gen in der gesamten dorsalen Zirkumferenz um den Blastoporus exprimiert (Abb. 18A und 18B). Während der frühen Neurulation erkennt man eine Fluoreszenz im Bereich des Neuralfeldes (Abb. 18C) und des sich schließenden Neuralrohrs (Abb.18D).

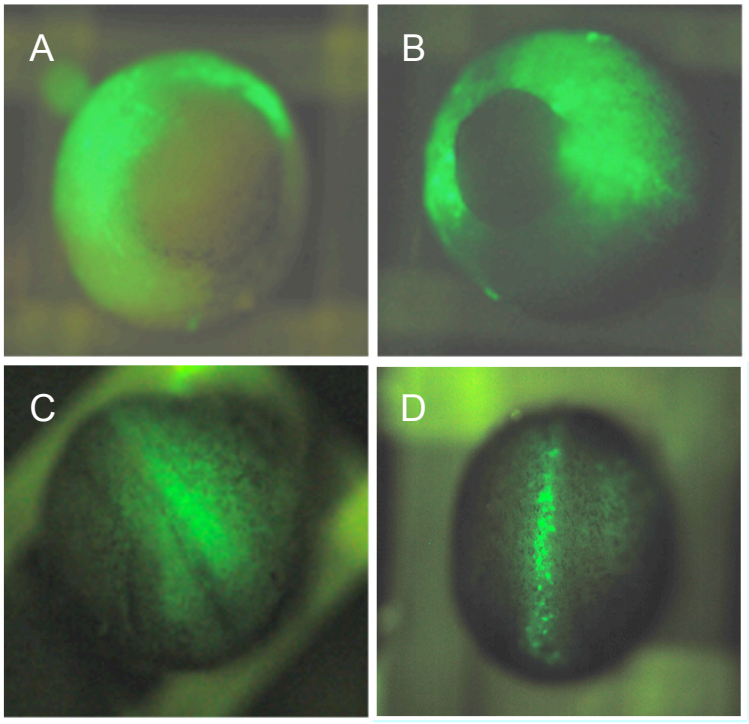


Abb. 18: Räumliche Verteilung des d2EGFP Proteins unter dem Einfluß des FoxD5b 5´-Promotors.

A: Stadium 10,5: Fluoreszenzverteilung um den dorsalen Blastoporus.

B: Stadium 11,5: Fluoreszenzverteilung im Bereich des Spemann-Organisators und der Marginalzone.

C: Stadium 14: Verteilung des d2EGFP Proteins im Bereich der Neuralplatte.

D: Stadium 16: Verteilung des d2EGFP Proteins im Bereich des sich schließenden Neuralrohrs.

3.2.2 Die 3´-Region

3.2.2.1 Enhanceraktivität der 3´-Region

Neben regulatorischen Sequenzbereichen, die sich stromaufwärts eines Gens befinden, sind für viele Gene regulatorische Elemente im transkribierten Bereich, im Intronbereich oder stromabwärts beschrieben. Ob sich im Fall des FoxD5b Gens regulatorische Sequenzelemente im transkribierten Bereich oder in der stromabwärts gelegenen Region befinden, wurde im folgenden untersucht.

Abbildung 19 zeigt einen Vergleich korrespondierender Sequenzen der 3´-Regionen der FoxD5 Gene FoxD5a, FoxD5b und xtFoxD5. Die Regionen hoher Sequenzübereinstimmungen sind mit H1 bis H3 bzw. H1´ bis H5´ gekennzeichnet. Ausgehend von der F12.2 Sequenz erkennt man homologe Bereiche aller drei genomischen Sequenzen von Nukleotidposition 3200 bis 4500 ($H_{1/1´}$), von 4800 bis 5900 ($H_{2/2´}$) und von 6400 bis 6700 ($H_{3/3´}$).

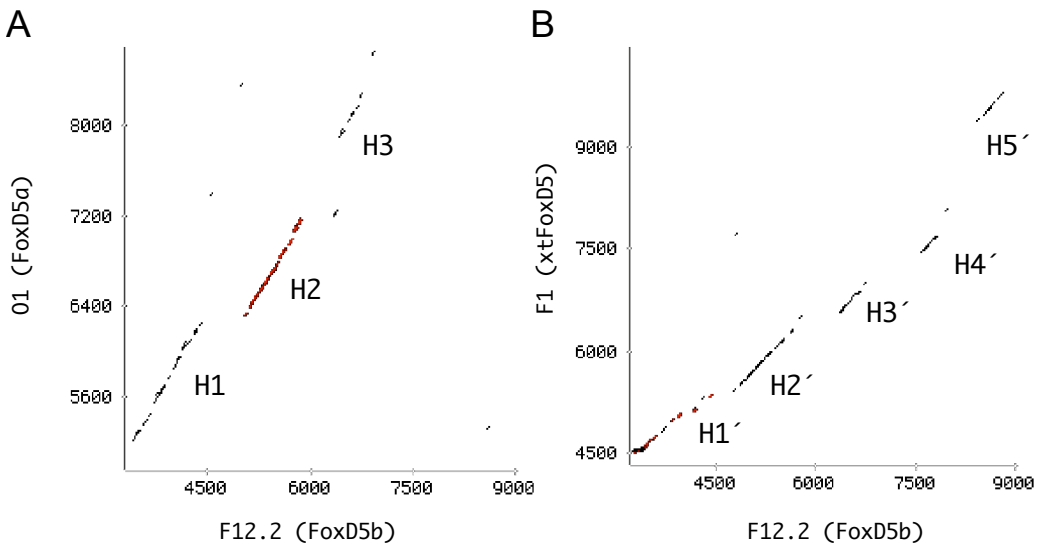


Abb. 19: Graphischer Vergleich der korrespondierenden 3´-Regionen der Gene FoxD5b und FoxD5a (Abb. 19A) sowie FoxD5b und xtFoxD5 (Abb. 19B).

Regionen hoher Sequenzübereinstimmungen sind mit H1 bis H5 bzw. mit H1´ bis H5´ gekennzeichnet. Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf die genomischen Phagenfragmente F12.2 (FoxD5b), O1 (FoxD5a) und F1 (xtFoxD5) (Software: MacMollyTetra Complign.PPC 20:3).

Für die Analyse der Promotoraktivität der 3´-Region wurde zunächst ein BamH I/Xho I Fragment des Phagenklons F12.2, das einen Großteil der transkribierten Bereichs des FoxD5b Gens und 4 kb stromabwärts umfasst (Nukleotidbereich +638 bis +5765), hinter das Luciferase Gen der 5´-Promotorkonstrukte –1474, -151 und –68 kloniert (vgl. Abb. 20). Die Fusionskonstrukte werden im weiteren mit 5´–1474-B/X, 5´-151-B/X und 5´–68-B/X bezeichnet.

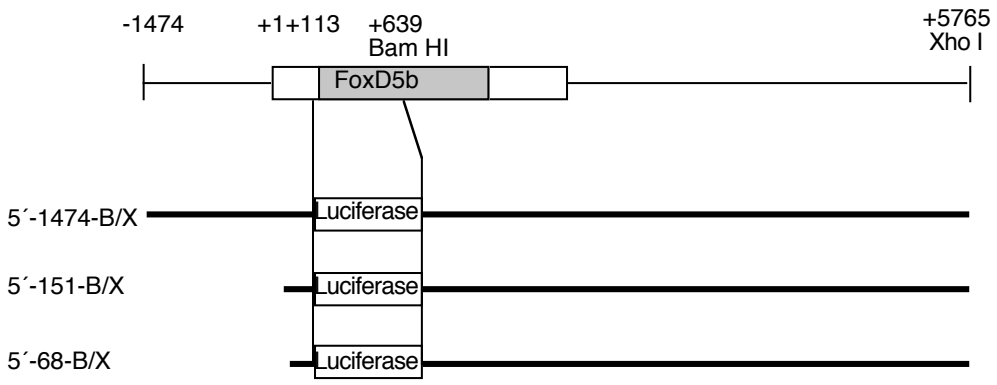


Abb. 20: Fusionskonstrukte des Bam HI/Xho I-Fragments aus dem 3´-Bereich des FoxD5b Gens mit verschiedenen Deletionsmutanten der 5´-Region zur Untersuchung der Promotoraktivität der 3´-Region. Der translatierte Bereich des FoxD5b Gens ist grau hinterlegt. Das Bam HI/Xho I-Fragment wurde hinter das Luciferase Gen der 5´-Promotorkonstrukte in die Restriktionschnittstellen Bam HI/Sal I kloniert.

Die Fusionskonstrukte sowie die entsprechenden 5´-Mutanten wurden im Vierzellstadium in die dorsalen Blastomeren injiziert und die Luciferaseaktivität im Stadium 12 bestimmt. Die Injektion der Fusionskonstrukte führte bei den Mutanten 5´–1474-B/X und 5´–151-B/X zu einer deutlichen Steigerung der Luciferaseaktivität gegenüber den korresponierenden 5´-Mutanten, das Fusionskonstrukt 5´–68-B/X zeigte im Vergleich mit der 5´-Mutante –68 keine relevante Aktivitätssteigerung (Abb. 21). Dieses Ergebnis weist auf mindestens ein Enhancerelement im 3´-Bereich des FoxD5b Gen hin. Der Enhancer bewirkt eine über siebenfache Steigerung gegenüber der 5´-Region allein, benötigt aber Sequenzelemente des 5´-Promotorbereichs von –68 bis –151 für seine Aktivität.

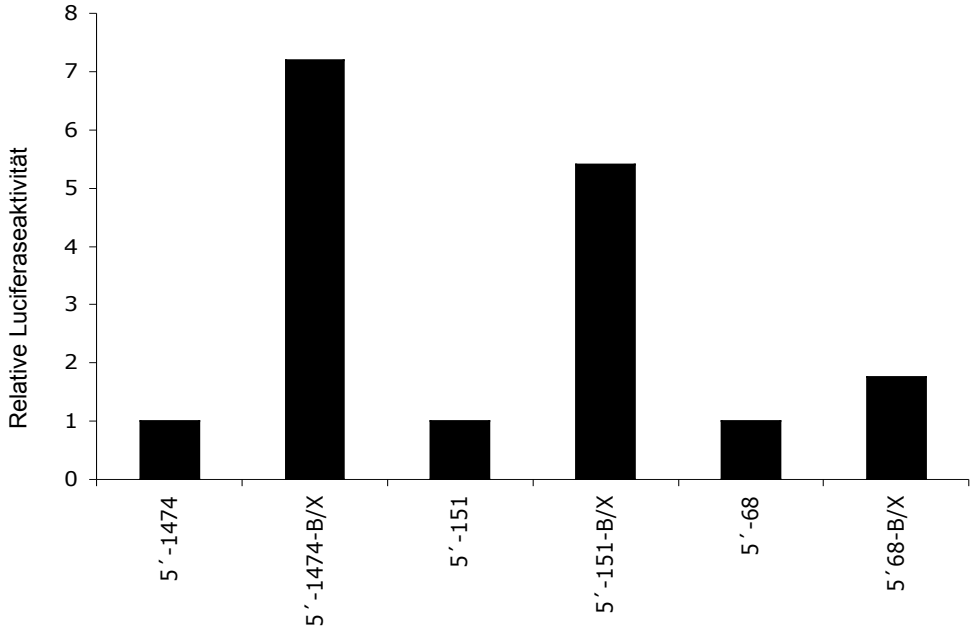


Abb. 21: Darstellung der relativen Luciferaseaktivitäten der Fusionskonstrukte 5´-1474-B/X, 5´-151-B/X und 5-68-B/X gegenüber den korrespondierenden 5´-Deletionsmutanten. Die Aktivität der jeweiligen 5´-Deletionsmutanten wurde als 1 festgesetzt

3.2.2.2 Räumliche Kontrolle

Analog zur Analyse der räumlichen 5´-Promotoraktivität wurde die räumliche Expression des Fusionskonstrukts 5´-1474-B/X im Vergleich zur 5´-Mutante allein mit vergleichenden Injektionsexperimenten analysiert. Neben der in Kapitel 3.3.2.1 beschriebenen Enhanceraktivität zeigt das Fusionskonstrukt bei dorsoventralem Vergleich eine Steigerung der Aktivität auf der Dorsalseite um 97%.

Zur exakten Darstellung der räumlichen Aktivität des 3´-Bereichs konnten sowohl Luciferase whole-mount in situ Hybridisierungsexperimente, als auch 5´-1474-B/X-d2EGFP transgene Embryonen beitragen. Äquivalente DNA-Mengen der Luciferasekonstrukte 5´-1474 oder 5´-1474-B/X wurden in Embryonen des Vierzellstadiums in alle 4 Blastomere injiziert, und die räumliche Verteilung der Luciferase mRNA anhand von whole-mount in situ Hybridisierungen analysiert. Im Vergleich der Farbreaktionen zeigen die 5´-1474-B/X injizierten Embryonen bei gleicher zeitlicher Substratexposition sowohl ein deutlich stärkeres Signal (Abb. 22C und 22D), als auch eine der Wildtypexpression entsprechende Verteilung der Transkripte der dorsalen Blastoporuslippe, im Neuroektoderm und in der Schwanzspitze (Abb.22A und22B).

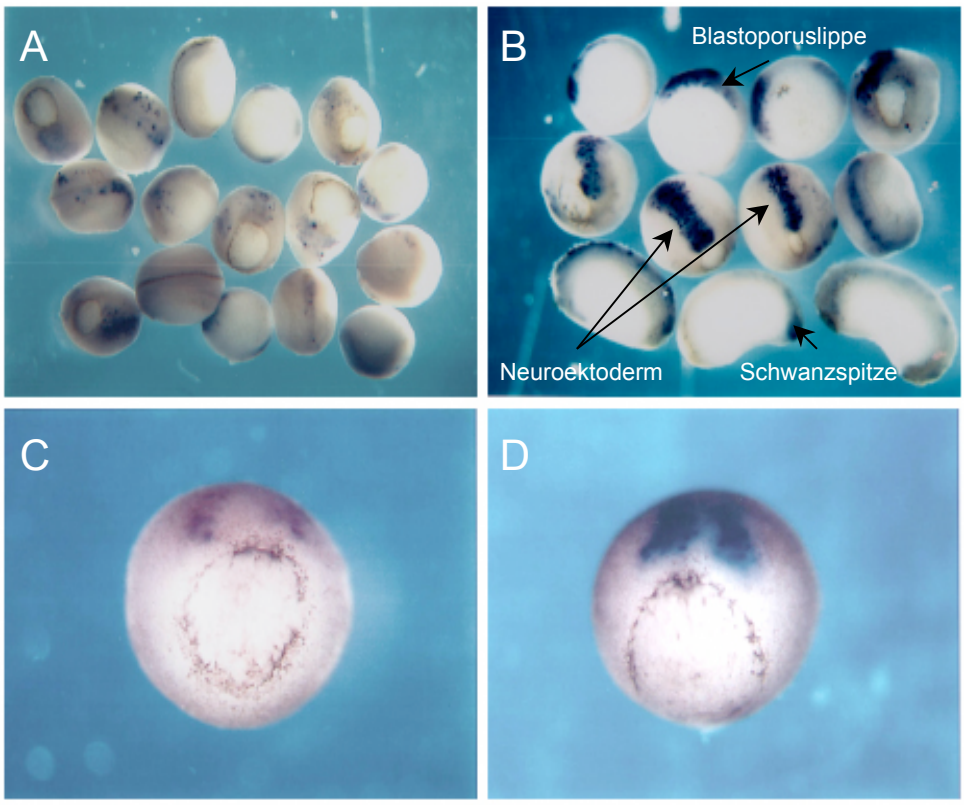


Abb. 22: Luciferase whole mount in situ Hybridisierungen nach Injektion von je 100 pg DNA der Promotorkonstrukte 5´-1474 bzw. 5´-1474-B/X in alle 4 Blastomeren im Vierzellstadium. Die in situ Hybridisierungen wurden mit einer DIG-markierten antisense Sonde des Luciferase Gens an Embryonen der Stadien 10 bis 18 durchgeführt.

A: Anti-Luciferase in situ Hybridisierung der 5´-1474 Mutante (Übersichtsaufnahme)

B: Anti-Luciferase in situ Hybridisierung der 5´-1474-B/X Mutante (Übersichtsaufnahme)

C: Anti-Luciferase in situ Hybridisierung der 5´-1474 Mutante (Stadium 11)

D: Anti-Luciferase in situ Hybridisierung der 5´-1474-B/X Mutante (Stadium 10,5)

Das d2EGFP Protein der 5´-1474-B/X-d2EGFP transgenen Embryonen ist im frühen Gastrulastadium in einem Bereich um den dorsalen Blastoporus lokalisiert. Im frühen Neurulastadium kann die Fluoreszenz im Bereich der gesamten, nach anterior wandernden Neuralplatte detektiert werden. Im Stadium der Neuralfaltenbildung verdichtet sie sich in der Mittellinie, der späteren Grundplatte des Neuralrohrs.

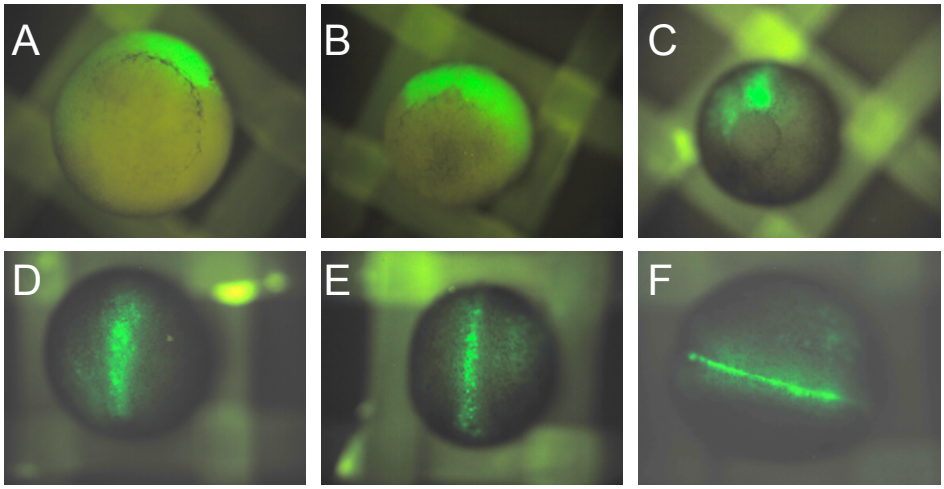


Abb. 23: Räumliche Verteilung des d2EGFP Proteins unter dem Einfluß des 5´-1474-B/X Konstrukts

A: Stadium 10: Fluoreszenzverteilung in der dorsalen Urmundslippe.

