

5 Diskussion

5.1 Isolierung humaner *GCNF*-cDNAs

Die Arbeitsgruppen von O'Malley und Jetten haben den neuen Waisen-Kernrezeptor der Maus „*Germ Cell Nuclear Factor*“ (*GCNF*) beschrieben, der beinahe ausschließlich in den Keimzellen des Testis und in reifen Oozyten im Ovar adulter Tiere exprimiert wird (Chen *et al.*, 1994; Hirose *et al.*, 1995). Obwohl die physiologische Funktion des Rezeptors bisher nicht bekannt ist, legt die beinahe exklusive Expression in den Keimzellen der adulten Tiere die Vermutung nahe, daß *GCNF* eine Funktion bei der Keimzellentwicklung haben könnte. Aus diesem Grund wurde das humane Ortholog zur Maus-*GCNF*-cDNA-Sequenz isoliert und charakterisiert.

Entsprechend des Expressionsprofils von *mGCNF* wurde eine humane Testis cDNA-Bank (Krätzschar *et al.*, 1996) für die Durchmusterung ausgewählt. Um die Durchmusterung unter stringenten Bedingungen durchführen zu können, wurde als Sonde ein humanes *GCNF*-Fragment durch PCR-Amplifikation erstellt. Die Arbeitsgruppen von Borgmeyer, Jetten und Cooney haben für die Isolierung der humanen *GCNF*-cDNA jeweils *mGCNF*-cDNA-Fragmente verwendet (Lei *et al.*, 1997, Agoulnik *et al.*, 1998), wobei Borgmeyer *hGCNF* als Einziger aus der humanen embryonalen Karzinom-Zelllinie NT2/D1 isoliert hat (Süsens *et al.*, 1996). Die Sequenz der an vier Positionen degenerierten Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation wurde aus einem Sequenzvergleich der DNA-Bindungsdomäne von 28 Kernrezeptoren abgeleitet, da dieser Bereich zwischen den Kernrezeptoren am besten konserviert ist. Die Sequenzanalyse der amplifizierten und subklonierten cDNA-Fragmente zeigte, daß unter anderem ein Fragment mit einer DNA-Sequenzidentität von 88,3% zur *mGCNF*-cDNA-Sequenz vorlag (siehe 4.1.1). Wie aufgrund des stark konservierten Bereichs der DNA-Bindungsdomäne zu erwarten war, wurden außerdem cDNA-Fragmente der Kernrezeptoren TR3, TR4, TR, RXR und TR2-9 identifiziert.

Die Durchmusterung der humanen Testis cDNA-Bank führte zur Identifizierung von 5 *hGCNF*-cDNA-Klonen (siehe 4.1.3). Aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz wurde ersichtlich, daß die beiden *hGCNF*-cDNA-Klone Klon#1 und Klon#5 für ein 479 bzw. 480 Aminosäuren Protein kodieren, und daß die drei Klone Klon#7, Klon#10 und Klon#12 bis auf den 5'-Bereich einen Großteil des kodierenden Bereichs besitzen. Klon#1 und Klon#5 unterscheiden sich lediglich in einer internen Deletion von 3 bp, was zum Fehlen des