B: Stadium 10,5: Fluoreszenzverteilung im Bereich des Spemann-Organisators

C: Stadium 12: Verteilung des d2EGFP Proteins im Neuroektoderm

D: Stadium 13: Verteilung des d2EGFP Proteins im Bereich des nach anterior wandernden Neuroektoderms

E: Stadium 15: Verteilung des d2EGFP Proteins in der Mittellinie der Neuralplatte

F: Stadium 17: Detektion des d2EGFP Proteins innerhalb der Neuralfalten

3.2.2.3 Eingrenzung eines Enhancerelements

Es stellt sich die Frage, welche Region(en) des 3´-Bereichs für die stimulierende Aktivität und die räumliche Expression verantwortlich ist (sind). Verschiedene Deletionsmutanten der 3´-Region wurden hinter die Mutante 5´-1474 oder hinter die Mutante 5´-151 kloniert und die Enhanceraktivität der Fusionskonstrukte in Mikroinjektionsexperimenten überprüft. Die Abbildung 24 veranschaulicht die eingesetzten Deletionsmutanten der 3´-Region.

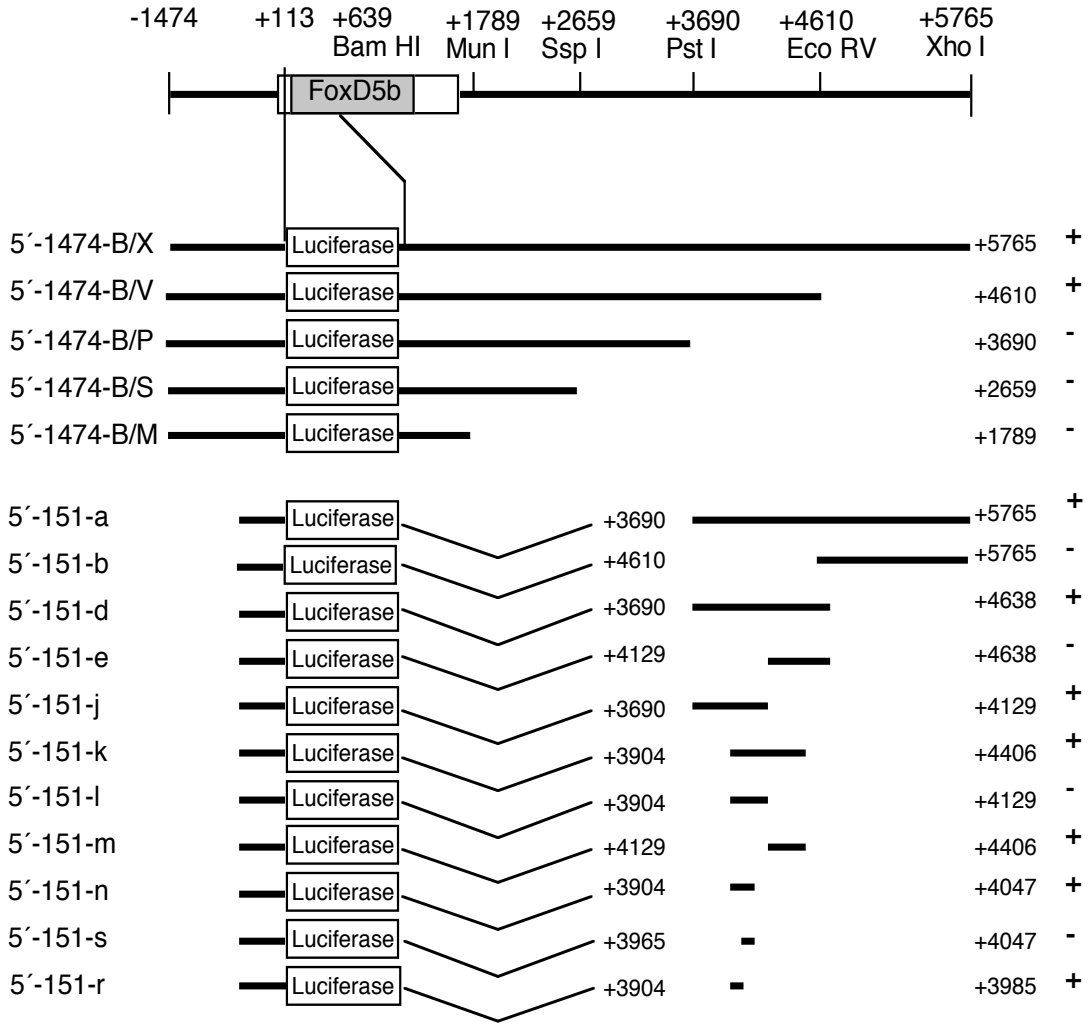


Abb. 24: Schematische Darstellung verschiedener Fusionskonstrukte der 5´- und der 3´-Region zur Eingrenzung eines Enhancerelements im 3´-Bereich des FoxD5b Gens. Sämtliche Nukleotidpositionen beziehen sich auf den Transkriptionsstart (+1). Die Angabe +/- neben der Darstellung der Fusionskonstrukte gibt an, ob die Reportergenaktivität gegenüber den 5´-Deletionsmutanten 5´-1474 bzw. 5´-151 um mehr als 200% gesteigert wird.

Der Enhancer der 3´-Region wurde zunächst mit Fusionskonstrukten der längsten 5´-Mutante eingegrenzt. Die Mutanten 5´-1474-B/X und 5´-1474-B/V zeigen gegenüber der kürzeren Mutante 5´-1474-B/P eine deutlich höhere Aktivität (Abb. 25). Somit befindet sich das Enhancerelement zwischen den Nukleotidpostionen +3690 und +4610. Zur weiteren Einengung

des Enhancerbereichs wurden die in Abb. 24 dargestellten 5´-151 Fusionskonstrukte eingesetzt. Das kürzeste Fusionskonstrukt, das gegenüber der Mutante 5´-151 allein eine Steigerung der Reporteraktivität zeigte, war die Mutante 5´-151-r, die den Stromabwärtsbereich des FoxD5b Gens von +3904 bis +3985 umfasst.

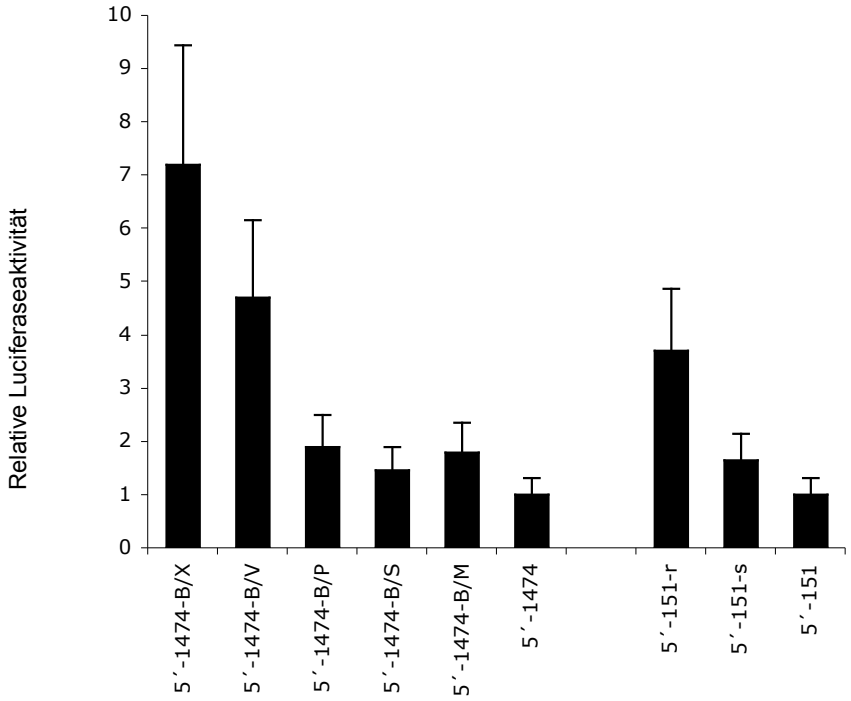


Abb. 25: Eingrenzung eines Enhancerelements im 3´-Bereich des FoxD5b Gens.
20 pg DNA der in Abb. 24 vorgestellten Fusionskonstrukte wurde im Vierzellstadium in beide dorsalen Blastomeren injiziert. Die Embryonen wurden im Stadium 12 homogenisiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Luciferaseaktivitäten der jeweiligen Fusionskonstrukte sind in Relation zu den 5´-Deletionsmutanten 5´-1474 bzw. 5´-151 angegeben. Die Daten ergeben sich aus Mittelwerten von mindestens drei Injektionsexperimenten.

3.3 Die Regulation des FoxD5b Gens und des Promotors

3.3.1 Die Regulation des FoxD5b Gens durch den BMP-4 Signalweg

Der Einfluss verschiedener Morphogene und Transkriptionsfaktoren auf die Regulation des FoxD5b Gens wurde bisher im ganzen Embryo und in animalen Kappen untersucht. Ein Morphogen, das die Expression des FoxD5b Gens beeinflusst, ist das Bone morphogenetic protein BMP-4. Die ektopische Expression des BMP-4 Gens auf der Dorsalseite bewirkt eine Reprimierung der FoxD5b Wildtypexpression (Sölter et al., 1999).

Durch die ektopische Expression des Organisatorgens Chordin (Sasai et al., 1995), das BMP-4 extrazellulär bindet und damit die Rezeptorbindung verhindert, bzw. durch die Expression des trunkierten BMP-Rezeptors (Graff et al., 1994) wurde untersucht, ob die Blockade des BMP-4-Signalwegs ausreicht, um das FoxD5b Gen zu aktivieren. Die Embryonen wurden im Vierzellstadium auf der Ventralseite mit 800 pg Chordin mRNA bzw. mit 1 ng mRNA des trunkierten BMP-Rezeptors injiziert und im Stadium 11 fixiert. Mit einer antisense Sonde gegen Transkripte des FoxD5b Gens wurde eine whole-mount in situ Hybridisierung durchgeführt. Wie in Abbildung 26 ersichtlich, führt sowohl die Expression von Chordin als auch die Expression des trunkierten BMP-Rezeptor auf der Ventralseite zu einer Aktivierung des Foxd5b Gens. Damit reicht die Blockade des BMP-4-Signalwegs auf der Ventralseite des Embryos aus.

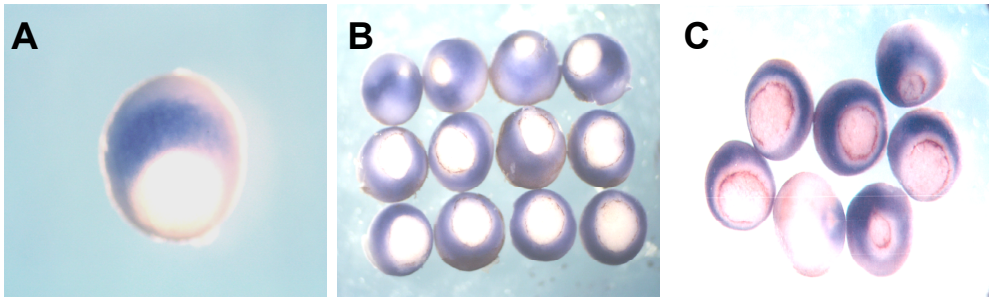


Abb. 26: Whole-mount in situ Hybridisierung zur Untersuchung der FoxD5b Expression nach ektopischer Expression von Chordin und des trunkierten BMP-Rezeptors (tBR) auf der Ventralseite des Embryos.

A: Kontrollembryo des Stadiums 11.

B: Injektion von 0,8 ng Chordin mRNA; im Stadium 11 fixiert.

C: Injektion von 1,0 ng tBR mRNA; im Stadium 11 - 12,5 fixiert.

Des weiteren stellte sich die Frage, welche Komponenten des BMP-4 Signalwegs die Reprimierung durch BMP-4 nachahmen können.

Embryonen im 4-Zell-Stadium wurden in beide dorsalen Blastomere mit rekombinanter mRNA der BMP-4-Targetgene Msx-1 (Suzuki et al., 1997), Xvent-2 oder Xvent-1 (Onichtchouk et al., 1996) injiziert, im Stadium 11 fixiert, und die FoxD5b Expression mittels whole-mount in situ Hybridisierung untersucht (Abb. 27). Bei den Injektionen mit BMP4, Msx-1 und Xvent-2 erkennt man gegenüber der Kontrolle eine deutliche Reprimierung der FoxD5b Expression auf der gesamten dorsalen Seite. Die Injektion von Xvent-1 führt , wenn überhaupt, nur zu einer schwachen Reprimierung der Expression in der dorsalen Marginalzone.

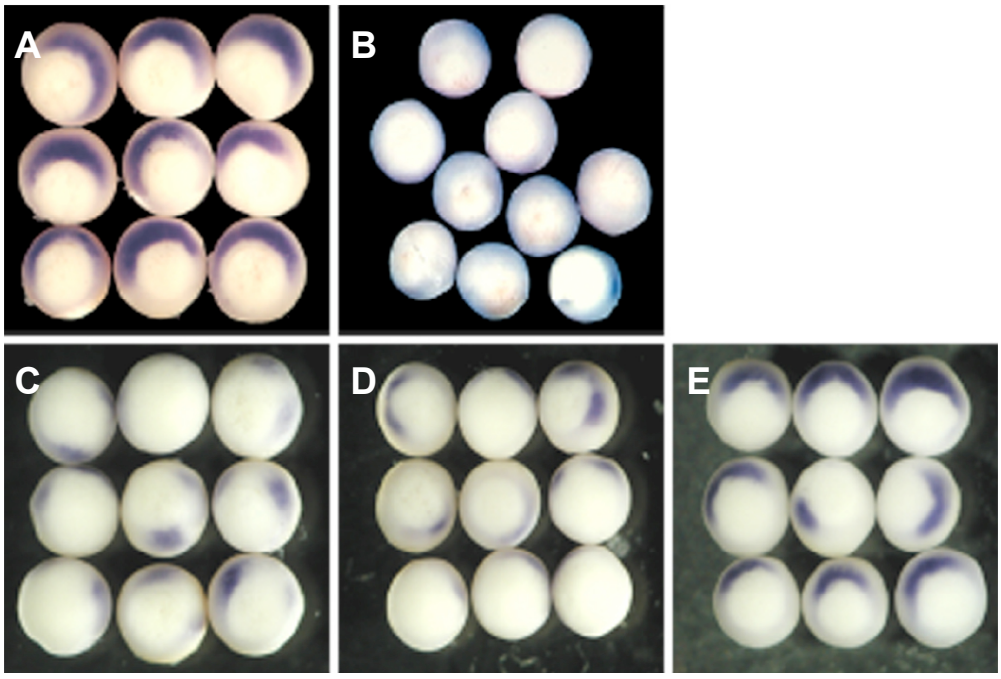


Abb. 27: Whole-mount in situ Hybridisierung zur Untersuchung der FoxD5b Expression nach ektopischer Expression unterschiedlicher Signalkomponenten der BMP-4-Kaskade im Vierzellstadium.

A: Kontrolle eines im Stadium 10,5 fixierten Embryos

B: BMP-4 mRNA 0,4 ng/Blastomere dorsal injiziert, im Stadium 10,5 fixiert.

C: Msx-1 mRNA 0,4 ng/Blastomere dorsal injiziert, im Stadium 11 fixiert.

D: Xvent-2 mRNA 0,4 ng/Blastomere dorsal injiziert, im Stadium 11 fixiert.

E: Xvent-1 mRNA 0,5 ng/Blastomere dorsal injiziert, im Stadium 11 fixiert.

Der Einfluß des BMP-4 Signalwegs auf die Reporterkontstrukte des FoxD5b Promotors wurde mit Koinjektionsexperimenten untersucht. Für die Koinjektionsexperimente wurde zunächst die längste 5´-Mutante –1474 ausgewählt und in vitro transkribierte BMP-4 mRNA (pSP64T-Vektor, SP6 Polymerase) sowie Chordin mRNA (pRN-Vektor, T3 Polymerase) hergestellt. Durch die Koinjektion der Mutante –1474 in Vierzellembryonen auf der Dorsalseite mit 800 pg BMP-4 mRNA wurde die Reportergenaktivität um 51% unterdrückt. Auf der Ventralseite ergab sich bei der Koinjektion mit 200 pg Chordin mRNA eine Stimulation um 99% (Abb. 28). Somit befindet sich im 5´-Promotorbereich des FoxD5b Gens ein BMP-4 response Element.

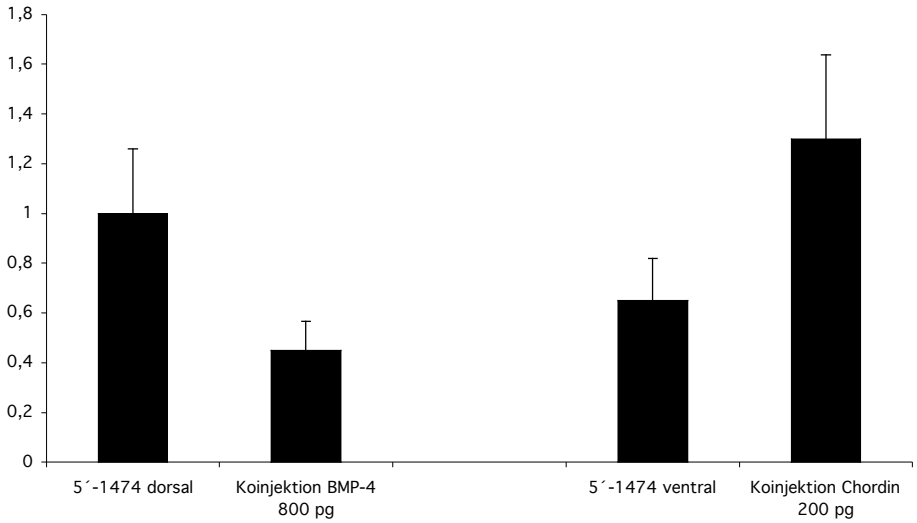


Abb. 28: Der Einfluß von BMP-4 mRNA- und Chordin mRNA-Koinjektionen auf die Reportergenaktivität der 5´-Deletionsmutante –1474 (Aktivität 5´-1474 dorsal =1).
Embryonen des Vierzellstadiums wurden mit 40 pg des Konstrukts –1474 entweder in beide ventralen oder in beide dorsalen Blastomere injiziert. Ein Teil der dorsal injizierten Embryonen wurden mit 400 pg BMP-4 mRNA dorsal koinjiziert und ein Teil der ventral injizierten Embryonen mit 200 pg Chordin mRNA injiziert. Die Darstellung ergibt sich aus mindestens vier Injektionsexperimenten.