Aminosäurerestes Serin in der kodierten Proteinsequenz bei Klon#1 führt, was wahrscheinlich auf alternatives *Splicen* zurückzuführen ist und auf die Verwendung einer alternativen Polyadenylierungsstelle (Position 1866 und 1879). Am 5'-Ende sind bei Klon#7 und Klon#12, verglichen mit der cDNA-Sequenz von Klon#5 vor der Nukleotidposition 258, und bei Klon#10 vor der Position 300, unbekannte Sequenzen vorgelagert. Der Übergang zur hGCNF-Sequenz zeigt die Intron/Exon-typische Nukleotidabfolge AG-GT, so daß nach den Positionen 257 und 299 wahrscheinlich Intron-Exon-Grenzen vorliegen. Bei Klon#10 zeigte sich nach der Nukleotidposition 537 ebenfalls eine unbekannte Sequenz, so daß nur 237 bp mit den übrigen Klonen übereinstimmten. Die Sequenzen der Klone Klon#7, Klon#10 und Klon#12 sind somit eventuell durch unvollständiges *Splicen* entstanden. Die bei Klon#1 beschriebene Deletion der Aminosäure Serin liegt sowohl bei Klon#7 als auch Klon#12 nicht vor. Daher wurde für weitere Arbeiten die cDNA-Sequenz von Klon#5 verwendet. Bei Klon#5 und Klon#12 lag die Polyadenylierungsstelle 276 bp stromabwärts nach dem Stopkodon, bei Klon#1 266 bp und bei Klon#7 290 bp nach dem Stopkodon. Klon#12 zeigte nach dem Poly-A-Schwanz eine unbekannte Sequenz von ca. 2,5 kb Länge, was auf ein Artefakt bei der Erstellung der cDNA-Bank zurückzuführen ist. Die Entstehung von Testis-spezifischen Isoformen durch die Verwendung unterschiedlicher Polyadenylierungsstellen bzw. alternatives *Splicing* ist für eine Reihe verschiedener Proteine beschrieben worden und führt oftmals zu einer veränderten Funktion des Proteins (Venables und Eperon, 1999). Inwiefern die isolierten Isoformen von hGCNF ebenfalls unterschiedliche Aufgaben erfüllen, läßt sich bisher nicht beurteilen. Inzwischen sind drei weitere Isoformen von hGCNF von den Arbeitsgruppen von Borgmeyer, Jetten und Cooney kloniert worden, die sich alle nur geringfügig in der N-terminalen Struktur des Proteins unterscheiden, nicht jedoch in der DNA- oder der Ligandenbindungsdomäne (Süsens *et al.*, 1996; Lei *et al.*, 1997; Agoulnik *et al.*, 1998).

5.2 Die hGCNF-cDNA und das hGCNF-Protein

Die Sequenzgegenüberstellung der abgeleiteten humanen GCNF-Proteinsequenz mit der Maus- und der Xenopus-Sequenz hatte ergeben, daß die GCNF-Orthologe mit 98,3% bzw. 82,7% Identität hoch konserviert sind (siehe 4.1.4). Damit ist GCNF zwischen den Spezies besser konserviert als beispielsweise RXR. Die DBD von GCNF ist zwischen Mensch und Maus 100% und zu Xenopus 98% identisch. Das läßt darauf schließen, daß die DNA-

Bindungsspezifität von mGCNF für das DR0-Element (Chen *et al.*, 1994) in der Evolution von den Amphibien bis zu den Säugern konserviert geblieben ist und auch für die Orthologe gilt. In der Tat konnte dies für hGCNF (Schmitz *et al.*, 1999) und xGCNF (Joos *et al.*, 1996) gezeigt werden. Die LBD ist auf Basis der Aminosäuresequenz zwischen Mensch und Maus 99% identisch und zwischen Mensch und *X.laevis* 81% identisch. Dies läßt, mit Hinblick auf einen möglichen Liganden, ebenfalls eine funktionelle Konservierung der LBD vermuten. Die größten Unterschiede zwischen den Orthologen lassen sich im N-Terminus im Bereich der A/B-Domäne finden. Die Maus-cDNA-Sequenz verfügt in diesem Bereich über eine Insertion von 45 Basenpaaren, was einer Insertion von 15 Aminosäuren in der Proteinsequenz entspricht. Da diese Nukleotide bei den cDNA-Sequenzen der Klone #1, #5, #7 und #12 ebenfalls fehlen, ist dieser Unterschied vermutlich nicht auf *Splice*-Varianten zurückzuführen, sondern auf den Verlust eines Exons im Laufe der Evolution. Bei dem kürzeren xGCNF fehlt dieser Bereich völlig. Die funktionellen Konsequenzen daraus sind bisher unbekannt, es ist allerdings fraglich, ob diese Domäne für die Funktion von GCNF überhaupt notwendig ist (Joos *et al.*, 1996).