Zur Eingrenzung des Sequenzbereichs, der für die Repression durch BMP-4 verantwortlich ist, wurden unterschiedliche Mutanten mit 400 pg BMP-4 mRNA in die dorsalen Blastomere von Embryonen des Vierzellstadiums injiziert und die Luciferaseaktivität im Stadium 12 gemessen (Abb. 29). Die Koinjektionen führten bei der Mutante –151 und den längeren Mutanten –804 und –1474 zu einer deutlichen Reduktion der Luciferaseaktivität, die Aktivität der Mutante –68

blieb von der Koinjektion unbeeinflusst. Somit weist dieser Befund auf ein BMP-4 response Element zwischen -151 und -68 hin.

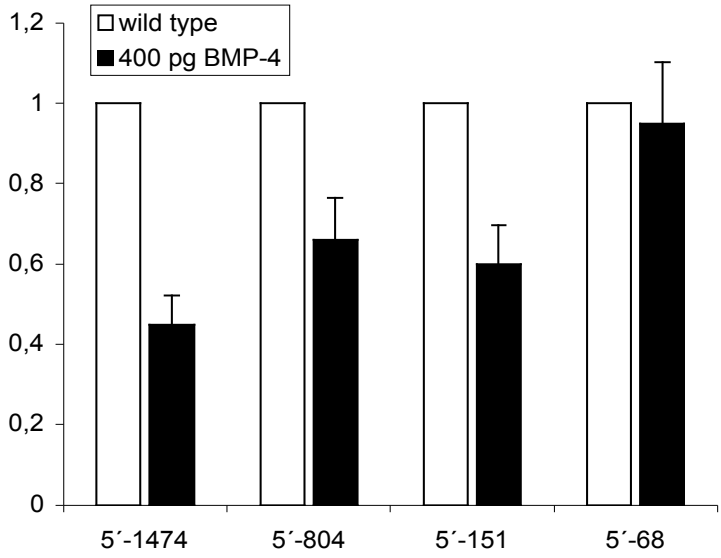


Abb. 29: Koinjektionsexperimente mit BMP-4 mRNA.
Koinjektion von 20 pg DNA der Promotorkonstrukte und 400 pg BMP-4 mRNA pro Blastomere in die dorsalen Blastomere von Embryonen des Vierzellstadiums. Bestimmung der Luciferaseaktivität im Stadium 12. Die Daten ergeben sich als Mittelwerte aus mindestens zwei Injektionsexperimenten.

3.3.2 Der Einfluss des FGF-Signalwegs

Die FGF Wachstumsfaktoren sind unter anderem für die Induktion von Neuroektoderm aus Ektoderm essentiell (Hongo et al., 1999). Die Injektion des dominant negativen FGF Rezeptors XFD führte zu einer deutlichen Reprimierung der FoxD5b Expression (Fetka et al., 2000). Somit scheint ein funktionierender FGF Signalweg für die Expression des FoxD5b Gens notwendig zu sein.

Wie whole-mount in situ Hybridisierungsexperimente zeigen, führt die ektopische Expression des Fibroblasten-Wachstumsfaktor XeFGF (Vektor: pSP64T, SP6-Polymerase, Slack und Isaacs, 1994) auf der Ventralseite zu keiner Aktivierung der FoxD5b Expression (Abb. 30), jedoch in animalen Kappen wird die FoxD5b Expression durch die Inkubation mit dem basischen Wachstumsfaktor bFGF aktiviert.

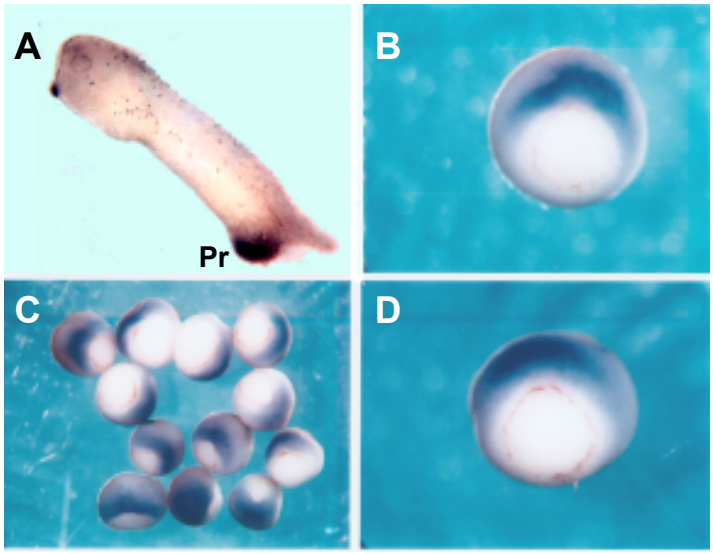


Abb. 30: Whole-mount in situ Hybridisierung zur Untersuchung der FoxD5b Expression nach ektopischer Expression von XeFGF

A: Phänotyp nach ektopischer Expression von XeFGF: Hypertrophie des Proktodeums (Pr)

B: Kontrolle eines im Stadium 11 fixierten Embryos

C: XeFGF mRNA 10 pg/Blastomere ventral injiziert, im Stadium 11 fixiert.

D: XeFGF mRNA 10 pg/Blastomere ventral injiziert, im Stadium 11 fixiert.

Der Einfluss des FGF Signalwegs auf der Ebene des Promotors wurde durch Koinjektionsexperimente untersucht. Verschiedene Deletionsmutanten der 5´-und der 3´-Region wurden mit 200 pg XeFGF mRNA in Embryonen im Zweizellstadium koinjiziert, im Stadium 7 animale Kappen geschnitten und die Luciferaseaktivität im Stadium 12 bestimmt. Die Koinjektion führt beim Fusionskonstrukt 5´-1474-B/X zu einer Stimulation der Luciferaseaktivität auf 440% und bei der längsten 5´-Mutante 5-1474 auf 220% (Abb. 31). Die Mutante 5´-151 lies sich durch die Koinjektion nicht stimulieren. Somit tragen sowohl der 5´-Bereich als auch der 3´-Bereich zur Aktivierung des FoxD5b Gens durch den FGF-Signalweg bei.

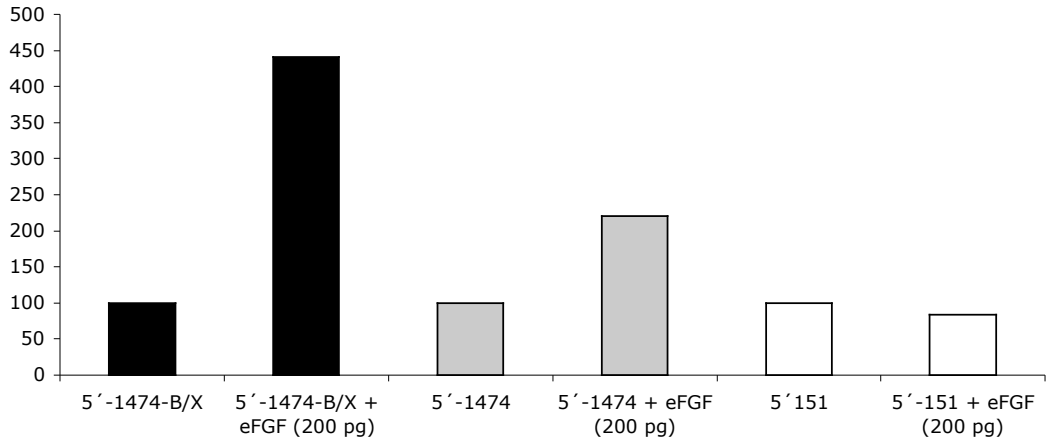


Abb. 31: Koinjektionsexperimente mit XeFGF mRNA.

Koinjektion von 20 pg DNA der Promotorkonstrukte und 200 pg eFGF mRNA in Embryonen des Zweizellstadiums. Im Stadium 7 wurde die animale Kappe der Embryonen präpariert und die Luciferaseaktivität von 15 Kappen im Stadium 12 bestimmt. Die Daten ergeben sich als Mittelwerte aus mindestens zwei Injektionsexperimenten.

4. Diskussion

Wie die meisten Mitglieder der fork head/winged helix Familie, weisen die Gene der FoxD5 Subklasse in der Embryonalentwicklung ein spezifisches Expressionsmuster auf, das auf eine Rolle dieser Transkriptionsfaktoren in frühen Differenzierungs- und Wachstumsprozessen hindeutet. Gene dieser Subklasse sind in Form von cDNA-Klonen vom Zebrafisch, *Danio rerio* (Foxd5, ehemals fkd8, Odenthal und Nüsslein-Vollhard, 1998) und vom südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* (FoxD5a/5b/5c, ehemals XFD-12/12´/12´, Sölter et al., 2000) isoliert worden. Für das foxd5 Gen von *Danio rerio* ist eine Expression im paraxialen Mesoderm und im Neuroektoderm beschrieben, für die FoxD5 Gene von *Xenopus laevis* sowohl eine maternale Expression in der animalen Hemisphäre, als auch eine zygotische Expression in der dorsalen Urmundslippe, in der dorsalen Mittellinie des Neuroektoderms, in der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze und in der chordoneuralen Umschlagsfalte der Schwanzspitze. Anhand von whole-mount in situ Hybridsierungs- und RT-PCR-Experimenten konnten auch Hinweise für regulatorische Faktoren gewonnen werden. Welche Sequenzelemente in den Promotoren dieser Gene für die Regulation der Expression verantwortlich sind, war bisher unbekannt. A. Brey konnte 1999 die Struktur des FoxD5b Gens aufklären und 1,5 kb des 5´ gelegenen Promotors isolieren. Da *Xenopus laevis* aufgrund einer vor ca. 50 Millionen Jahren stattgefundenen Genomduplikation pseudotetraploid ist (Bisbee et al., 1977), existieren von jedem Gen Pseudoallele, die mit "a" oder "b", bzw. "I" oder II" oder nur mit dem Apostroph "´" gekennzeichnet werden. Das FoxD5b Gen ist aus einem Exon aufgebaut, das 120 Nukleotide vor der translatierten Region beginnt.
In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, anhand von genomischen Sequenzdaten und 5´-RACE-Experimenten die Genstrukturen des FoxD5a Gens und des homologen *Xenopus tropicalis* xtFoxD5 Gens zu ermitteln. Ferner wurde die FoxD5b Gensequenz um stromauf bzw. stromab gelegene Sequenzen erweitert.

4.1 Genomische Struktur der FoxD5 Gene von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis*

Durch das Screenen einer genomischen Phagenbank konnte der Phagenklon O1, der das FoxD5a Gen enthält, isoliert und sequenziert werden. Das FoxD5a Gen zeigt einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau wie das bereits bekannte FoxD5b Gen. Aus dem Vergleich der genomischen Sequenz mit der publizierten FoxD5a cDNA-Sequenz (Zugangsnummer:

AJ242676; Sölter et al., 1999) zeigte sich, dass im Bereich der für die cDNA-Sequenz kodierenden Exons keine Introns vorliegen. Da cDNA-Klone durch partielle Degradation der Ausgangs-mRNA im 5´-Bereich oft unvollständig sind und die Regulation vieler Gene durch die Verwendung unterschiedlicher nichtkodierender erster Exons gesteuert wird, wurde der Transkriptionsstartpunkt mit einem 5´-RACE-Experiment festgelegt. Wie die Ergebnisse zeigen, wird in der Embryogenese genau eine Transkriptionsinitiationsstelle verwendet, die sich auf der DNA 15 bp vor der publizierten cDNA-Sequenz befindet. Das erweiterte FoxD5a-Transkript umfasst nun 1741 Nukleotide und teilt mit der FoxD5b cDNA eine Homologie von 84%. Da die Homologie der Gensequenzen von FoxD5a und FoxD5b auch im Bereich des Transkriptionsstarts sehr hoch ist, liegt die Vermutung nahe, dass beide Gene denselben Transkriptionsstartpunkt und eine TATA-Box (TATAAA) bei Nukleotidposition -30 verwenden. Ingesamt konnte Sequenzinformation über 3,2 kb des 5´-Promotors und 2,8 kb stromabwärts des Gens gewonnen werden.

Das Screenen einer genomischen DNA-Bank von *Xenopus tropicalis* führte zur Isolierung des FoxD5 homologen xtFoxD5 Gens. Der Phagenklon F1 umfasst 10455 bp und beginnt 2786 bp vor dem offenen Leserahmen des xtFoxD5 Gens. Wie Sequenzanalysen und ein 5´-RACE-Experiment zeigten, wird das xtFoxD5 Gen von nur einem Exon kodiert. Der ermittelte Transkriptionsstart weicht von den *Xenopus laevis* homologen FoxD5a und FoxD5b Genen ab und befindet sich im Vergleich zu diesen 30 bp stromabwärts. Mittlerweile liegt in der Genbank von *Xenopus tropicalis* eine Teilsequenz des xtFoxD5 cDNA-Klons (Zugangsnummer: CF781048) vor, dessen Sequenz 32 bp vor dem ermittelten Transkriptionsstarts beginnt. Dieser Transkriptionsstartpunkt entspricht wahrscheinlich dem Beginn der mRNA-Synthese in vivo. Dafür spricht die Lage der nach Korrektur bei Nukleotidposition -28 befindlichen TATA-Box, sowie der Vergleich mit den Transkriptionsstartpunkten der *Xenopus laevis* Homologen. Interessanterweise weist das xtFoxD5 Gen im 5´-nichttranslatierten Bereich gegenüber den *Xenopus laevis* FoxD5 Genen eine Deletion von 60 bp auf.

Der translatierte Bereich umfasst 1056 Nukleotide und teilt mit den Genen FoxD5a und FoxD5b eine Homologie von 87% (FoxD5a) bzw. 86% (FoxD5b). Das aus der Nukleotidsequenz abgeleitete xtFoxD5 Protein umfasst 352 Aminosäuren; Die Homologie mit den FoxD5a und FoxD5b Proteinen beträgt jeweils 88%, zum FoxD5c Protein lediglich 77%. Das xtFoxD5 Protein besitzt wie die aus *Xenopus laevis* neben der DNA-Bindungsdomäne zwei weitere, ca. 10 Aminosäuren umfassende hochkonservierte Regionen: Im N-terminalen

Bereich die "saure Region", eine Häufung der Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure sowie im C-terminalen Bereich die in eine Prolin-Alanin-Glutamin-reiche Sequenz eingebettete "Region II", die für die Repressorfunktion der FoxD5 Transkriptionsfaktoren verantwortlich gemacht wird (Sullivan et al., 2001).

Vergleichend können aus den gewonnen Sequenzinformationen der Gene FoxD5a, FoxD5b und xtFoxD5 folgende Aussagen getroffen werden: Alle drei Gene bestehen jeweils aus nur einem Exon. Die Transkriptionsinitiationsstelle ist bei FoxD5a und FoxD5b identisch, bei xtFoxD5 befindet sie sich nach Korrektur der Transkriptionsinitiationsstelle 2 bp weiter stromaufwärts. Im unmittelbaren Stromaufwärtsbereich aller drei Gene befindet sich eine konservierte TATA-Box mit dem Sequenzmotiv TATAAA. Der 5´-nichttranslatierte Bereich des xtFoxD5 Gens ist gegenüber dem von FoxD5a und FoxD5b durch eine 60 bp umfassende Deletion charakterisiert. Die Proteine bestehen aus jeweils 352 Aminosäuren und weisen jeweils eine Homologie von 88% auf. Neben der erwarteten hohen Homologie der transkribierten Bereiche und der Proteinsequenzen, existieren stromaufwärts und stromabwärts der untersuchten FoxD5Gene konservierte Sequenzabschnitte, deren Bedeutung für die Regulation der FoxD5 Gene in Kapitel 4.3 diskutiert wird.

4.2 Die Expression des *Xenopus tropicalis* Gens xtFoxD5

Wie für die *Xenopus laevis* FoxD5 Gene beschrieben, weist das Homolog von *Xenopus tropicalis* ein spezifisches Expressionsmuster in der frühen Embryonalentwicklung auf. Sölter et al. (1999) konnten keine Unterschiede in der zeitlichen und räumlichen Expression der Gene FoxD5a, FoxD5b und FoxD5c feststellen, wohingegen Sullivan et al. (2001) auf distinkte Unterschiede im Expressionsverhalten der Gene FoxD5a und FoxD5b hinwiesen. Sie analysierten u.a die räumliche Expression des FoxD5a Gens und konnten dabei eine Expression in der Grenzregion zwischen Mittel- und Hinterhirn und im Notochord, wie sie für das FoxD5b Gen beschrieben ist, nicht nachweisen. Da Unterschiede in der Expression in *Xenopus laevis* und Zebrafisch beschrieben sind (Dirksen und Jamrich, 1995, Bourguignon et al, 1998), war die Analyse der Expression des Homologen von *Xenopus tropicalis* interessant.

Die zygotische Transkription des xtFoxD5 Gens wird im späten Blastulastadium auf der Dorsalseite des Embryos initiiert. Die Transkripte sind zu Beginn der Gastrulation in den Zellen oberhalb der dorsalen Urmundslippe lokalisiert. Während die Gastrulation fortschreitet, verdichtet sich die Expression um die dorsale Urmundslippe in den Zellen, die nicht in das Innere des Embryos einwandern. Neben der Expression im gesamten Neuralfeld, die sich

während der Neurulation in der dorsalen Mittellinie verdichtet und nach Entstehung des Neuralrohrs verschwindet, bleibt eine Expression in der dorsalen Marginalzone erhalten, die sich später in der chordoneuralen Umschlagsfalte der Schwanzspitze wieder findet. In späteren Stadien findet sich eine Expression in den Zellen des sogenannten Isthmus-Organisators im Bereich der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze. Somit finden sich viele Gemeinsamkeiten im Expressionsmuster des xtFoxD5 Gens mit den *Xenopus laevis* Homologen.

4.3 Vergleichende Promotoranalyse

Für die zeitliche und räumliche Aktivierung der Genexpression sind in den Promotoren neben Bindungssequenzen für den basalen Transkriptionsapparat, die zumeist in einem Sequenzbereich von -30 bis -100 liegen (Lewin, 1990), Sequenzelemente nötig, an die spezifische Transkriptionsfaktoren binden. Diese Sequenzelemente befinden sich oft unmittelbar stromaufwärts des basalen Transkriptionsapparates, können aber auch viele Kilobasen stromaufwärts oder stromabwärts des Gens lokalisiert sein.

Aus der nahezu identischen Expression der Gene FoxD5a, FoxD5b und xtFoxD5 und der vergleichbaren Lage der ermittelten Transkriptionsstartpunkte kann angenommen werden, dass die Promotoren dieser Gene konservierte Sequenzelemente aufweisen, die von denselben für die Regulation bedeutsamen Transkriptionsfaktoren gebunden werden.

Im Rahmen der Analyse des FoxD5b-Promotors konnten insgesamt vier regulatorische Regionen identifiziert werden. In den Promotorbereichen der Gene FoxD5a, FoxD5b und xtFoxD5 sind diese regulatorischen Bereiche konserviert.