Die sehr hohe Konservierung von GCNF auch zwischen evolutiv entfernten Spezies, die bisher einzigartige Bindungsspezifität an DR0-Elemente und das Bilden einer eigenen Untergruppe (Laudet, 1997) innerhalb des phylogenetischen Stammbaums der Superfamilie der Kernrezeptoren (die höchste Identität auf Basis der DBD von hGCNF zeigt RXR mit 61% Sequenzidentität), läßt auf eine wichtige, nichtredundante Funktion von GCNF schließen. Die Tatsache, daß nur ein einziges *hGCNF*-Gen auf Chromosom 9 lokalisiert wurde (Agoulnik *et al.*, 1998), spricht allerdings dafür, daß GCNF evolutiv noch nicht sehr alt ist, da es noch nicht zu einer Gen-Duplizierung gekommen ist (Laudet *et al.*, 1992).

Die Sequenzgegenüberstellung der hGCNF-Proteinsequenz mit mGCNF und den Retinoid-Rezeptoren (RAR und RXR) zeigte, daß innerhalb der LBD die Helices H1-H10 der 12 α -Helices der Retinoid-Rezeptoren sich auch bei hGCNF anhand von invarianten oder hochkonservierten Aminosäuren zuordnen lassen (siehe 4.1.4). Der C-Terminus ist allerdings im Vergleich zu anderen Kernrezeptoren um ca. 10 Aminosäuren kürzer und wenig konserviert, so daß sich Helix 11 bzw. Helix 12 nicht eindeutig zuordnen lassen. In diesem Bereich befindet sich bei den Kernrezeptoren die AF-2 Domäne ($\phi\phi XE/D\phi\phi$, wobei ϕ für eine hydrophobe und X für eine nichtkonservierte Aminosäure steht) (Danielian *et al.*, 1992), die bei der Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle spielt. Die hGCNF-Sequenz trägt in diesem Bereich anstelle der hochkonservierten Glutaminsäure ein Lysin (siehe Abb. 9). Dies läßt darauf schließen, daß sich hGCNF in funktioneller Hinsicht von den klassischen Kernrezeptoren unterscheidet. Das Fehlen des AF-2-Kernmotifs muß nicht

zwangsläufig heißen, daß hGCNF nicht in der Lage ist, die Transkription zu aktivieren. Es ist auch möglich, daß sich in den verschiedenen Kernrezeptoren auch verschiedene Aktivierungsmotive und Mechanismen entwickelt haben. Zur Zeit läßt sich noch nicht beurteilen, ob hGCNF in der Lage ist, als transkriptioneller Aktivator zu funktionieren.

5.3 Das Expressionsmuster von hGCNF

Die Expression von *hGCNF* auf mRNA-Ebene wurde mittels Northern-Blot untersucht (siehe 4.2.1). Die höchste Expression von *hGCNF*-Transkripten konnte im Testis nachgewiesen werden. In allen anderen Geweben konnte nur eine sehr geringe Expression gezeigt werden. Verglichen mit der Testis-Expression lag die Expression in Plazenta, Pankreas und Dickdarm bei maximal 4 %. Im Ovar konnte als einziges Gewebe keine Expression nachgewiesen werden. Damit entspricht das Expressionsmuster von *hGCNF* dem bei der Maus (Chen *et al.*, 1994). Den einzigen Unterschied stellt die Expression im Ovar dar, in dem bei der Maus *GCNF*-Expression gezeigt wurde. Dies kann an der höheren Anzahl an gleichzeitig reifenden Oozyten im Ovar der Maus liegen. Die Oozyten sind die einzigen Zellen im Ovar, die *GCNF* exprimieren (Chen *et al.*, 1994), wie durch *in situ*-Hybridisierung gezeigt werden konnte.

Die prädominante Expression von *hGCNF* im Testis läßt auch beim Menschen eine Funktion bei der Keimzellreifung möglich erscheinen.

Im Testis konnten zwei Transkripte gleicher Intensität von 8 kb und 2,2 kb-Länge nachgewiesen werden. In den übrigen Geweben wurde nur das 8 kb-Transkript gefunden. Das Vorhandensein von zwei Transkripten im Testis kann evt. an der gewebespezifischen Verwendung unterschiedlicher Polyadenylierungsstellen im langen, 3'-untranslatiertem Bereich liegen. Die isolierten cDNA-Klone hatten bereits erste Hinweise darauf gegeben. Die Diskrepanz zwischen der Länge des nachgewiesenen 8 kb-Transkripts und der Länge der beiden isolierten vollständigen cDNA-Klonen Klon#1 und Klon#5 mit ca. 1,9 kb Länge, läßt sich möglicherweise ebenfalls auf die Existenz unterschiedlicher Polyadenylierungsstellen zurückführen. Bei der Konstruktion der oligodT-initiierten Testis cDNA-Bank kann es, bedingt durch die begrenzte Syntheseleistung der Reversen Transkriptase, zur Unterrepräsentation von langen mRNAs gekommen sein, so daß cDNAs von 8 kb Länge nicht isoliert werden konnten.

Zur genauen Lokalisation von hGCNF im Testis wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Bei der Maus war durch *in situ*-Hybridisierung die Expression von *mGCNF*-mRNA in runden Spermatozyten gezeigt worden (Chen *et al.*, 1994). Da aber im Testis oftmals die Expression von Proteinen durch translationale Kontrolle reguliert wird, (Schäfer *et al.*, 1995; Kleene, 1996), läßt sich aus solchen Daten noch nicht auf das Vorhandensein des GCNF-Proteins schließen. Die exakte Zuordnung des Expressionszeitpunkts zu den entsprechenden Zellstadien während der Spermatogenese ist aber wichtig, um Hinweise für die Funktion von GCNF zu erhalten.

Als Antigene für die Immunisierung der Kaninchen wurden zwei unterschiedlich lange C-terminale hGCNF-Fragmente (139 AS und 338 AS) in *E.coli* exprimiert. Der C-Terminus ist zwischen den Mitgliedern der Superfamilie der Kernrezeptoren wenig konserviert und daher für die Gewinnung von GCNF spezifischen Antisera geeignet. Die gewonnenen Antisera enthielten zunächst nur einen geringen Antikörper-Titer, so daß die Immunisierung insgesamt sieben mal aufgefrischt werden mußte. Dieses geringe antigene Potential der hGCNF-Fragmente ist evtl. auf die hohe Konservierung von GCNF zwischen den Spezies zurückzuführen. Es ist denkbar, daß auch ein Kaninchen-GCNF mit hoher Ähnlichkeit zum hGCNF existiert, so daß im Verlauf der Prägung des Immunsystems des Kaninchens, GCNF-spezifische B-Zellen klonal eliminiert wurden. Die Immunisierung mit einem kaninchenähnlichen Protein ist daher schwierig, da es bei Ausbildung eines hohen Titers zu einer Autoimmun-Reaktion kommen würde.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen zeigten bei den untersuchten Spezies Mensch und Affe eine Färbung der postmeiotischen runden und elongierten Spermatozyten in nahezu allen Tubuli (siehe 4.2.2.3). Wenige reife Spermatozyten konnten ebenfalls angefärbt werden. Beim Hund ließen sich ebenfalls runde Spermatozyten in ca. jedem fünften Tubulus, bei der Maus zusätzlich auch einige Restkörperchen anfärben. Die Ergebnisse zeigen, daß das GCNF-Protein im adulten Testis nur in den Keimzellen exprimiert wird, wobei die Expression erst mit der Bildung der runden Spermatozyten einsetzt. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den bei der Maus und der Ratte durch *in situ*-Hybridisierung gewonnenen Daten, die die Expression von *GCNF*-mRNA erst in runden Spermatozyten belegen. (Chen *et al.*, 1994; Hirose *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Die runden Spermatozyten und die sich daraus differenzierenden elongierten und reifen Spermatozyten sind haploide Zellen und haben bereits die Meiose durchlaufen. GCNF könnte daher möglicherweise eine Funktion bei der Differenzierung der Spermatozyten im Laufe der Spermiogenese zukommen. Die Arbeitsgruppe von Cooney konnte zeigen, daß die Protamin-Gene Protamin 1 und 2, die beide ein DR0-

Element enthalten (Johnson *et al.*, 1988), als GCNF-Zielgene in Frage kommen (Hummelke *et al.*, 1997). Protamine sind kleine basische Proteine, die während der Spermiogenese die Histone ersetzen und zu einer hochkondensierten Packung der DNA in den Spermienköpfen führen (Meistrich, 1988). Sie werden exklusiv in runden Spermatisden in den gleichen Stadien wie GCNF exprimiert (Heidaran und Kistler, 1987; Kleene *et al.*, 1984). Möglicherweise ist die Regulation der Protamingene die biologische Funktion von GCNF.