Beim Sequenzvergleich der 5´-Regionen der untersuchten Gene fanden sich zwei Regionen, die eine Sequenzübereinstimmung von über 90% aufwiesen. Die "proximale Region" (PR) hoher Sequenzübereinstimmung befindet sich unmittelbar vor den Transkriptionsstartpunkten und umfasst den Sequenzbereich von -1 bis -250. In dieser Region befinden sich die Bindungssequenz für Faktoren des basalen Transkriptionsapparates (TATA-Box Binding Protein, TBP), aber auch Sequenzelemente, die mit spezifischen Transkriptionsfaktoren der GATA-, Homöobox- und TCF-Familie interagieren können. Eine zweite konservierte Region, die "distale Region" (DR), befindet sich etwa 1 kb weiter stromaufwärts und umfasst ca. 350 Basenpaare.

Mit 5´-Deletionsmutanten der 1473 bp umfassenden Stromaufregion des FoxD5b Gens wurde anhand von Reportergen-Experimenten untersucht, ob die beschriebenen konservierten Regionen für die räumliche und zeitliche Aktivierung von Bedeutung sind.

Soweit die Reportergen-Assays eine Aussage über die Situation in vivo zulassen, sind beide Regionen an der Regulation der FoxD5b Gens beteiligt. In der proximalen Region sind Sequenzelemente zwischen -105 bis -68 für die Aktivierung des Gens über das Niveau des basalen Promotors verantwortlich. Innerhalb der distalen Region befinden sich mindestens zwei Regionen, die eine deutliche Verstärkung der Reportergenaktivität bewirken. Außerhalb der beiden konservierten Regionen ergab sich keine Änderung der 5´-Promotoraktivität.

Da die Bindungssequenzen für regulatorische Faktoren, sogenannte Enhancer oder Silencer, sich stromabwärts oder auch innerhalb des Gens befinden können, wurde auch der Einfluss solcher Regionen untersucht.

In der Stromabwärtsregion konnten drei Homologie-Regionen (H_1, H_2, H_3 bzw. $H_{1'}$, $H_{2'}$, $H_{3'}$) identifiziert werden, die eine große Sequenzübereinstimmung aufwiesen. Es wurden Fusionskonstrukte von Deletionsmutanten der Stromabwärtsregion mit unterschiedlichen 5´-Promotorkonstrukten kloniert und die Aktivität mit Mikroinjektionsexperimenten bestimmt. Aus den Injektionsergebnissen lassen sich folgende Aussagen ableiten: Stromabwärts des FoxD5b Gens befindet sich in der Region H_2 bzw. $H_{2'}$ zwischen +3904 und +3985 ein Enhancerelement, das die Reportergenaktivität auf das Siebenfache erhöht, es benötigt aber Sequenzelemente des 5´-Bereichs zwischen -151 und -68 für seine Aktivität.

Da die FoxD5 Gene während des Gastrulastadiums ausschließlich auf der Dorsalseite des Embryos exprimiert werden, wurde der Einfluss der Promotorsequenzen auf die räumliche Kontrolle analysiert. Wie die Luciferaseergebnisse und vor allem die Fluoreszenzverteilung der d2EGFP-transgenen Embryonen zeigt, sind die 1473 bp des FoxD5b 5´-Bereichs ausreichend, um das Gen während des frühen Gastrulastadiums auf der Dorsalseite des Embryos zu aktivieren. Somit ist der 5´-Bereich an der zeitlichen und räumlichen Aktivierung beteiligt. Die Sequenzelemente des Stromabwärtsbereich scheinen vor allem während der Neurulastadien für eine Verstärkung der Expression in der Neuralplatte verantwortlich zu sein.

4.4 Die Regulation der FoxD5 Gene und der Promotoren

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des BMP-4- und des FGF-Signalwegs auf die Expression des FoxD5b Gens und des Promotors untersucht. Der reprimierende Einfluß des BMP-4 Signalwegs auf die FoxD5b Expression konnte bestätigt und erweitert werden. Dabei konnte in whole-mount Hybridisierungsexperimenten gezeigt werden, dass die BMP-4-Targetgene Xvent-2 und Msx-1 die Funktion von BMP-4 nachahmen können. Das in der BMP-4-Signalkaskade weiter unten liegende Xvent-1 scheint nur im Bereich der dorsalen

Marginalzone einen Einfluss zu haben. Anhand von Koinjektionen konnte in der proximalen Region (PR) des FoxD5b 5´-Promotors ein BMP-4 Response Element zwischen -151 und -68 identifiziert werden.

Durch ektopische Expression von Chordin auf der Ventralseite, das BMP-4 extrazellulär bindet und damit den BMP-4 Signalweg inaktiviert, konnte eine Aktivierung des FoxD5b Gens auf der Ventralseite beobachtet werden. Da es inzwischen Hinweise für eine autonome Rolle von Chordin bei der Neuralplattendifferenzierung gibt (Ölgeschläger et al., 2003), könnte die Aktivierung des FoxD5b Gens durch Chordin auch zusätzlich ein direkter Effekt sein. Nachdem eine Aktivierung des FoxD5b Gens durch Expression des trunkierten BMP-Rezeptors erzielt wurde und Sullivan et al. (2001) zeigten, dass in animalen Kappen Chordin allein das FoxD5a Gen nicht aktivieren kann, scheint der Effekt von Chordin jedoch überwiegend auf der BMP-4-Bindung zu beruhen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass auf der Dorsal- und Ventralseite des Embryos aktivatorische Faktoren vorhanden sind, die in der animalen Kappe fehlen, und deshalb die Blockade des BMP-4-Signalwegs in Gegenwart dieser Faktoren ausreicht, das FoxD5b Gen zu aktivieren.

Die ektopische Expression des Xenopus embryonic fibroblast growth factors (XeFGF) auf der Ventralseite des Embryos ist für eine Aktivierung des FoxD5b Gens nicht ausreichend. Im Modellsystem der animalen Kappe konnte aber eine Induktion des FoxD5b Gens durch XeFGF gezeigt werden. Wahrscheinlich ist der reprimierende Einfluß des BMP-4 Signalwegs auf der Ventralseite stärker als der aktivatorische Effekt des FGF-Signalwegs. Die Koinjektionen von XeFGF mit dem längsten Fusionskonstrukt des FoxD5 Promotors zeigt in animalen Kappen eine Aktivierung um 400%, die Koinjektion mit der längsten 5´-Mutante eine Aktivierung um 120%. Somit ist anzunehmen, dass sowohl der 5´-Promotorbereich als auch der 3´-Bereich für die Aktivierung durch den FGF-Signalweg bedeutsam sind.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die genomische Struktur der FoxD5 Gene von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* ermittelt. Die Untersuchung der Genstrukturen zeigte, dass die Pseudoallele FoxD5a und FoxD5b von *Xenopus laevis* und das Gen xtFoxD5 von *Xenopus tropicalis* aus nur einem Exon aufgebaut sind. Die Transkriptionsstartpunkte sind bei den Genen FoxD5a und FoxD5b identisch, bei xtFoxD5 im Vergleich zwei Basenpaare weiter stromauf. Der 5´nichttranslatierte Bereich des xtFoxD5 Gens weist gegenüber den *Xenopus laevis* Homologen eine Sequenzlücke von 60 Basenpaaren auf. Die translatierten Bereiche der drei Gene umfassen jeweils 1056 Basenpaare. Die demnach aus 352 Aminosäuren bestehenden Proteine weisen sowohl zwischen den *Xenopus laevis* Pseudoallelen als auch zwischen *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* eine Homologie von ca. 88% untereinander auf. Sie zeigen einen vergleichbaren strukturellen Aufbau aus einer "sauren Region" im N-terminalen Bereich, aus der winged helix-DNA-Bindungsdomäne und aus einem Prolin-Alanin-Glutamin-reichen Abschnitt im C-terminalen Bereich, der die als Repressor fungierende "Region II" enthält.

Die zygotische Expression des *Xenopus tropicalis* xtFoxD5 Gens beginnt, wie für die *Xenopus laevis* Homologen bereits beschrieben, kurz nach dem Beginn der Midblastulatransition in der oberflächlichen Zellschicht der dorsalen Urmundslippe. Während der Gastrula- und Neurulastadien befinden sich die xtFoxD5 Transkripte in den neuroektodermalen Vorläuferzellen der Neuralplatte und in der dorsalen Marginalzone. Die Expression des xtFoxD5 Gens im Neuroektoderm ist nach dem Schluss des Neuralrohrs nicht mehr nachweisbar. Die Expression in der dorsalen Marginalzone bleibt erhalten und findet sich später in der chordoneuralen Umschlagsfalte der Schwanzspitze wieder. Des weiteren ist das xtFoxD5 Gen in der Grenzzone zwischen Mittel- und Hinterhirn exprimiert.

Nach der Isolierung und Sequenzierung genomischer Phagenklone der Gene FoxD5a, FoxD5b und xtFoxD5 konnte umfangreiche Sequenzinformation der Stromauf- und Stromabregionen der drei Gene gewonnen werden. Anhand von Promotor-Reportergenanalysen wurde die zeitliche und räumliche Aktivierung des FoxD5b Gens untersucht. Es wurden vier aktivatorische Promotorregionen gefunden, die zwischen allen FoxD5 Genen in *Xenopus* konserviert sind. Dabei sind drei Elemente im 5´-Bereich und eines im 3´-Bereich lokalisiert. Im analysierten 1474 Basenpaare umfassenden Stromaufbereich des FoxD5b Gens befinden

sich die Sequenzelemente, die für die korrekte zeitliche und räumliche Aktivierung des Gens nach der Midblastulatransition verantwortlich sind. Diese Elemente konnten zwischen -68/-105, -1014/-1168 und -1205/-1273 eingegrenzt werden. In der Stromabregion wurde ein Enhancer zwischen +3904 und +3985 identifiziert, der mit Sequenzelementen des Stromaufbereichs zwischen -151 und -68 kooperiert und die Promotoraktivität auf über 700% steigert.

Die Reprimierung der FoxD5b Expression durch den Wachstumsfaktor Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) kann von den Targetgenen Xvent-2 und Msx-1 übernommen werden, von dem indirekten BMP-4 Targetgen Xvent-1 aber nicht. Die Unterdrückung des BMP-4 Signalwegs durch Chordin bzw. den trunkierten BMP-Rezeptor auf der Ventralseite des Embryos ist für die Expression des FoxD5b Gens ausreichend. Sequenzelemente des FoxD5b-Promotors zwischen -151 und -68 sind an dem reprimierenden Effekt von BMP-4 Signalwegs beteiligt.

Die Aktivierung des fibroblastischen Wachstumsfaktor-Signalwegs auf der Ventralseite des Embryos durch den embryonalen fibrobastischen Wachstumsfaktor XeFGF ist für die Expression des FoxD5b Gens nicht ausreichend. Dagegen kann die Aktivierung dieses Signalwegs im Modellsystem der animalen Kappe sowohl das FoxD5b Gen als auch die Aktivität eines Promotor/Reportergen Konstruktes stimulieren. Hieran sind Sequenzelemente beteiligt, die sich stromauf und stromab des FoxD5b Gens befinden.

Die zeitliche und räumliche Expression des FoxD5b Gens wird also durch das Zusammenspiel mehrerer Signalwege und durch zahlreiche Promotorelemente gesteuert, die sowohl stromauf als auch stromab des Gens lokalisiert sind. Neben den hier untersuchten BMP-4 und eFGF Signalen bleibt weiterhin offen, ob und wie zusätzliche Signalwege, beispielsweise der Wnt- und der Nodal-Signalweg in die Regulation dieses Gens involviert sind.

7. Literatur

Bisbee C. A., Baker M. A., Wilson A. C., Haji-Azimi I. und Fischberg M.

Albumin phylogeny for clawed frogs (Xenopus).

Science 195: 785-787 (1977)

Brennan R. G.

The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff.

Cell 74: 773-776 (1993)

Brey A.

Xenopus Fork head Domäne 12 (XFD-12): ein Transkriptionsfaktor der "winged helix" Familie des Krallenfrosches.

Diplomarbeit, Universität Ulm, S. 32-46 (1999)

Bourguignon C., Li J. und Papalopulu N.

XBF-1, a winged helix transcription factor with dual activity, has a role in positioning neurogenesis in Xenopus competent ectoderm.

Development 125: 4889-4900 (1998)

Clark K. L., Halay E. D., Lai E. und Burley S. K.

Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5.

Nature 364: 412-420 (1993)

Costa R. H., Grayson D. R. und Darnell, J. E., Jr.

Multiple hepatocyteenriched nuclear factors function in the regulation of transthretin and alpha-1 antitrypsin genes.

Mol Cell Biol 9: 1415-1425 (1989)

Dawid I. B.

Intercellular signaling and gene regulation during early embryogenesis of Xenopus laevis.

J Biol Chem 269: 6259-6262 (1994)

De Robertis E. M., Kim S., Leyns L., Piccolo S., Bachiller D., Agius E., Belo J. A., Yamamoto A., Hainski-Brousseau A., Brizuela B., Wessely O., Lu B. und Bouwmeester T.

Patterning by genes expressed in Spemann's organizer.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol 62: 169-75 (1997)

Dirksen M. L. und Jamrich M.

Differential expression of fork head genes during early xenopus and zebrafish development.

Dev Genet 17: 107-116 (1995)

Fang J., Dagenais S. L., Erickson R. P., Arlt M. F., Glynn M. W., Gorski J. L., Seaver L. H. und Glover T. W.

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)

Fetka I., Doederlein G. und Bouwmeester T.

Neuroectodermal specification and regionalization of the Spemann organizer in Xenopus.

Mech Dev 93: 49-58 (2000)

Friedle H., Rastegar S., Paul H., Kaufmann E. und 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)

Gil-Benso R., Lopez-Gines C., Carda C., Lopez-Guerrero J. A., Ferrer J., Pellin-Perez A. und Llombart-Bosch A.

Cytogenetic and molecular findings related to rhabdomyosarcoma. An analysis of seven cases.

Cancer Genet Cytogenet 144: 125-33 (2003)

Gilbert S. F.

Developmental Biology.

Sinauer Associates, Inc. Sunderland, USA, S. 307 (2000)

Graff J. M., Thies R. S., Song J. J., Celeste A. J. und Melton D. A.

Studies with a Xenopus BMP receptor suggest that ventral mesoderm-inducing signals override dorsal signals in vivo.

Cell 79: 169-179 (1994)

Haesmann, J.

Patterning the Xenopus blastula.

Development 124: 4179-4191 (1997)

Häcker U., Grossniklaus U., Gehring W. J. und Jäckle H.

Developmentally regulated Drosophila gene family encoding the fork head domain.

Proc Natl Acad Sci U S A 89: 8754-8758 (1992)

Häcker U., Kaufmann E., Hartmann C., Jürgens G., Knöchel W. und Jäckle H.

The Drosophila fork head domain protein crocodile is required for the establishment of head structures.

Embo J 14: 5306-5317 (1995)

Harland R. M.

In situ hybridization: an improved whole-mount method for Xenopus embryos.

Methods Cell Biol 36: 685-695 (1991)

Harland R. M. und Gerhart J.

Formation and function of Spemann's organizer.

Annu Rev Cell Dev Biol 13: 611-667 (1997)

Hongo I., Kengaku M. und Okamoto H.

FGF signaling and the anterior neural induction in Xenopus.

Dev Biol 216: 561-581 (1999)

Kästner K. H., Knöchel W. und Martinez D. E.

Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors.

Genes Dev 14: 142-146 (2000)

Kaufmann E., Hoch M. und Jäckle H.

The interaction of DNA with the DNA-binding domain encoded by the Drosophila gene fork head.

Eur J Biochem 223: 329-337 (1994)

Kessler D. S. und Melton D. A.

Vertebrate embryonic induction: mesodermal and neural patterning.

Science 266: 594-604 (1994)

King M. W. und Moore M. J.

Novel HOX, POU and FKH genes expressed during bFGF-induced mesodermal differentiation in Xenopus.

Nucleic Acids Res 22: 3990-3996 (1994)

Knöchel S., Lef J., Clement J., Klocke B., Hille S., Köster M. und 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)

Krieg P. A. und Melton D. A.

Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs.

Nucleic Acids Res 12: 7057-7070 (1984)

Kroll K. L. und Amaya E.

Transgenic Xenopus embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation.

Development 122: 3173-3183 (1996)

Lai E., Prezioso V. R., Litvin O., Costa R. H. und Darnell J. E., Jr.

HNF-3A, ahepatocyte-enriched transcription factor is regulated transcriptionally.

Genes Dev 4: 1427-1436 (1990)

Lai C. S., Fisher S. E., Hurst J. A., Vargha-Khadem F. und Monaco A. P.

A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder.

Nature 413: 519-23 (2001)

Lehmann O. J., Sowden J. C., Carlsson P., Jordan T. und Bhattacharya S. S.

Fox's in development and disease.

Trends Genet 19: 339-344 (2003)

Lewin B.

Genes IV.

Cell Press (1990)

Maruyama K. und Sugano S.

Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides.

Gene 138: 171-174 (1994)

Nakae J., Biggs W. H . 3rd, Kitamura T., Cavenee W. K., Wright C. V., Arden K. C. und Accili D.

Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1.

Nat Genet 32: 245-53 (2002)

Newport J. und 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)

Nieuwkoop P. D.

The organization center of the amphibian embryo: its origin, spatial organization, and morphogenetic action.

Adv Morphog 10: 1-39 (1973)

Nieuwkoop P. D. und Faber, J.

Normal Table of Xenopus laevis (Daudin).

North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1967)

Odenthal J. und Nüsslein-Vollhard C.

fork head domain genes in zebrafish.

Dev Genes Evol 208: 245-258 (1998)

Oelgeschläger M., Kuroda H., Reversade B. und De Robertis E. M.

Chordin is required for the Spemann organizer transplantation phenomenon in Xenopus embryos.

Dev Cell 4: 219-230 (2003)

Onichtchouk D., Gawantka V., Dosch R., Delius H., Hirschfeld K., Blumenstock C. und Niehrs C.

The Xvent-2 homeobox gene is part of the BMP-4 signalling pathway controlling dorsoventral patterning of Xenopus mesoderm.

Development122: 3045-3053 (1996)

Pani L., Overdier D. G., Porcella A., Qian X., Lai E. und Costa R. H.

Hepatocyte nuclear factor 3 beta contains two transcriptional activation domains, one of which is novel and conserved with the Drosophila fork head protein.

Mol Cell Biol 12: 3723-3732 (1992)

Pohl B. S. und Knöchel W.

Overexpression of the transcriptional repressor FoxD3 prevents neural crest formation in Xenopus embryos.

Mech Dev 103: 93-106 (2001)

Pohl B. S. und Knöchel W.

Temporal and spatial expression patterns of FoxD2 during the early development of Xenopus laevis.

Mech Dev 111:181-184 (2002)

Pohl B. S. und Knöchel W.

Isolation and developmental expression of Xenopus FoxJ1 and FoxK1.

Dev Genes Evol 214: 200-205 (2004)

Ruiz i Altaba A. und Jessel T. M.

Pintallavis, a gene expressed in the organizer and midline cells of frog embryos: involvement in the development of the neural axis.

Development 116: 81-93 (1992)

Rupp R. A., Snider L. und Weintraub H.

Xenopus embryos regulate the nuclear localization of XMyoD.

Genes Dev 8: 1311-1323 (1994)

Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, G., Gont, L. K. und De Robertis, E. M.

Xenopus chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes.

Cell **79**: 770-790 (1994)

Schmidt M., Fernandez de Mattos S., van der Horst A., Klompmaker R., Kops G. J., Lam E. W., Burgering B. M. und Medema R. H.

Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D.

Mol Cell Biol 22: 7842-52 (2002)

Schubert L. A., Jeffery E., Zhang Y., Ramsdell F. und Ziegler S. F.

Scurfin (foxp3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation.

J Biol Chem 276: 37672-37679 (2001)

Slack J. M. W.

The nature of the mesoderm-inducing signal in Xenopus: a transfilter induction study.

Development 113: 661-669 (1991)

Slack J. M. W. und Isaacs H. V.

The role of fibroblast growth factors in early Xenopus development.

Biochem Soc Trans 22: 585-9 (1994)

Smith J. C. und Slack J. M.

Dorsalization and neural induction: properties of the organizer in Xenopus laevis.

J Embryol Exp Morphol 78: 299-317 (1983)

Smith R. S., Zabaleta A., Kume T., Savinova O. V., Kidson S. H., Martin J. E., Nishimura D. Y., Alward W. L., Hogan B. L. und John S. W.

Haploinsufficiency of the transcription factors FOXC1 and FOXC2 results in aberrant ocular development.

Hum Mol Genet 9:1021-1032 (2000)

Sölter M., Köster M., Hollemann T., Brey A., Pieler T. und Knöchel W.

Characterization of a subfamily of related winged helix genes, XFD-12/12´/12´´ (XFLIP) during Xenopus embryogenesis.

Mech Dev 89: 161-165 (1999)

Southern, E. M.

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J Mol Biol 98: 503-517 (1975)

Sparrow D.B., Latinkic B. und Mohun T.J.

A simplified method of generating transgenic Xenopus.

Nucleic Acids Res 28(4): E12 (2000)

Sullivan S.A., Akers L. und Moody S.A

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: 439-57 (2001)

Suzuki A., Ueno N. und Hemmati-Brivanlou A.

Xenopus msx1 mediates epidermal induction and neural inhibition by BMP4.

Development 124: 3037-3044. (1997)

Weigel D. und Jäckle H.

Novel homeotic genes in Drosophila melanogaster.

Biochem Cell Biol 67: 393-396 (1989)

Wilimzig M.

Technical Tips.

Trends Genet, June (1985)

Yang Q., Kong Y., Rothermel B., Garry D . J., Bassel-Duby R. und Williams R.S.

The winged-helix/forkhead protein myocyte nuclear factor beta (MNF-beta) forms a co-repressor complex with mammalian Sin3B.

Biochem J 345: 335-343 (2000)

Zhang J., Houston D. W., King M. L., Payne C., Wylie C. und Heasman J.

The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in Xenopus embryos.

Cell 94: 515-524 (1998)

7. Anhang

7.1 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Knöchel für die Themenstellung und die intensive Betreuung meiner Arbeit.

Für die gemeinsame Zeit in Raum 358, Motivation und Hilfe möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Labors, Dr. Sigrun Knöchel, Dr. Henner Friedle und Dr. Sepand Rastegar bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Barbara S. Pohl für die Anregungen und Ratschläge bei der Zusammenstellung des Manuskripts.

Bedanken möchte ich mich bei Karin Botzenhart für die whole-mount in situ Hybridisierungen, Doris Weber und Conny Donow für die Sequenzierungsarbeiten.

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

7.2 Lebenslauf

Name:	Christian Schön	
Geburtsdatum:	05.12.1975	
Geburtsort:	Augsburg	
Familienstand:	ledig	
Schulausbildung:	1982-1986	Grundschule, Johann-Strauss-Volkschule, Augsburg
	1986-1995	Gymnasium, Gymnasium Königsbrunn, Königsbrunn
	06/1995	Abitur
Universitäts-ausbildung:	10/1995 - 10/2002	Studium der Humanmedizin, Universität Ulm
	10/1997	Physikum
	10/1998	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	10/2001	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	10/2002	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	10/2002	Ärztliche Prüfung und AiP-Erlaubnis
	11/2002	Arzt im Praktikum an der neurologischen Klinik des Universitätsklinikum Ulm
	01/2004	Arzt im Praktikum in der Abteilung Biochemie der Universität Ulm
Promotion:	10/1998 - 01/2001	Promotion in der Abteilung Biochemie der Universität Ulm

Genomischer Phagenklon O1 Xba I 8,7 kb (FoxD5a):

CTGCAGGTCGACTCTAGAGCTCGCGGCCGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGCGTC
GACTCGATCTGAAATAGCTGGTTGTACTAAGCTAGGGAAGAAAAGACCAATCTGTTCCAG
TGCACCCCATTTGTCTATGCACATGACAGGCACATCATTGGCCTATCAGATAGCTAGAAA
TACTGACCGCACATGCAGAGTCAGCGCAGTGGAGTTCACGGGCGCCATCCTCTGGCATTT
CAGTATTCTTTGGGTCCCTTCTGCAATTTCCGTTTACATTTGGCACATGCGCAGTTGTCG
TGAACCAGAAGATTGCCCCAACTGCAATGTGCCACTCACATTACGAAGAATACCGAAGCG
CCAAAGATGGCGCCTGTGAACTCCGCTGCACTGACTCTGCATGTGCGGTCAGTATTTCTA
CAGGGGACACAATTCAGGGGTAAGACTGTGCAAAGGGGAGGCAGGGAGGGGGGCCAGTGG
GAACTTTTGTATGAAGGGGTGTTTAGTTCTCCTTTATAGATATTGCTTGACATGCACATG
GGCCAACGATAGTTGATTGGAAAATGCACCTTGACAAGTGCTGGCAAAAGTAATTGTCAG
GTGATTTAGATCCAAGTTTATTGGGGTTGGTTTGGGTGCTTGGGCATTACATTTTTGGTC
TACTTAAAAATGTAGTGATCACACTGCCTGAAAGAGCCTATGCACAATTACCATTTGAGG
CCCTAACACACTGGTGTTCATACATGCATTCCACCATATGGAAGGGCAACCATTATATCA
CCACATTCCCCTATAATGAAATTTCAAATACAGCTGAAACACAATGCAACAAACATGTGT
ATGGGCTCTTAGGTGAGGAGTAAAACCCAATAATTCATAATTTACAGGACTATTGGAATT
CTACCAGCCAGTACATAAACAAACTGCTGGCTCCTGCAGAAAATCTGTCAATTACAGAGT
GAGTTGGGTTTTAGAGATAGATCCAATTTCACCCTTTTAATAAATTTACACTTACAAATC
GATTTAAGTTTCTATTGAAAAGCATAACCCTAAACAATTGGTCCAAAACAACAAACCAAA
GAGAAAAACAAAATAGTGGTTGAATATGAAATTATATATGGCAGAATTTTATACCATAAG
AATATAAAGCTGGATGACTTTTGAATATACTACAGTTAAAGACCAACTATACTCTTGTAC
GATCTCTGTATTTGTAGGATTTTTTTTTTATAGACGTAGGATAAAGTGTTTTAAACAACT
CTTTTAATATTTTACTTGTAATTAAGTACAGCACACAATAATTCAAGGATGTGTTCATGT
TTAGTCAGAATATTATTTTAATGAAAATGTTAACAGTGGGACCTCAAATAATTGACACAA
ACATGAATGGCAAGCAGCTCAGGAATTTAGAGTTTTACAGTTGTTATCACTATCTGCCCT
TGAAAGCCCCCCTGTGGTGTTCTGTAAACTGTAGGCTGCAGAGCCATTTCCTATGCTGCC
TTCATATGCAGAGCTGCTAATAGTCTCTTCTAACACCTTCTTTTCAGATCACAGATGGGG
GTCTACTGCTATTGATCAATTCCATTGCCAAAACCACCTGCAAGCCATGGGCAGTTTCAG
ACAGTGGCAAATTAGCATGTGTACTGTATCTATTTCTGGGCAAAATCAATTATATTTGAA
TGATGGTGGGTAGACATTATTTAATACTGCATGTCTTGGAGTTGTGGAATATAATGCAGA
ATAACTAGATATCAAGTATACAGCCCATTGCTGCTTATATACATATATCGTGAATAAAGT
ACCCCCTCTTGTAAATTATAAGGATATAAGTTACTGAGGAGTTTCATGACCATATAAAAA
CACGAGGCAGAAGGCCGAGTATTTTTATACAGGTCATGGAACTCCAAGGTAACTTCTAAT
ATCCTCATATTTTGCAACTGGGGGTACTTTATTTATTATAATACACACGTTTCAGTGAGT
CATGTGACAGAAATTACATCACTACTCATCGTTTATAACTGATGATATCAGTACTCACCG
TTTATAAGGATATAATTTACAAGATATTCATGGCTTTTGTGTAATATATATATATATACA
TACACATAAGATCTTGAAAACGGTCCAAGATCCGGACCGAAACGTCGATACATGTGAATT
TTAACATTTGATAAATAAATTAATCTTTTAAATAATTCCAGTGTGCGCTGTTAACTACAA
CCGGAATTCTATATATATATATATATATATTTCAGCCATGCGGCACTGATAAGCAGGGAT
GACTAGTTATTATGTATGTTTGTATATGCCACTGTTTTAATAGGAGTTTGTGATTAGTGT
TCAGTAAACAGAGATTGGGACTAAGATGCCTAAGATGTGCGCATTTGAGTCTACTAAAAT
TGTATATGATTCGCTATTGGTCTTGAAAGAAATATGCTGAGGGTATTACAAATAAAATAT
ATCAATTTGTGAGAGAATTGGTAAAATCAAAGATATACTGTTTATAGTATTTTAAGATAT
ATGGATGATATTTACAAGGGTTGACCAGGTGCAAGGTAAAAAATACATAAAGCTGAAAAA
TGACCAGCAAAACCAGGGAAATCCACAAAAATCAAACATAAACAGAACATAGATATAGAT
GCATATAAGCATGTAGAGGCCATCCTTTATATCCTATACTTCTTTCATTTTCACAAAATT
CATGCTGTTACTGGTCTTTTTCAAATATATATATATATATATATATATATATATATATAT

ATATATATATATATATATATATATATATATTTATTAAATAAAACCACTTTAATGCAACCA
CCTTTATTATATGCTATATATATATACACACATACATATACACACACACACATACACATA
CTACATTATTGAACCATGGCATGTATTGCAGTTAATGTTAGATTGCAAGTTTGTGGTTCT
TCAGATCATGTTTGATTACAGATTCTAGCATCCTATAGATACACAAGACTTATGTAATAG
TTTATCAATGTATAAAACAGAGACCCTATCCTTATTCAGCAACAGCACAACCCATGCAAG
GTCTGACTTCCCCTCCCTCCCAGGTGCAGGACCCTCTCACACAAAGGGTTATCTGACAGA
TTAACTCCAATTCAAGTGCAGATGACTGCTGGGGCACACCAGTGCTCATATAAAGAGGAG
GGGGAGAGAGCAGGGATATATCAGTTATCCCCTTAGCCATTTGGAAACTACACATTCACA
GAGAGCAGTGGGGAAGCACAACTCTCACTGGAGATCCTGCTGTCTACTACTTACTGCCAA
CCAAGCATTAGTGCTAACAATGAGCTTTAGCCAGGAGTCTGGTGCCCATCATCACCCCCA
GGATTATGCAGGACTTTCTGATGAGGAGGATGAAATTGATATTCTTGGAGAAGATGATCC
CTGCAGCCTAAAGTCACACTTTTACCTACAGCCCACACATTCAGTGATGGGGGACAGTGA
GATGCTGAGTCCTTCCAAGCTCAGCTGCACTGAAAGTGAGAGTGATTCCTCTGGAGAGAG
TGAAGGAGGTACTTCTAAAGACTCCTCAACCACCCCAACTGGTAGCAAAGCCAAAAGGAC
TCTGGTAAAGCCTCCTTACTCTTACATTGCTCTAATCACCATGGCTATCCTGCAGAGTCC
CCACAAGAAACTGACTCTCAGTGGCATCTGTGATTTTATCAGCAGCAAGTTCCCTTACTA
CAAGGACAAGTTCCCTGCTTGGCAGAATTCCATCAGGCACAACCTGTCCCTTAATGACTG
CTTTATTAAAATACCACGGGAACCAGGAAATCCAGGAAAAGGCAATTATTGGACACTGGA
CCCTGCTTCTGAGGACATGTTTGATAACGGAAGCTTCCTTAGAAGGAGGAAAAGGTTTAA
GAGGCACCAACAGGAGTTCTTTAAGGATGGACTTATGATGTACAACTCTCTGCCTTACTA
CAGACCCTACAGTGCTATCCAACCTCAGCCAGTGCTCCAGCAGACTTCACTGACATGCAT
GGCAATACCAGAGACCTTGCCCATGTCAACTCACCTTGCACCCTACCCAGACATAAAGAG
GAAGGTTTCTTACCCTGCCCAGGGGGTACACAGGGGTTTTAAAGCCCAGGATGCTGATAA
CCATCCCAATAATTCACAGAGCAAATGTTCATTCAGTATTGAGAACATCATGAGGAAACC
CAAGGAGCCAGAGCCAAATATTCAAAGCTTCAACTCACACTGGAACTATAATCATGTATT
CCAGAGGCCAAGTTCCTGCCTTCTCCCAGCTGTGCTTAACTTATCCACTGGCCCTCTGCT
AGCCAATACTCAGGGTGCCAGGCAATACAACCTCATACAATTCCCTGGGTGTTACTGAAG
TAAGTGACTTTGGGTCTCATACAACTCCAGTACTGCCCTCCCATTTTCTTAATATGTTAT
TGCTCATGGATTCTACAACTAGGACCTTCTTGTGTCCAAATCCAAAGACTTTAATTTTAT
TTTTTATTTATTGTCGAAGACAAGGTTATCCAATCTGTGACCCTCCACTTTGTACTAAAG
TAAAATTTCTAGCACCCCCTAAATTACAAGGTTGTCCGGGAAGGACGGAAGTTGCAGTTC
AATAACAGCTAGAGGACCGCTGGTTATACATAACCAGACAGTCATATGTACTTGTATGAC
AACCCAAACGTGGCACATGTGCTGCTGGAGGCTTGAATTACGCTTGAATCACTATGGATT
TTATGTATATGTGTGTGAAATTGTGGCTTAGGATGGCTTAGGATGTCACTTGGCCCCAGT
GGGCAACGGGTATGCAGTTTTGTAACACCATCCTTTTGTTTTGTCTTATTTTACTGTTAA
TATATAATGTAAATAGAAATGTAATCTATTCAACTATTTATTATAAAAGTTATTGCAACT
TTTCAGTCTACTTATGCTAAATAAAATAATTCACCTGAATATACAGACTGCTAATATTTA
TTTCCATACACATTCATTTTCGATTATCTATCTCTCTTATCTATCTCTCTAGGACAGGGG
TCCCCAACCTTTTTTACCCGTGAGCCACATGCAAATGTTAAAAAAAGAGTTGGGGAGCAA
CACAAGCATTCCAAGCCAGGAATTCAAAAATAACCACCTGCTTTGAGGACACTGAGAGCA
ACATCCAAAGGGTTGGAGAGCAACATGTTGCTCACGAGCTACTGGTTGGGGATCATTGCT
CTAGGATATACTTTAGAGCCTTTAGTTCCATTAGTATTGCAATGTGGGACTGGTGTTTCC
AAATCCAGGTTAACCCTGCTGATCTTGAAATGTTGCTGAAGATACAAATCTTTAGTATTG
TAAGAACATAAGTAGCTTGAACTGCCCATCTTTTCTGTACAGCAAATGAATAGGGAGTTA
GTCCCAAGAGTAAAAAAAAAAGGGGGGGAACTCATGTATTTCTTTTAGATGTTTCCTTGT
TTACATAAAAAATAATACTTAAATTATATTGATTTTGGGGAATATTTACTTAAAATTACA
CAAGGTAGATAGAACCATAATACATGTAAAATGACCATTATGTATCCCTGTAATTGTTTA