Bauer *et al.* berichten, im Widerspruch zu bisher publizierten Daten, von einer GCNF-Expression im Testis der adulten Maus bereits in den pachytänen Spermatozyten (Bauer *et al.*, 1998). Darüber hinaus berichten sie eine GCNF-Expression in neuronalen Zellen in allen Regionen des Gehirns (Bauer *et al.*, 1997). Auch diese Daten stehen in direktem Widerspruch zu den Expressionsdaten aus Maus und Mensch (Süsens *et al.*, 1996; Lei *et al.*, 1997). Worauf diese Diskrepanzen zurückzuführen sind, kann nicht beurteilt werden und bedarf weiterer Klärung.

Die weitergehende Analyse der GCNF-Expression im Testis zeigte, daß die runden Spermatisden in allen Spezies ein charakteristisches Färbungsmuster aufwiesen. Eine besonders intensive Färbung zeigte die Umrandung einer dem Nukleus anliegenden Struktur, die sehr wahrscheinlich dem proakrosomalen Bläschen entspricht. Testis-Schnitte, die nicht mit Hämatoxylin gegengefärbt wurden, zeigten auch vereinzelt eine schwache Färbung des gesamten Nukleus. Das proakrosomale Bläschen ist eine lysosomale Struktur, die sich im Laufe der Spermiogenese abflacht und dem Nukleus auflegt. Sie enthält Enzyme, die für die Penetration der Eizelle bei der Befruchtung wichtig sind. Möglicherweise sind die GCNF-Epitope, die die Antikörper erkennen, im Kern nicht zugänglich, da sie dort durch die Komplexierung mit anderen Kernproteinen wie z.B. „heat shock Proteinen“ oder Kofaktoren verdeckt werden. Die Färbung der proakrosomalen Bläschen ist möglicherweise auf die Erkennung von Epitopen von GCNF-Fragmenten zurückzuführen, die aus dem Kern transloziert und abgebaut wurden und an die Bläschen adherieren. Diese These wird durch mehrere Arbeiten unterstützt. Neuere Daten deuten darauf hin, daß der Degradation von Kernproteinen ein genereller Mechanismus zugrunde liegt (Diehl *et al.*, 1998; Freedman *et al.*, 1998; Tomada *et al.*, 1999). Sie werden zunächst phosphoryliert und durch Bindung an Transportproteine aus dem Kern exportiert und dann vom Ubiquitin/Proteasom-System erkannt und abgebaut. Da das Akrosom eine proteasomale Struktur ist, könnten auf diese Weise Kernproteine von Spermatisden mit dem akrosomalen Bläschen in Kontakt kommen. Diese Beobachtung ist bereits in früheren Arbeiten beschrieben worden (Braun *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1996). Lee *et al.* konnten die Expression des Maus-Waisen-Rezeptors Tr2-11 durch

immunhistochemische Färbung in runden Spermatischen nachweisen. Dabei zeigten die Testis-Schnitte ebenfalls eine Färbung einer Struktur, die, wie das akrosomale Bläschen, dem Nukleus direkt anliegt.