ATATAAAATGTTATCACTCAGTACCCATATTTGATATACTGTATATTATTTTAGATAACT
TATACACTCATTCTTCCTAAGTTAAAATATATGTAAGACTGAAATCACTCAGTTAAATAA
CAATACTGCACAAACTGTTGGTACAAATGGAAATAATGTGTAGGCAACAGCTTTCACATG
CTGTAAATGGAGCTGGTAATAGATTACACAGCAGAAAGGCAAAGGCTATGCATTTAATCA
TTTATCCTTTTGTTATTACTCTGCATTGCATTACCATGTGCTATAAAAATTGGCATACAT
TCTGCTTTTGATTGCAGACCTTTTACTTTATATTGAATATTCTACATTCTCAGCTTTGCC
TTACATGTAGCAGTAAATGGGTAAATCACACTGCAGAAAATGATGCTAATTTGTAAACAA
TAAATGTAAGGGAAAGTGATATTATACAAACCAATACCCAACCATTTCCTCGGTATAAGA
TCCTCAGTATTTATAATGTGCCTTATCTAGCAGTCACTTGTTCATTTGGGGGGTCTCTAA
AAAAATGCAGGCGCAGTTAGTAGTTTGGCATTATTTTAGGGGTCCAAATTCACATTACAA
CAGAGCATTTACTTGTAACAACCAATCAGAACTTTGCATTTATTTGATAACTTGGAGTGG
TTAGATCAAAGCTAATTGCTGATTAATAGCAATAGACTAGTTTACAAGTCTTTAGTATGA
ACATATTAATTTATTTTGCAGGGCAAGATGCCTGTCTATTCACAAAAAAAGTTATACATC
AAAAAAAAAAAAAAAGGAATGGATGGACAGTCTTTGTTGCTCTATCTGTTGCAGAACTAC
AGCTAGCAACACGATCCTGTAAGCTCAGCTGCAGAGACCAAATGTTCTGACCCCCTTGGG
TACTAATAGTAAAACCTTTCTCTCCAATGAGCAAAGCAAAATATCCTGCTGTGTGATCTT
TGGATGCTATTTTTTCTGATGATGGGTCATTTAAAGTGTTACCTGCCTGCAATGTTCATT
GCCTTCTAACAAAACTCTTTGTGCCACTTACAATTACCCATTAGCCTTCGTGTAATGTAG
CAGAACTGTTGGGTTACAAGGAGCAGCACTGGGTGTAAATAGGAGGAAGTCATTGACCTT
AGGCAAAATTAACACCTCAAACTCCTACTGGTAAGAACAAATCACAAAGTAACAAAAGAG
AACTGAAACCCATTGTAAGAATGCATTGGATTGCCCATATACTGTTACTAAAGACATTTA
CATCCACAAAGTCAAAGCAATGCAGCGATCTCACAGGGAATAAAGGGAAATGCCTTTTAA
CTCAGTCTCAGAGACACAAACCACAATATTCTTTATACACAGCACTCTTACAAGCTAAGC
AAAGCAGTGAGTGTGTTGTAGATATGATGCAATTAAACACACTGTGAAGCTGCACAGTTA
CATTTACCTCCAATATGTAAACATGTAAAACACCACTTTTTTGCAGATTGATTGGATTGA
GCTTTTATGGTAATTATTGTACAGTAGATTTGAATACTGGGATAAATGTCTATACTGTCA
GTAGCCAAACACCTCTGACTTTCTGGGATACTGTATATATGCACACATATGCAAATACAC
AATAGGGGGCAGAGCAGAAAGTACAACTATGCTTTAAAGGGGTTATTCACCTTTGAGTTA
CATTTTAGTAATGTTCTGAGACAATTATTCAGCAGCTCTCTAGTTTGCAATTTCACCAAT
TTGATTTGAATAAAAGACTGAAATATGAATGGAAGAGGGCCAACATAGAAAGATAAGTAA
TATAAAAAGTAGCAATAACACTTAAGGGGTCATTTATTAAAACTTTTTCATATTTTACCA
GAAACAACTCAACCTAACTATTTTTTTTAGTTTATAGGCTTAAATACCTCGAATACTTCA
AAATTTAGCCAAATCCAGAATCAAACACCCAAAAATCATGAAGGCAAAAAACATCTTTAA
TAATTAAAGGGACCTCCGGCATTGACTTTTACATGAATTTGTCAGGTTATAGCTGGAGTA
TTTTCAGATTTAGATTTTTTTTGCAGCATTGAGGGCATAATAAATCTTGAAATATTTGAG
TTTTTTTTCCCTCTAAAAATTCGAAATAGTTTTTTTAGGTAAAAAAAACTACTTTTTTTT
TTTAGAGAAAACAAAACTGAACCTTTAATAAATAGACCCCACAATGTGTAGCCTTACAGA
ACATTTTTTTTAGATGGGGTCAGAGACAGAAGGAGGCAAATAATTAAAAAATTATGAATA
AAATACCAATTGAAAATTTGCTTAGATTTGGCCATTTTGTAAGGTAATAAACTGCAAAGG
GTTACTGTAGAGAACACTATATGGAATGTTTGGGGACTGACCTTTCCTCATCATATAGAA
ACAGATACAGGCAAATAATTTCCAGGAGTTTGATGAAGCAAAATAGAAATCATACACCAC
CTTGTGGCTGAAGTGGTAACACTTAGTTTGTATATGTTCTACAGTTGCCACTTGTCAGCT
TTATGCAAAGAATTACTTGCCTGTAGATCTGTCTTGTCTTGTTTCCCTATTAATAACCAC
TGCTATCAGAAATAATTATCACTTGCCCTTTCATATAAATTGGAAGCTGATGTTACATAC
AATGGACTATTTATAAAAAAAATATTGTAACAGTAGTTATATATCTTTTTTATTTTGTGA
AGAAGTAACAAATACGTACATGACTGACAGGCAGATTTCTTAACACCTGGAAGGAAAAAT
TCTCAACCGTTTTTTATATATTTTTTCCACATGGGAAAATTAATTTTTGCTCATGTTCCC

ATGCAGACAAGTCCATTCTCAACATTGTTCTCTGTGTAATAAGTAGGAGAGCCATGCAGG
CTTTCCATTGCATGAGACTAATTATTGTACAATAGGAACCTTATTAAGTTGTAGTTGCTG
GACAGTCAGGTTTGGAATGAGCAAATAAGGGAATGGGCAGGGAAAAAAAGAGTGTAGCCA
TTGCTCAGTTGTGGGTATTGAAGAAGAACTTTGTTTTTTTTTTCAGCCACAAGGTGGTGA
TGGACTTGTTTTGTGAGCATCACAGGGTTGAAGATTGTTCACCATCACTAGCTAGAGAAA
AGATTCCAAAACAAAAGCAAACGTCTTCCCTGAATGTCTAGA

Genomischer Phagenklon F12.2 (FoxD5b):

GTCGACTCGATCTATGTTTTTTAGGAGTTTTGTGTTTTTTATTATTTTATAGAGGTTGGA
TAAAGTCAATTGCCCCTCAAACCATATTTTCGTTGGATATTTCTAAATGCATGCAGAATA
TAATTCAAACCAAACTGTTATCAGTGGGACCCCAAATAATTGACACATGTGAATGGCAAG
CAGCTCAGGAATTGAGAGTTTACAGTTGTTATCACTATCTGCTCTTGAAAGCCCCCCTGT
CGTGTTCTGTAAACTGTAGGCTGCAGAGCCATTTCCTATGCTGCCTTCATATGCAGAGCT
GCTAATAGTCTCTTCTAACACCTTCTTTTTAGATCACAGATGGGGGTAGTAGTGCTATTG
ATCAATTCCATTGCCAAAACCACCTGCAAACCGTGGGCAGTTTCAGACAAGGGCAAATTA
GCATGTAGGTGGGGCTTCAGTTTGTTCTTGTGCAAAGTGGCCATTCCACCATTCTCTTGC
ATTCCACCAACATTCTACTGTATGCATTTCCAGGCAAAATACCATTGCTTACATCTAATT
ATATTAGATGGGGGTGGGAGTTGTTTAATATTGCATGTCCTGGAATTGTGGAATAGAATT
CAGAATATCTAGATATTAATGATAAAGCCCATTGCTTCTTCAATGAAAGGACATATTCCA
GATATAACAGAATTCCAGTTCCCATAATCTGTTAATTTAGTTAGTGGGAGATTCTGGGAG
TTATAGTTTAATTGGCATATAATTTACAGCATTATTAACAATATATTGCAGCCATGCTGC
ACAGATAAGCAGGGAAGTTGGGCAGTAAGACAGCACGCACTATATAGTGCTTATGTGTTT
TTGTATATGCTACTATTTAAACAGGAATTTGTGATTGGGTTGAGAAAACAGAGACTGAGA
CTTACTAAAATGTGTGTCCATTTTAGTCTAGTACATTAAATATGAATATCTATTGTCCTT
GAAATAAAAAAAAATATAAAGTTGATTTTATACATTTGCGAGAGAATTAGTAAATTCAAA
GAGATATATATCACGTTTCAAGGGTGGCACACTGCTTCAGACATTCACTCCGGTGCAAGT
TAATAAATACATGAAGTTATTCAAATACATTAATGACCAGGAGTTTTTTTCAAATATATA
TATACTGCATTATTAAATCAAGTTGAATAGTGCTGTTCATATTGGATTGCAAGTTAGTGG
CTCTTCAGACCTTGTTGGACTACAGATTCTAACATCACATAGATGCATAAGACTTAATTA
ATGGTTTATCAATGTATAGCACAGATACCCCAACTTCATTCAGCAAAAGCACAGCCCATG
CAAGATCTGACCCCCCCTCACTGCCCCTCCCTCCCAGGTGCAGGACCCTCTCACACAAAG
GCTTATCTGATAGATTAGCTCCAATTCAAGTGCAGATGACTGCCGGGGCACAGCAGTGCT
CATATAAAGAGGAGGGGGAGAGAGCAAAGACGTATCAGTTATCCCCTTAGCCCTTTGGAG
ACTACACATTCACAGAGAGCAGTGGGGAAGCACAACTCTCACTGGAGATCCTGCTGTCTA
CTACCTACTGCCAACCCAGCATCAGTGCTAGCAATGAGCTTTAGCCAGGAGTCTGGAACC
CACCATAATTCCCTGGATTATGCAGGAGTCTCTGATGAGGAGGATGAAATTGATATTCTT
GGAGAAGATGACCCCTGCAGCCTGAAGTCACACTTTTACCTACAGCCTACACATTCAGAC
ATGGGAGACAGTGGGATGCTGAGTCCTTCCAAGCTAAGCTGCACTGAAAGTGAGAGCGAT
TCCTCGGGAGAGAGTGAAGGAGGTACTTCTAAAGACTCCCCAGCTACCTCACCTGGTGGC
AAAGCCAAAAGGGCCCTGGTAAAGCCTCCTTACTCTTACATTGCTCTGATCACCATGGCT
ATCCTGCAGAGCCCACACAAGAAACTGACTCTTAGTGGCATCTGTGATTTTATCAGCAGC
AAGTTCCCTTACTACAAGGACAAGTTCCCTGCTTGGCAGAACTCTATCAGGCACAACCTG
TCCCTTAATGACTGCTTCATTAAAATACCACGGGAACCAGGAAATCCAGGAAAAGGCAAT
TATTGGACACTGGATCCTGCTTCTGAGGACATGTTTGATAATGGAAGCTTCCTTAGAAGG
AGGAAAAGGTTTAAGAGGCACCAACAGGAGTTCTTTAAGGATGGACTCATGATGTACAAC

TCTCTGCCTTACTACAGACCCTACAGTGCCCTCCAACCACAGCCAATGCTCCAGCAGACA
CCACTGGCATGCATGGCAATCCCAGAGACCTTGTCTATGCCAACTAACCTTACACCCTAC
CCAGACATAAAGAGGAAGGCTCATTACCCAGACCAGGGGGCACACAGGGGTTTTGAGGGC
CAGGATGCTAATAACCATCCAAATAAGTCTCAGAGCAAGTGTTCATTCAGTATTGAGAAC
ATCATGAAGAAACCCAAGGAACCAGAGCCAAGTTTTCCAAGCTTCAACTCACACTGGAAC
TATAATAATCACTTATTGCAGAGACCAAGTTCCTGCTTTCTCCCAGCTGTACTTAACCTA
TCCACTGGCCCTCTGCTAGCTAATGTCCAGGGCACCAGGCAATACAACCTAATCAAATTC
CCTGGGAGTTATTAAAGTAAGTCACTTTGGGTCTCACATAGCCCCAGTACACAGTATGTA
TTCTGCTACTAGGACCTTTTTTGTCCAACCCCAAAGACTTTATTTATTGTCAAAGACAAG
GTTATACAATCTGTGTCCCTCCAGTTTGTACTGAAGTAACATTTCCAGCACTCCCTAAAT
TCCATGGTTGTCAGGGGAAGATGGAAGTTGCAGTTGAATAACAACTAGAGGGCTGCTGGT
TGTACATACCTGGATAGTCATATGTATTTGTATGACAACCCCATGTGGCACATGTGCTGC
TGGATGCTTGAATCACTATGGATTTCCATTCTTTTGTTTTGTCTTATTTTTCTGTTAATA
TATAATGTAAATAGAAATGTAATCTATTGAACTATTTATTATCAAAGTTATTGCAACTTT
TCAGTCTACTCATGCTAAATAAAATAATTCACATGAATATACGGACTGTACATATTTATT
TGCATACACAAACATCCATATAAACATTGCTGTAAATTCTAACATTATTATGTACAATCT
TGACCATTTGCCATTCTTTACCAAAGTATATTCATATCTTTCAGGCTGTCTGCCTATATA
CCTGTCTGTCCATCTATCTATCAATTGCTGTCTATCTATCTGTCTGTCTGTCTGTCTCTC
TCTCTATCTATCTATCTATTATCTATCTATTGCTGTATATCTATCTATCTATCTATCTAT
CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCATCAGTATAAG
ATATACATTAGAGCCTTTTGTTCCATTGGTATTGCAGCGTGGGAACAGTGTTTCCAAAAC
CAGGTTCACCCTGCTGACCTAATAAGTACAATATAAAAAAAAATTAATAAACACAAATTT
CCAGTAGAGCAAGAACATAACTATCGTCAAGCTGCCCATCTTTTCTGTACAGCAAATAAA
TAGGAAGTTAGTCCCAAAAAAGAGTGGGAAACTCGTGCATTTCTTATACATGTTTCGTTA
TTTTATTTTATTTTTACTTAAAATTATTTTAAGTATTTCATTCTGGGAAATGTCAAATGA
CCATTTCCTATCCCTGTTATTATTTTAGATAAAATGTAATCACTCAAGTCAGTACCCATA
TTCAATATGTATTATTTTAGATAACTTTTAACTCATTCTTCCTAAATAAAAATATGTGTA
AGAGTAAAATTACTCAATTAAATAGCAATAGCAATAAGTGTGTGCAACAGCTTTTTGCAA
GCTGTCTATTAAGCCGATAATAGAATATACAGCAGAAAATTATAAGCAAAGAAGGTGCAT
TTCTTCAGTTATTCTTTTTTTAATTACTTTGGTTTTATTCTATTACTATGTGCTATAAAA
AAAGGAACACATTCTGCTTTTGATTGCAGACCTTTATATATTCTCCATTCTTTGCTTTGC
CTTACATATGGCCGTTAATGGGTTTATCACCAGGAAAATGAAAAGCCGCAATATTAAACC
AACCAATACCCAACCATTTACTCAGTATATGATCCTCTGTATTTATAACGTGCCTATATA
AGAAAGAGGATACTGCTTCCTGCAATGTCTAGCTGTCAGTTGTGCTTTTGGGGGTCACAA
TTTGGCAGTAGTAGTAGTTCTCTTTTAGGGGTCCACGGGACTAATTCAAATTTACATTGC
AACAGTGCATTTACGTGTAACACATGTTACACATGTTTGGTTTTATTGCCTTACTTGAAA
TATTAAGATCAAAGCTTATTGCTGATTAGTAACTACAGGTATGGGATCTGTTATCCAGAA
ACCCATTATCCAGAAAGTTCCAAATTATGGAAAGTCCATCTTCCATAAAATCATTTCATA
AAAATTTTAGAAATTGATTTCCTTTTTCTATGTAATATAAAAAGTGCCTTGTACTTGTAA
TTAATCCTTATTATCATTAATACTTATAATTAATCCTTATTGAAAACAAAACCAGCTTAT
TGGGTTTATTTAATGTTTACATGATTTTCTAGTAGAATTAAGGTATGACGATCCAAATAA
CAGAAAGATCTGTTATACTGAGAACCCCAGGTCCCGAGCATTCTGGATAACAGGTCCCAT
ACCTGTATGGTATGGAAATATTCATTTTATTTCCAGTTATTTTCCTTTTTCATATCCCGG
CTATGTAACACTTTGCTAATCTTTTTTGGACATGTGGAGAGTTATTTGTATCAGGGACGT
CCCGTTGTTATGCAGCCTGGGGGTGTACACGAACAATGAATTTACAGACCACTTGGGGAT
TATTTTTTCTGAATGATAGTTGACAAACATAAAGTTTCACCTGTACCACATTCTCCAAAA
TCTTTTTTTAGATATATTTTCTTGTATGTTCCTCCATACCAATACGCCTTGAAGGGCAAG

ATGCCCGTCTATAAACAAAAAAGGCTATAGAAAAACACTGTTTAGAATAGGGATACAACG
TCTCTGTTGCTCCATTTGTTGCAGAACTACAGCTAACAACTTTCTCCTGCAATCTCAGCT
GCAGAGGGCCAAATGTTCTGACCCCCTTGGTACTGATAGTAATACCTTTCTCTCCAATGG
GCAAAGTAATATATCCTGCTGTGTGGTCTTGGGAAGCTCCAAAAGCTATTTCTTCTGATG
ATGGATCATTTCAAATGTTACCAGCCTGCAACGTTCATTGCCCTTAAACAAAACGTTCTT
TGTGCCACTGACCATTACCCATTACTTTCCATTTACTTTAGCAGAACTGTTGGGTTTACA
AGGAGCAGCACTGGGTATAAACGTGAGGAAGTCATTAGCCTTAGGCTAAATTAACACCTC
ACTCTCTTACTGGCAAGAACAAGCCACTCAGTAACAACAGGAAGCTGAAACCCATTGTAA
GACTGGAACTATCCCATAAAGTGTTGCTAAACACATTTACATCCACAAAGTCTCAATGCA
ATACAATGATCTCATAAAGGGTAATGCCTTTTAATTCGGTCTCAGAGCCACAAAATAGAA
TACTCTTTATCTACATTACTCTTTAAAGCTAAGCTTAGCAGTCAGTATAAAGAGCATGCA
TTTAGTGTTGTAGTTATGATTCAATTGAACTTACTTAATCTTTGATGATTAATTCGATTG
AGCTCTAATGGTAATGATTGTACAGTAAATTTGTATACTGGGATACATATCTATAATGTC
AGAAGCCAAATACCTTTGACTTTCTGGGATAATGTGTGTGTGGCCTATGATTAAAGTGGA
CCTGTCACCCAGACATAAAAAATCTGTATAATAAAAGTCCTTCTCAAATTAAACATGAAA
TACAAATTCTATTTTTTTTTTTAAGCATTCATAGCTGTTGTAAACTAATTTAAAAATCTC
AGCTGTCCATCAAATATTGTCTGCCCCCCCTCTATGCCTTAGGCAAGCAATTACTTTCAC
TTTGCATACAACATTTCCTAGATATCACTGCTCTCCCCACATTCACTCCATTCTCTTAAC
CATTTAATTGTGTAGCCAGGGCATGGGGATGGACATTGAGTCCCCCGTTCTGATGCACAA
ACAAGATTCTGAGATGGGTTACAGGTCCCCTTTAAGAGAGTCTTTCTCAAAATGCGTTAG
GCAATGCAGAATATGCACCTGTTGCAATACATATCTCATATTTTATCCAGAGTGCCGCCT
GACGATTTGTTGAGTGGTTTGGCACACATACACACACGCAGGTAATTACAGACACACAAT
AGGAGGTAGAGCAGAAAGTACAACTTAGCTTTAAAACATTCTATTTTGAAAATAATTCAT
TTTCAGAAATAAACCGCAAAGGGTTACTGTGGCAAACACTTTATGGAATGTTTGGGGACA
GGTAGCCATTCAGAAATAGATACAAGTACTGACAACTAATCTGCAGGCACTTGATGTAAC
AAAGTAGGAATCATGTGCCACCTTGTGGCTGAAAGGAAAAACAACAGTCATACTGTATAC
ATTTTAGGGTTGCCAGCTTTTTGGAAAGAATGATTTGCCTTCTTATCTGTGTTACCTTGC
TTCCATATCAAAACCACTGCTATCAGGCATTACTTATATTAAAATATGATGTTACATAAA
AAGAATTGTTTATTAAAAAACAGCAGTTATATATCTCTTTTATTTTGTAAAGTAACAAAT
AAACATGTGATCGACACTAGGAGGCAGATTTCTAACATCTGGTGAAAAAAATTGACCTAT
AGTAAACCTGCCACATATTGTCAGTTTGAGCAAAACAGCACAAAACTACAGTCACTTCGG
TTTCTTTTCAGCCATAAGGTGGTGATGGATACTTGCAACCACATGGTTGAGGTTTCTCAG
CATCATTATCCCACTAATACATGTATGGATCTGTTATCTGGAAGTCTTTTAGCCAGAAAG
TTCTGAATTGCTGGAAGGTTATCTACCACAGACTCCATTTTATCCATATAATTAAAATGT
TTAAAAATAATTTCCTTTTTCCATGTAATAATAAAACAGTACCTTGTACTTGATCCCAAC
CAATATATAATTAATCCTTACTGGAGGTAAAATAATCCTATTGGGGTTATTTAATGTTTA
AATAATTTTTTGTAGAGTTAGGGGCACATTTTACTAAACTCGAGTGAAGGGATTTAGAAT
TAAAAAAGACTTCGAATTTCCGGAGGGTTTTTTTTTGGCTACTTCGACTTTTTGACTACG
ACTTTGAATCGAACGATTCGAACTTAATTCGATTGAAGGAAATGCTGGTAAATCAATTCG
ACTTCGAGATTCGACGGTCGAATTATCGAGGGTCAATTAACCCTCGATATTCGACCAATA
GTAAATGTGCCCCCTAATGTATGGAGAACCAAACTATGGAAAGATCCCTTATCCAGAATA
TATCAGGCCCTAAGCATTTCTGCAAAACAGGTCCCATATTTGTATTGAGAAAAACTTCAG
CCAGGGAGCTGAATTAAACGTTGAGGCTGAGCTAAAAGACTTTATATATGTAAATGTGCT
CAGTGACAGAATATGACAATCCATTTCATTCACACAATGGGTTTCACTTTAACTGTTGTT
TCTGGGTGATTTGCTCATTTAATTTAGCCCAGAGTTAATGACTCCCTCACATTTACACAA
AATGCTACTCAATGGAAACCTGACAGTTGTGCTTTATAAAGTTCATGGATGATTGTGGGT
AACTGTAATTGGTACAATAAGTGTTTTGTTAGGGTACAATGGCTAGAAACAACTTTATAT