Möglicherweise sind aber nicht nur abgebaute GCNF-Fragmente für die Färbung des akrosomalen Bläschens verantwortlich, sondern auch fehlerhaft lokalisiertes GCNF. Braun *et al.* konnten zeigen, daß die 3'-nichttranslatierte Region der mRNA von Kernproteinen nicht nur einen Einfluß auf die translationale Kontrolle, sondern auch auf die subzelluläre Lokalisation hat. Experimente mit transgenen Mäusen hatten gezeigt, daß die Fusion der 5'-nicht translatierten und 3'-nicht translatierten Bereiche des Maus-Protamingens P1 an das 5'- bzw. 3'-Ende des humanem *Growth Hormone*-Gens dazu führten, daß das *Growth Hormone* (hGH) wie Protamin 1 in den späten, elongierten Spermatischen exprimiert wird. Der Austausch des Protamin 3'-nicht-translatierten-Bereichs gegen den *Growth Hormone* 3'-nicht-translatierten-Bereich führte zur Detektion des Proteins bereits in den runden Spermatischen des Testis. Darüber hinaus führte die zeitlich frühere Expression in den Stadien der frühen runden Spermatischen zur Lokalisation von hGH im Akrosom, während die Expression in den elongierten Spermatischen zur intrazellulären Lokalisation exklusive des Akrosoms führte. Der zugrundeliegende Mechanismus der translationalen Kontrolle beruht wahrscheinlich auf der Bindung von regulierenden Proteinen an den 3'-nicht translatierten Bereich der mRNA, die vom Phosphorylierungsgrad der bindenden Proteine abhängig ist. Der Mechanismus der translationszeitpunktabhängigen Lokalisation wurde allerdings in dieser Arbeit (Braun *et al.*, 1989) nicht weiter untersucht. Die Detektion von GCNF in den akrosomalen Bläschen kann vor dem Hintergrund dieser Daten möglicherweise auch auf die verfrühte Translation einiger GCNF-mRNAs zurückzuführen sein, mit dem von Braun *et al.* beschriebenen Effekt, daß die im Vergleich zum „normalen“ Translationszeitpunkt bereits in den früheren Stadien der Spermato-genese translatierten GCNF-Proteine nicht in den Kern, sondern in das akrosomale Bläschen geleitet werden. Wahrscheinlich kommt dem im Akrosom lokalisierten GCNF keine biologische Funktion zu.

Aufgrund der unerwartet prädominanten, extranukleären Signale bei der immunhistochemischen Lokalisation von GCNF im Testis und zur Bestätigung der Funktionalität der Antikörper wurde die intrazelluläre Lokalisation von hGCNF im Zellkultursystem untersucht. Dazu wurde sowohl hGCNF als auch hGCNF-EGFP-Fusionsprotein in HeLa-Zellen exprimiert. Das vollständige hGCNF ließ sich immunhistochemisch eindeutig im Zellkern lokalisieren (siehe 4.2.3.2). Diese Daten wurden unterstützt von den Ergebnissen der hGCNF-EGFP Lokalisation. Die Expression des

Fusionsproteins führte zu einer deutlichen Fluoreszenz des Zellkerns und einer sehr schwachen Fluoreszenz des Zytoplasmas, wohingegen EGFP alleine zur Fluoreszenz des Kerns und des Zytoplasmas führte (siehe 4.2.3.1). Daraus läßt sich schließen, daß natives hGCNF im Zellkern lokalisiert ist. Dies stimmt auch mit den beschriebenen Nicht-Steroidrezeptoren überein, die bereits ohne Bindung des Liganden im Kern lokalisiert sind. Diese Rezeptoren liegen meist assoziiert mit Hitze-Schock-Proteinen oder anderen Kernfaktoren vor. Insofern unterstützen diese Ergebnisse auch die Hypothese, daß die extranukleäre Färbung der Testis-Schnitte auf eine Verdeckung der GCNF-Epitope im Kern durch Kofaktoren bewirkt wird.

Darüber hinaus wurde die Verwendbarkeit der anti-hGCNF-Antikörper unterstrichen, die das vollständige hGCNF in den fixierten Zellen erkannt haben.

5.4 Einfluß von hGCNF auf die Lebensfähigkeit von Zellen

Die Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von hGCNF-EGFP hatten aufgrund der zufälligen Beobachtung, daß die besonders stark fluoreszierenden transfizierten Zellen zuerst abstarben, zu der Vermutung geführt, daß hGCNF einen Einfluß auf die Lebensfähigkeit der Zellen haben kann. Ähnliche Beobachtungen hat auch die Arbeitsgruppe von Borgmeyer gemacht (persönliche Mitteilung). Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden in einem Transaktivierungsassay BHK-Zellen mit *hGCNF_{FL}*-cDNA und als Reporter pEGFP-C1 kotransfiziert. Das Fusionsprotein hGCNF-EGFP wurde nicht verwendet, um Artefakte auszuschließen, die evt. durch die Fusion mit EGFP entstanden sind. Die Ergebnisse zeigten, daß hGCNF keinen signifikanten Einfluß auf die Lebensfähigkeit der BHK-Zellen hat (siehe 4.3.1). Die zuvor mit hGCNF-EGFP gemachte Beobachtung des schlechteren Überlebens der transfizierten Zellen, ist möglicherweise auf einen artifiziellen Effekt durch die Fusion der beiden Proteine entstanden. Eine ähnliche Beobachtung wurde von der Arbeitsgruppe von Dr.Zopf (Schering AG) mit einem anderen EGFP-Fusionsprotein gemacht. Der hGCNF-Teil der Fusion führt zur starken Anreicherung von EGFP im Zellkern, welches bei alleiniger Expression im Kern und Zytoplasma lokalisiert ist. Möglicherweise führt diese Anreicherung im Zellkern zu verstärkten Interaktionen mit anderen Proteinen und damit zu toxischen Effekten.

5.5 hGCNF ist ein transkriptioneller Repressor

Die meisten beschriebenen Kernrezeptoren liegen im nicht-ligandengebundenen Zustand als neutrale oder repressive Transkriptionsfaktoren vor.

Im Transaktivierungstest wurde der Einfluß von nicht ligandengebundenem hGCNF auf die Transkription eines Reportergens untersucht. In der Arbeitsgruppe von Borgmeyer konnte gezeigt werden, daß hGCNF, wie auch mGCNF, an DR0-Elemente und in schwächerem Ausmaß an SF-1 „extended halvesites“ bindet (Borgmeyer *et al.*, 1997). Daher wurde der Einfluß von vollständigem hGCNF auf die Transkription eines DR0-Element tragenden Reportergens untersucht (siehe 4.3.2.2). Um mögliche unspezifische Einflüsse von hGCNF durch Bindung an DR0-Elemente im Genom der Wirtszelle auszuschließen, wurde zusätzlich der Einfluß des Fusionsproteins Gal_{DBD}-hGCNF_{LBD} auf ein Gal_{RE}-Element tragendes Reportergen untersucht (siehe 4.3.2.1). Es zeigte sich sowohl für das vollständige hGCNF als auch für das Fusionsprotein Gal_{DBD}-hGCNF_{LBD}, daß beide Proteine ohne Liganden die basale Transkription des Reportergens reprimieren. Diese Daten wurden nachfolgend auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Bauer *et al.*, 1997; Cooney *et al.*, 1998). Damit verhält sich hGCNF wie TR oder COUP-TF, die beide ebenfalls im nicht ligandengebundenem Zustand ihre Zielgene reprimieren. Ob hGCNF allerdings durch Bindung eines bisher nicht identifizierten Liganden zum Transaktivator werden kann, ist unklar. Möglicherweise beschränkt sich die Funktion eines hypothetischen Ligandens nur darauf, die Repression aufzuheben, da hGCNF keine Konsensus-Transaktivierungsdomäne in der LBD trägt. Die Identifizierung eines Liganden für hGCNF bleibt ein wichtiger Schritt zur Klärung der biologischen Funktion von hGCNF.

Die Tatsache, daß auch das Fusionsprotein Gal_{DBD}-hGCNF_{LBD} als Repressor wirkt, zeigt, daß der für die Repression verantwortliche Bereich von hGCNF nicht in der A/B-Domäne oder der DNA-Bindungsdomäne lokalisiert ist, sondern im Bereich der LBD liegt. Um diesen Bereich weiter einzugrenzen, wurde anhand von Gal-VP16-hGCNF-Fusionsproteinen der Einfluß verschiedener hGCNF-Deletionsmutanten auf die transaktivierende Wirkung von Gal-VP16 im Transaktivierungstest untersucht (siehe 4.3.3). Die Ergebnisse bestätigten die Daten, daß für die Repression bereits die LBD ausreicht. Interessanterweise war der repressorische Einfluß des vollständigen hGCNF geringer als der der hGCNF_{LBD}. Dies kann daran liegen, daß bei hGCNF_{LBD} die Repressordomäne besser zugänglich ist als bei dem vollständigen Protein und daher die Bindung von Korepressoren leichter erfolgen kann. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß im N-Terminus ein transaktivierender Bereich lokalisiert ist, der der