GGCCCTGACATCACTACCGCATCATTATATATGTATTGATGTAATGCTGGCAAGTTTACA
GTATTATAATAAATTATTTATTAAATTGAGTTACAGAATTAGAGGGTGTGTCTCACAAGA
GTTTACAACAATCTACTAATATGATATGATGTGGAATACTTCTAAATGATGATAGATATC
TGTGCAACTATAAGAGATCTGTGCTACTATTACTATTCTACAGCCATATTCAAGCCACTG
CCTCATTGCTAGGGTAGATTTGACCCTACCAACCAGAAAGCTGCTGCAATTCCAAACTGC
AAAGCTGCTAAAAAAATAATAAAATGAAGACCAACTGCAAATAGTCTCAGAATACCACTG
TCTACATTATGTTAACAGTCCAGTAAAGGTGAAATACCAATTTAAAACCTCTGCTGTAAG
CTGATAATGAAACAGTTCTGGTTCTACAGAAAAATACACGTCCCACTTTGTATATTGACA
CAAAGAAACCATAGATGAAAGTTAGTTAAAAATACGTTTATTCACCATAATGAAACCAAT
AAAAGTTTAGGATTGGAACTGGTCAAATAAATTTCAACCCATGCATCACTAGACCACATA
GCCCCTCCTAATATCCTGTATATGGGCATCATATAATAATAGTATGTAACAAAATAGCAC
AATTATTCATACCCATAGTGTATTGTTCCAGAATTCNGCATCATTTCATGCACCAAAAAA
ATTTGCTGCTGTAGATACAAATTCTGCATTAAAACGTGTTAGAATGTTAGTAATATATAG
TAAAATAGTGACACCTACTGGAGCTACAGAGAATGAAACATACAAAGTGTGTAGGGCGTT
TTCAACTGCTTCAACATTATTACTTAATAGAAAGCAGCTGGTCATTAATCATGAGCAGAA
ATACAGATTGACTGAGTATCAAACTATCGGACTTAAACATTAGTAGTAATAAGGTAGTAC
CAAAACATGACAACCTATTACACACCTCCAATATGTTTAACTAGATGTCCCAGCTGTATT
CTTGAGTACTCCACATAAAGGATTAGGACTGACAAACCACATTAAAATATGTACACATTG
TAATCTGTACCTTGTCAGCCTTATTCCTCCAATGGGCCCCTCTCATTCCTGGTGGTGTCA
CTCCCTGGACACCTGGCAATGTATAAAACACAAAATAGGGACTGTCCACACCAATGTTAT
TGTGGGTGCCATATCTCTTATATCATTACCATATCTCTGCCTAAAAGTATCTGTAAGTAT
ATAGGCAGCATATAGGCAGCATATAGGCAGCATCATGGGATTGTTTACTCTGCACAATAT
TAACAAAACAGAAAACGGGCTGGTACAAGTCTGACTGAAGAGGGAGGTTCTTTAACACTG
TACTATAATCCAACTACCACAAGGCAGTGGGTACAAGGCCAGGTATTTTTCAGGGTATAG
ATGCAAAGAGCGTCATTTTTTTTGGTGTAACCACATTCCCCCTACATACCTACCTATGGC
TCTTACTAATCACTGGCTCATGTGTAGGGNNNCCTTCAGTATCATGTAGAAAGTGATATC
TGAGAATTTCAATTGGTTTCATTTTTTTTTACCTGTACAGAATAATATGCACAGAGTTTC
ACTTTAAAATTGGTTAATTTATTTTTTAGATGCTATCAAAATGTGGTCAATTCCAGCTGA
TATATAGAAGGTCTTTTCCAGGAACATGTTTCATTTAGACAGTAGCTGTGTATCCTGAGG
CTTTATTCAATATTCCAGTACTTTGCGGAACCTTCTGCTCTCCAGACATGAAATCTAAAA
TGAAAGGAAGAAAGGATGAGTGAAAGAGTTCCATGATATCTGAGCCTAGGCTTTGCATAT
TCTTACCCAAACAGTTCTACAAGAGAAGAAACAGGATTACTGACCTACAGATATATACTA
TATGGTACCCCAACCAGACAGGGAGGAGCCAGACTTGGAAAATATAACCTGATGTAACCA
AAGGTATTTCCTTTATGTGAGTGTGGTGGCTGATAACATTTTATGGTCTTCAATGTAGGA
ATAAAGTAACAGAGAATATATTACTGATATTACTGATAAGGCCAAAGAACAAGCATTGCC
CTTTTTTTGTGTTTTTGCAACCGTTTTGCTGAGATGATCAATAGAACTACAATATGCCTT
GCTTTCAGAACTTCCTTTATTTACTAGAAATCATCTGATTAGCAAAAATATTTATGTTTT
TACCTGTCTACCGGTGTCCTCCTTTATCCTTACAACTTCTAGAGGGGGCATTCATTAATT
TTGGGGATAGTAAACTACATTTTTATAATAGAAAAGGAGCACCTTTGGGTTTTAGAATTC
TACTAGGAGCAGCCAGATGCGATTTTAGGAACAAAACAACCAAAAATCAAAGCATCTTAG
TCCTTTTTTGGTAACCACGAATCTGTAATTTAGTCATTTATAAACTACTGTTCTTTCATA
AGGAACTTTTAAATTTACAATCTTGTATTAATGATACAGACAATAGTACTGTAAAAAATA
TTGACTGACTTACATTTTTATATTTTTCTAAGCCAGTTTGGCATATAGACTGCTGTCTGG
GACAATGAATTAAGCAGTATAGAGTAGATCTAAATGCAATGGTAACTAACTAACCATATA
ATAAAAATCTCACCTGTATCCTGGTTGGTAAATGTGAATGATGGCGTGGAGGAAAACTGT
GCAGCTGGTTCAATATGGCAATACTGGAAAATAAAAGCTCAGAAAAAATGGTTAACAAGG
ATATTTTTCCATAAAGATTATTGTTAGAAGCTCTTAGGAAGGCTATCAGGGTTCATGTGC

TCAATGGGGGACAGGTGAAATATGGAAAATATAACTTGATTTCTAAACTTGATTTGCATG
TTTTTTTTTATTTCTTATGTTAATTAAATTTTTTGGACCAATGAGGGGTAAATATATTCT
CTCTATACTAAGATAGTCATTAATGCACAAAGACTACATATTGTGCACTTCATCTGACAA
TAAATGAGGTTATTCCAAGTAAAAAATATGGAAGCACAGCTGACTGGTACTCGAACAGAT
CCACAGGACCAGAAATGTTCAGTTAAAAAATAATTTTATTGGTAGAAAAGTTAAAAATAT
AGCTGCATCTCCATCCACCCTACGCGTTTAGGGCATTTTAGAACTGAATATCTCTGGTCC
TGTGGATCCGTTCAAGTGCCGGTCAGCTCTGCTTCCATATTCTCTGCTGTACCGCTCCCT
AAAGCTGGAGGTCTGGGGCTGGTGCACCCAGGAACACTTTCACTGTTTGGTGAGTTACTT
TACATTTAATTCTGGAGCACCATGTTCTCCCCTAATTACTTAAATTGTTATTCCAAGTAA
GGTGGCTATTATCAGCAGTAAGGTTTCCTAATGTTGTAAATCTCATCTGATCAACCATAA
TGTGTTGGTAAGAATTCTATAGTTTCTAGATGTAGGTTGGTATTACCAGAGGGGTACCGC
TAGTGGCTTGTGAATGGATAAAGATTGAAAATTGAGCCATCACAGGCCACTAGCTATGCC
CACCCCAATCCCCCCCTCTGGTGACATCACAGGCCATGTATAGATGTTGGTAACAGGCAG
TGCATAGCATGAAATATAAGGGGGGAAGAAGATGGGGGGATTTTTTTTCTTTTTTTAAAC
TTAGAACTGTAATAAATAGCCACTTCATAAGCACCTGGATGTTAAATAAGTGATGGACAA
GCATGTGGTTTAGTCAATGCCCTCTTTTACAGTTTTTGCAAATATTTAGGTGGTATATAG
GATGTACTTTGTGGGTGAATTTAGCCAGATATACATACTGGCATCAGGATCAAAATTGTA
CTTGTCCAATCTCTGTGGCACTGTGGTGGAATGTAATTTAAAGCATATTTTTGGTGGCTA
TGTCTTTCTCAAGGAAAAAACTTAGATCTTAGCATTAAAGGCAGCTGCAAGTCCTTGCTC
TGGTGTTGGTGGCTGCTTATACAAACACACCTACAAACCTGGATCTAAAATGTCAGATGA
AAGCAGGTGACAAATATTTTCCGATGGCAACATAACCTGTTGGATTTCTAAGGTACAGCA
GAACAGCAGTTAAACCTGCAAGAAGCTGAAGGTGTTAACAGAATAAATACATTCTCTGTA
TATTATGCTAGTTATTAAGGCATTAATAATACATATTTTGCACTACATCTGACAATACAT
GGGGCTATTCCTTAATATACATAGCATGAATGACATTAATTAAGGGTCTGGATGAACAAG
TATGGTGGCTGTTATTAGAAGCAGCTTTTCCTAATGTTGGAAATCTCAGCTGATCAACCA
TAAGACCTTGGTAAGAATTCTACACAAGTTTAGATGTAGATTGTGATAGCACCAGAGGGG
TACCGCTAGTGGCTTGTGAATGGACAAAGATTGAAAATTGAGCCATCACAGGCCACTAGC
CATGCCCACCCCAATCCCCCCCTCTGGTGACATCACAGGCCATGTATAGATGTTGGTAGC
AGACTGTGCATAGCATGAAATATAACCTTTGTGTGGAAGATAAGATGGGGAGGATGGGTA
AGATGGAAAAACATGGGTAACATGGGGGGGATTTTTTTTTTTTGTGTTTTTTTTTTAACTT
AGAACAAAAACTATTAACAAGAACAAAAATAAGCATTAAAGGCAGCTGGTTTGCTCTGGT
GTTGGTGGCTGCCTCACACACTCTCCTACAAACCTGTATCTAATACATCAGATGAAAGCA
GGTGACAAATCTCCATTTCGGGTGGCAATTTAACCTGTTGGTTATCTAAGGTATAGCATA
CTAGCAGTTAACCTGCAAGAAGCTGAAGGTGTTGACAGCATCGAGATGGATACACAGCAT
TCACTTACCTTAGTTGATGCCAGAATGTTATACTTTACCCGATGGGTTGCTAAAGATGAA
GAATTGGGAGAAACCAGGCAGATGTTCCCAGTGGAAATGTTGCACAACATATCGATTGTC
ACTGTGTGCAAGTTGGCTTCTACCTCTTCAGTGGCACAAAGATGGCTTAATTCTTGCCAG
CTTTGGATCTACGATAGCTGAAATTTTCAAGCACGCTGGTTTCCCCTGGGGGTCTTCCTT
TTGGGGAATGGGATGTTCCTAATTGCAAAGCCCTTGCAAACTGGATTTTTATAGGATTGA
AAAAANNNCATACCTTGGCACTACAGATATTAGGCTACTTCTAGTCCTAATGTATATACC
CACTTAAGGGACCAGGGACCAGACCCATTTAAGCATAAAACTCCTTACAGGTTTGGAGCA
ACCATATTGGGTAATAATAGCACCATATCATCAAGAAGCGTGAAAGGGATATTGAAAGAG
CAGGGAGAAGCATTGTCATAAGATAGGAGAGTTTATAAGACAAACCATAGATACCAAGAA
AAATGTAAAAGCAACACAGAAGACAGAAGAAGAGCAAAAACAAAACATGGAAAAGATAAA
TATTTAGGGGTAAAGAAGTGTTGGCCATCTGGATCATTTACTGGGCTACTTTTTGGTGCT
CACTGAACTCTCGGTTTTTAAAGCCAGCATGACTAACATTTTTCATTGATGCTCATGGTT
ATCTTGCACAATAATCCTCACTGTTTTGTGCTACTTCAACACTTACTGTACTACTATACT

CTAACCTTACACATCCACCTTCCCTATGGGCCCCCTTCCTAACATGAACTTCTACTAGAG
CCTTTGTACTCCAGGCTGTAAACATGCTGGCCACACTTGGCAGAGAAGTAGCTTTACTCC
TAGAAATACATCCACTTCTATGACAGGCCACAGATTGGGACTCCCTATGCAGATGATCGA
GGTCGAC

Genomischer Phagenklon F1 (xtFoxD5):

GAATTCCTTTGTTGTGGCTTTTTTGTGCATTTCACCATATGTGAACATAGAAGTTATATA
ACTTTGTTTCTTCATACTGAAATGCCAAACACAGAAGCATGTGAAACAAAGCAAACTCCC
ATGTCTAAGGGTGAAGAGTAAAGCCCAATAATTCATTACGTACAGGGTTATTGTAATTCT
ACCAGCTGGTATTTAAACTTGTGGCTGCAGAAAATCTTGGTCTGCCAATCAGTTTTCAAG
ATACACAAATGGCTCTTCCATGGTGCTTAAGCATCTAAGGTATTGGGGCATAAGAGCAAA
AATAAAAATCCCATGCAAAATCCCACTCGTTTTTTGTTTGTTTTTGTTTTTTTAATTTGG
GACAGTATTCCAGCTATTTTTTTTAGGAACCAGTCCCCTTTTACAGAAATATTCATTGGA
TTTTGGAGATTCATCTGTATTGAACCATTTTTTTTCCTATAAATGCAAAGACTTACATGT
CTATGTTTGTATAGAAAAGCATAAACATGGTTAGAAAGCAATTGGTGTAAAAGATCAAAG
GAAAAAGAAAACAAAATAGTTTTTCAATATTACATTATAGACAGATCCATAAGTAACAGA
CTTTAATACAAGAATATAAAGAATCTGCTCTATGACTTCTTGCTATACTTTAGTTAAAGA
CCAAATATATTCCCTTTTAAGATCTATACTTATTTATTTACCATTACTTTTTATAATGTT
ACCTTGCCTGTGAGTGCTTGTTTATATATATAATTGTACAGCACTACAAATCTTACTAGA
GCTTTATAAATAAAGTTATACACACATATGTGTTCAGAGGAGTTTAGTGTTTTGTTATGT
TTTTTTAATTTTTAGAGTATGTAGGATAAATCATTTTAAACAATTTAATCTTTTACTCAC
AAACAATCTCCTTGTGCAATAATTGTCCCTAAATCTTAACTGGATATTTCTAAATGTGTG
CAAGTTTAGTGAGAATATTAGTTTAACACAAATATATCAGTAGGACCCCCAATAATGGAC
ACAAACATGAATGGCAAGGAGCTCAGGAATTGAGAGTTTTACAGTTGTTATCACTATCTG
CCCTTGAAAGCCCCCCTGTGGTGTTGTGCAAACTGTAGGCTGTAGAGCCATTTCCTACGC
TGCCTTCATATGCAGAGCTGCTAATAGTCTCTTCTAACACCTTCTTTTCAGATCACAGAT
GGGGGTCTTCTGCTAATTGGATTCAATTCCATTGCCAAAACCACCTGCAAGCCATGGGCA
GTTTCAGACAGGGGCAAATTAGCATGTGGGTGGGGCATGGCTTTGCTGTTCTTGTGCAAA
GTGGCCATTCCCTCATTCCCTTGCATTCAACCAGAATTCTACACTATGCATTTCCAGGCA
AATACCATTGCTTACATCTAATTATAATTGAATGATGATCGAAGTTTTTCAATATTGCAT
ATCTTGTCAGTGGAACAGAATGCAGAATATCTAGATATCAATGATGTATCGGTTATTGAT
TGCCTTATATGTTACTCTGTATGTCCAATGTATGGAACCCACTTATTGTACAGCGCTGCG
GAATATGCTGGCTCTTTATAAATAAATGTTAATAATAATACAGTCCATTGCTTCTTAAAT
AAAAGGAAGCATTACAGATATAACAGAACTCTAACTCCCATAATCTGTTAGCCCAGTAAG
TGGAGGGATTCTGAGAGGTATAGTTTACTTGGCATGTCATTTCCAGCACTATTAACCAAT
TTCTCTACAACATGTAATATTTTCTTATAGTGCCATGCTGCACAATCAGGTATCAATCTA
ACTAGTTAGCACTATATAGGGAGTGTGTGTGTTTGTATATGCCACTATTTTAATAGGA
ATTTGTGATTAGTGGTCAGTAAACAGAGATGGTGACTTCCACAGATGTGCACATTTCCCT
CTAGTATATAAATAAAAACAGCTTATACTCTTGAAAAAAATATGCTAAGGGTTTTACAAA
TAAAAATTGTACAGCATATTTTATACATATGTGAGAGAATAAATAAATTCATATATATAT
ATATATATATATATATATAGTAAACACTGAGTGGATCTATTTGATGTATATTGGATTGTA
TATATATATATATGTATGTGTAGATATATATATATATATATATACATACATATGTAGA
TATATATATATATATATATATATATATACATACATGTGTAGATATATATATATATATA
TATATATACATACATCCAATAGATCCAATCAGTGTTTAAGTCCCAGTGTCCATTAGCATT
TTTTCAATATATATATCCATATATTTTTTTTATTTATTTATTCTCTCACAAATGTATAAA

ATCTGCTATACAATTTTTATTTGTAAACCCCTTAGCATATTTATTTTCATAAGCTATATA
TATATGTATATATACATTTGCATTGTTTGATAATGCAGTTTAGGTTAGATTTGTTTGCAA
GTTTGGTTAGACTACAGATCCCATACATGCAGTAGACTTAAGTGATAGTTCATCAGAACT
ATATAACAGATACCCCATCCTCATTCAACAACAGCACAGCCCATGCAAGTTCTGACCCCC
CCCCCTCCCTCAGCTGCCCCTCCCTCCCAGGTGCAGGACCCTCTCACACAAAGGCTTATC
TGACAGATTAGCTCCAATTCAAGTGCAGATGACTGCAGGGGCACAGCAGTGCTTATATAA
AGAGGAGGGGGAGAGAGCAGGGATATATCATTCATCCCCTTGGCCCTTTGGAGACTACAC
ATTCACAGAAAGCATCAGTGCTAGCAATGAGCCTTAGCCAGGAGTCTGGTGCCCACCATG
ACCCCCAGGATTATCCGGTAGTATCTGATGAGGAGGATGAAATTGATATTCTTGGAGAAG
ATGATTCTTGCAGTCTAAAGTCACACTTTTACCTACAGCCAACACATTCAGAGATGGGGG
ACAGTGGCATTCTGAGCCCTTCCAAGCTAAGCTGCACTGAAAGTGAGAGCGATTCCTCTG
GAGAGAGTGAAGGAGGTACTTCTAAAGACTCCCCAGCCACCCCATCTGGTGGCAAAGCCA
AAAGGGCCCTTGTAAAGCCCCCTTATTCTTATATTGCTCTAATCACTATGGCTATCCTGC
AGAGCCCACACAAGAAACTGACTCTCAGTGGCATCTGTGATTTTATCAGCAGCAAGTTCC
CTTACTACAAGGACAAGTTCCCTGCTTGGCAGAACTCCATCAGGCACAACCTGTCCCTTA
ATGACTGCTTTATTAAAATACCACGGGAACCAGGAAATCCAGGAAAAGGCAACTACTGGA
CCCTGGACCCTGCCTCTGAGGACATGTTTGATAATGGGAGCTTCCTTAGAAGGCGGAAAA
GGTTTAAGAGGCACCAGCAGGAGTTCTTTAAAGATGGACTTGTGATGTACAACCCACTGC
CTTACTACAGACCCTACAGTACCATCCAACCACAGCAAGTGCTCCAGCAGACTCCAGTGG
CATGCATGGCAATACCAGAAAATTTGACCATGCCAACTCACCTTGCTCCCTACCCAGACA
TAAAGAGGAAAGTTCCTTACCCTGACCAGGGGGTACACAGGGGGTTTGAAGCCCTGGATG
CTGATAACCACCCCAATAAGTCTCAGAGCAAATGTTCATTTAGTATTGAGAACATCATGA
GGAAACCCAAGGAGCCAGAGCCAAGTTTTTCAACCTTTAACCCACACTGGAACTATAATC
ACTTATTGCAGAGGCCAAATTCCTGCCTTCTCCCAGCTGTGCTTAACCTATCCACTGGCC
CTCTGCTATCCAATGCCCAGGGCACCAGGCAATACAACCTCATAAAATTCCCTGGGTGTT
ACTGAAGTAAGTCACTTTGGGTCTCACATAGCCCCTGTACTGCCCTACCCATATCCTTTC
AGGATTTTTCCTTATAACTGGTGGATTCTGCCACTAGGACTTTCTTGTGTCCAACCCAGA
GATTTTCATTTTATTTATTGTCAAAGACAGGTTTATCCAATCTGCATCTAGCATCCCCTA
AATTATAAGGTTGTCAGGGGAGATGATAGTTGCAGTTCATTAACAGCTGAAGGGCCACCA
GTTGTAAATACCTCGACAGTCATAAGTACTTGTGTGAGAGCCCCAAGTGGCACATGTGAT
GCTGGATGCTTGAATCGCTATGGATTGTATGTGTATTTAGAGACACTGAAATGATGGCTG
AGGACTTCACTTGGCCCCTGTGGGCAACGGGTATGCAGTTTTGTAATGTCATTTGTTTGC
TTTTATGTCTTATTTTTCTGTTAATATTTAATGTAAATAGAAATGTAATCTATTGAATTA
TTTATTATGAAATTTATTGCAACTTTTCGCTTCTACTCACATGAATAAAATCATTCAAAT
GAATATACGGACTGTAGATATTTCTTTCCATATACAAACATTCATATAAACTTTACTTTC
CATCATCACTTTACATCATAATCTTAATTTGTGCAATTTCAGGTTCTTTAGCACAATATT
TTCACAGCTTTCTGTCTGTCTGTCAACATACTTGTTTATCTATCTATCTATCTATCTATC
ATCTATCTATCCATCTTTCTCTATCTATATAAAATATACTTTATAGCCTTTTGTTAAATT
GTTATTGCAGCGTGGAACCAGTCTTTCCAAAACCAGGTTATAGGTTAACCCTGCTGATCT
TAAAAGTACAATATAAATTTTCAGCATAGCAAGAACATAACTAACACTAAACTGCCCATC
ATTTCTCTACAACAAATGTAACAAATGAATAGGGAGTAAAAACTGTGGGAGGTTCATTAT
TTGAAGTATTTAATTTTGGGGGAAATGTAATTAAACGTCACACAGTTTAAGATATAACAA
CAATAAATTCAAATTAACATTTCCTATGTCCGATAATATTTAATATAAAATTTTATCACT
GAAACCAGTACTCATACCCGTACATGAATATTATTTTAGATACTTCATACACTAATTTTC
TCTAAATAAAAATATGTGTCAGACCAAAATCTTCATTTCACATTCTGCAAATGAAGCCAC
TAATAGGTTATACAGCAGAAAGTTACAGGCAAAGGCTGTGCATTTCTCTAAATGATTTTA
ATCATACTTTTTGTTGGGTTTTATTTCACTATAAGATCCTCTGGATTTATGATGTGCCGA

TTATAAGGAAGAGATAGCTTCCCACGACATCTAGGTTTGGGGGTTTACAGCCGATGGATA
TCAGCTGTTGCTTGTGCTTATGGGGTCTTTAAAAAATACAGGGCACAGTCCAGCAGTAGG
AATTCTAAATTTTTTAGAGGTTCATGGGACTTATGTAAAGTAAATTGCAACACCTGCTGA
TTAGTTGCTACAGATCACTTCAAGGTCCAATTGAGCCCCTGTGAGTCCTCAGTACGTCAA
TGGTAATTTTTTTCCAGTTATTTCATTTTAATTGTTGCTATGTGACACTTCACTGGTATT
GTTTTACTGAATATCTGGTGAGGTAGCTGTGTTAATGTCACTTTCCTTTTTTAATGGAGC
CTGGGGGTGTAGAAGGAAAGTAAACTTGCAGACCATTTGGGGATTGGTCTTTGAAAAATG
TTTGTTTTGCAAGAAACATAAAGTTTTATCTGTACTACCTTCTTCAAAACTGTTTCAGCT
ATATTTTCTTATATATTTTTCCATGCTGATACTCTTTGCAGGGCAAGATGCTTTTCTATA
CATAGGCACTGAATAAAAAAGGCTATTTAGATTAGGGATATACAGCCTTTGTTGCTGCTT
CTGTTGCAGAACTACAGTTCACAATATGCTCCTGTAAACTCCACTAATAGAGAGGTGCTG
AGTGCTGCAGAGAGCAAAATGTTCTGACCCATTTGGTACTGATAGTAATACCTTTCTCTT
CCAAACAAAATATCCTGTTGCATGATCTTTGGAAGCTCCAAAAGCTATTTCTTTTGATGA
TGGGTCATTAAAAACTTTCCCAGCCTGCAATGTTCATTGCCCTCTAACACAACTCTTTTT
GTGTCAGTTACAATTGCCTATAACCCTCCATGTAATTCAGCAGTACTGTTAGATTTACAA
GGAGCAGCGCTGGGTGTAAACGCTAGGAAGTCATTAGCCTCTGGCTAAATTAACACCTCA
CACTCGTACTGGCAAGAACAAGCTACTCAGTAACAATAGAGAGCTGAAACCCATTGTGAA
AATGGAACGGATTGCCCATATTCTGCTACTGAGCACATTTACATACCACAAAGTCACAGC
AGTACCACAGGGAATAAAGGGAAATGCCATTAGCTCAGTCTCAGAATCACAAACTAGAAT
ATTCTTTTATATACAGTATTCGTATAAGCAAAGCACAGTAGTCAGTACACACGCACTTGG
CATTGTACTTAGCAAGATATGATGCAATTAAACACATTGAAGTGCACAGTTACCACATTT
ACCTCCAATATGGTACCATGCAACATTGCAACACACTACTTTTTAAAAAAATTAAATGGT
TTGAGCTTTTGTGGTAATCACTGTACAGTGAGTTTTTTATTATGGGGATAAATGGCTTTC
ATGGAATGTACAAACATACCAAATACTAGGTAGAACAGAAAAGTAACACAACTTTGCTTT
AAAACTATCCATTTGTGAAGAATTATAATAAGGGTATTGTCCTTAATTAACAGAAATAAA
CTGCAAAGGGATACTGTGGCAACACTATACAGAGTGTTTGGGGACTGACTGTTTCTTCTG
TAGCCATACAGAAATTGATACTGGCAAGTAATCTGCAGAAATGTGAAATAACACAATAGA
TATCATATGCCACCTAGTGGCTGAAGGGAAAAACAACAGTTATTTTGTATAAATTCTAGG
GGGTTTGGCCTTCCAATCTGTGTTATCTTGGATTCCTTTTAATAACATTGGTATCAGGAA
TAGTTATCACTCTCCCTTTTCATATAAATTGGAAGCTGATGTTACATAGAATGGGCTGTT
TATAAAGGTTACTGTAACAGCAGTTATATTTTTTTATCTTGTTAAATAATGAATAAGCAC
ATGATTGACACTATGAGAATGATTTTAGCCTCTCTTCTACAGCAACACTCAGCTGGGGCC
TCAACCCTAAGGTGAATGAGTAGATTTTTTTTTTTTTTAAATAAAATCAATGCATTAATA
TTTGTATGGGCTGTTGAAGGCCCTTAAATCACTAATTTCTTTAAGAATAAGGCAAGTAAC
CTTTTTCAACTAGCCAGTCATAAAGTGCCTTACTACCGTTCATAGACGGTGTTGTAGTGT
GCCTCCTGAGACTAGTTGATCCTCAAAACAGTATCACATGATGCTGTGTAGCCAATTTAG
TTTCATAAAAAGACATTGAAATTTTGGGCCAGATTTACTAACGTGGCCAACATGTTCTGT
GGTACAATGTTCCCTGGATGTCTGGCCAGGCATTAGCCAGAGAGCTCAATAAAGGGCTGA
GGATAAGTAAAGTTTATATATGTAAATGTTCTCAATGACAGACTATGGGCAATTAATTCC
ATTCACACAATGAGTTTCAATTCACTGTTGTTACTGGGTGATTTGCTCTTGCCATTCAGA
GAATTTAACTTAGCCCAGGGTTAATGACTTTCTCACATTTACACAAAATACTACTCAATG
GAAACCTGACAATTGTGCTTTAAAAAGTTCATGGAGGGCTGTGGGTAATTGTAATTGGTT
CAATTATATTTTGGGAACAAGGAATGTTGCCGGCTATGGAAAACTTTGAAAGACCCATCA
CTACTTCACAATTGTATATTTATTTATATAAATCAGGCAAGTCTACAAAAGTGTCATAAA
TTAGGGTCTAGAATTAAATTAACAGGTGGGATATAGCTGGCTGATCTGATAATTTGGCCC
ATAGGCCAAACGATCAGATTACAGTGCTGAGGGCGACGTCAACAAGTCATTGCAGTGCCC
CCTGACGGGAAAATCAAACCTGCAAGTTTTAATCAGATATTGGTTATGTAGGCCCATTGG

GGGGCCCAAAACATGGGCAGATAAGCTGTCAAATTGGCATTTTAAATCTGCCCATGTATG
GTAACCTTTGGAGGGTGTTTCTCACAATTTAATTCACCTAATTAAAGCACTTTTGTAGCT
TTCAAAGCCTTAAACATTTGCCTCCAGCCCTGTATTCTGCCAGGAAATTAATTAAATATC
ACACTTTAAGCCAGTAACTTGCAAACTATAGTGCTGCCCCCTCCATGGGTTCCTACCTAA
AGCAGTGAAGGGGTGAAGCCAGCATAAAATTAGAAAAAAATACTGGCCCTTCAACATTTT
TTTTCCTTTTAATAACATTGGCATGAAGCATAATTTTTACTGGTTAAGCCGGTAAAAGTT
CTGGCCAGGTGGCAGCCCTATCTGAAGGTAACTGCTGTGGCCAAGTTTTAATATACCTGT
ATCCTTCTTATGGGCTAATCAAATAGTTTGTCTACAAAGGGAATAAAAACCCAAAAGGCC
TAAGGCTGATGTCAGACGTGGTATATTCTCTGCAAGCCGAAAAACGATTTAATGTGTATT
TTCGGCTGCACGTGCCTGCACCCGAGCGTATCTCATTCATTCGGGTGCAGGCACAAGTAG
GGTGCATTTCCAGTAGTGTGCGTATTCTCGGCAAGCATTTTTCGGCTTGCTGAGAGTACG
CCACGTCTGACATCAGCCTTAACCTCTAGTCAGGTTCTGCAAATTTTCACACAACAACAA
ATTCAGTGCTAGCAAGAATAGGGAAAAAATCATCCCCCGCCCCCGAATAGCAAATCTATT
AAAAAAATGTATAAAGAAGTATAAGTTTGAAAGTCTATCCACCTTTAAGGTTACACCGCT
TCTTCTAGTGATGGCAAAATGCGTCCATATCTAAATAGCAAAACATTTTGAATAAGCGTT
CTATGCAATTATTAGGGTGTATAATCACACCAAAGTTAAGTTGTATGGAAAATGCAGTCT
GTCACTAAGTGGTTTATGCACATACCAATAAAAAGGAAACCACTGACTCTGGAATTAAGT
TAGATACTTGGGTACAGAAGGTTCAACAATATATTTATTATGTGAAAAGCAAATACTTTG
TGATCCAGGTTGAGGGAACATGTTTTTAAAAGATATTTTACAAGTTTCAATGAGACCAAC
AGCAAAAAACAGTATTCTGGGAATCATGCCTGCCACTCCTCTCACTCTGCAGGTGGTGAA
CCATATTCACTGATCAGCTTCTCCCTGACCATCCCTGCCCTGTCCCAACCTTATTTCTGA
CACCAGACAAGGATAGCCACTGTTATCTATATGCACATGCTTGCCCCCTCTGGTGACATC
AGAGATGTGTGTATATATAATTTAGTGCTGCCCAACCAGTTTGGGTTAGGGTGGGCAAGT
GTTGGCGTGGGTTAAAGAAATTTTGACTCCTGCATCACCAGTCCACATAAGTCTTTTGTG
ATTCCTAATATCTAGATATTGGATATGCAAAAAAATGTGCACAGTTATTCATATTTTTAT
ACCCACAGTCTATTGCTTCTCAGAGTTCCAGCAACATTCCATGCACCACAGACTCTCCCT
GCTGCTGGATGCAAGATCTGCATTAAAACTTGTTACAATGTTGGTGCTGTTGTGATATAC
AATAAAACAGTGACACCTACTGGTGATTTTCTGAAGAGCTACAGAAAATGAAATAAATTG
GAAGGTATGTAGGGCCATTCCAGCTGCTTGACCACTATCACTTCGTACAAAGTAGCTAGT
CATAAGCAGAAATATAGCTTGACTGTGGAGTACTCAACTATCTCATTTAAGAGTAAGTAA
TAAGATAGTAACAAAGCATTACAAACTACACAACAGCAATACATCCAAGCTGTATTAGAA
TAAAAAATAAAAATATTGTTATTTGTACTTTTATTAGCTTCTTTCCTCCAAAGGGGCCCC
TTTGATTCTAAATGCTACCACCTGGAAGTCTGGCAACATCTCGATGTCAATGTAAAATAC
AAAATAGGAGCTTCACACACCAATGCTCTTTTACGTGTAACACTAATTTATTCAACCATT
ACCATATCTTCCTAAAACTATCTGTAAGTATGCAGGCATCATGGGATTATTTCAACTACA
ACAATCCTACCAACCCTAGCACACAGGTTACTATTCAGAAGGTGGTAATAGTGTATTGGC
ACAGCCCTGCCTGAAAGGAAGGTTTCTTCAGTATTGCATCTGTCATTTTTTAGTTAGCTA
ATAACTTGCTAGGAATAACATAAGTAAAAGACACTCTAAAAATAATCAGCAACCAACCCC
CGAGAAAGCAACTACACGTATCAAGGAAGGCTGCAGGGCCAAACCTACAGGGTTAAAGGG
GATGTAAAGTCATTTTTTTAAAAATACATATACAGATTTGTAGTACTTAATTAAAAACTT
TGTAATATATGTTAAATATATATTGTTTTTGCAGCTCTCTTTTCTCTTTCTTGATCACGT
TTCAGTGGGGAATTC