repressorischen Wirkung der LBD entgegenwirkt. Die weitere Eingrenzung der Repressordomäne zeigte, daß sowohl der Bereich von Helix1-6 als auch Helix7-12 in der Lage sind, die Repression zu vermitteln. Daraus läßt sich ableiten, daß innerhalb der LBD mindestens zwei repressorische Domänen vorliegen: eine im Bereich Helix1-6 und eine im Bereich Helix7-12.

5.6 GCNF kann mit NCoR interagieren

Transkriptionelle Repression wird von Kofaktoren, sogenannten Korepressoren, vermittelt (McKenna *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999). Die beiden wichtigsten Korepressoren sind NCoR (Hörlein *et al.*, 1995) und SMRT (Chen *et al.*, 1995). Für NCoR existierten erste Hinweise, daß er mit GCNF interagieren kann (Cooney, persönliche Mitteilung). Ob NCoR an der Vermittlung der Repression beteiligt ist, wurde im Transaktivierungstest untersucht (siehe 4.3.4). Durch steigende Mengen an kotransfiziertem NCoR-Expressionsplasmid ließ sich die Repression von hGCNF von 68% der basalen Reporterogenaktivität auf 38% verstärken. Dies deutet darauf hin, daß NCoR an der Vermittlung der Repression von hGCNF beteiligt ist. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß auch noch andere Korepressoren die repressorischen Eigenschaften von GCNF vermitteln können. Um einer möglichen Beteiligung von NCoR an der Repression weiter nachzugehen, wurde die Fähigkeit von GCNF und NCoR, miteinander zu interagieren, untersucht. Zunächst wurde die Interaktion im Hefe-Zwei-Hybrid System nachgewiesen (siehe 4.4.1). Die Daten zeigen, daß hGCNF und hNCoR im Hefesystem in der Lage sind, miteinander zu interagieren. Für die Interaktion ist die Ligandenbindungsdomäne von hGCNF ausreichend. Ob hGCNF_{fl} noch besser in der Lage ist an NCoR zu binden, kann nur vermutet werden. Im Hefe-System stellte sich die Expression von Gal4_{DBD}-hGCNF_{fl} als toxisch für die Hefe-Zellen heraus (Dr. M. Husemann, Schering AG, persönliche Mitteilung). Um die Interaktion zu verifizieren und unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde das Säugetier-Zwei-Hybrid-System angewendet. Es zeigte sich, daß in eukaryontischen Säugetierzellen mGCNF und mNCoR interagieren können (siehe 4.4.2.2). Die Interaktion von hGCNF und hNCoR hingegen war schwächer als zwischen mGCNF und mNCoR (siehe 4.4.2.3). Allerdings sind die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar, da nur die LBD von hGCNF untersucht wurde. Möglicherweise trägt der N-Terminus von GCNF zu einer besseren Faltung und Stabilisierung des Proteins und somit zu einer besseren Interaktion mit NCoR bei.

Zusätzlich wurde die Interaktion von GCNF und NCoR im dritten, unabhängigen System, dem „pull down“-Test, untersucht (siehe 4.4.3). Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl das vollständige hGCNF als auch die Scharnier- und Ligandenbindungsdomäne von hGCNF mit NCoR interagieren können und bestätigten damit die Ergebnisse des Hefe- und Säugetier-Zwei-Hybrid-Systems. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß GCNF und NCoR miteinander interagieren können und NCoR aufgrund der vorliegenden Daten wahrscheinlich eine Rolle bei der Vermittlung der transkriptionellen Repression durch GCNF spielt.

5.7 Eingrenzung der Interaktionsregion von hGCNF an NCoR

Frühere Studien haben verschiedene Regionen beschrieben, die für die Interaktion von Kernrezeptoren mit NCoR von Bedeutung sind. Um die Region von hGCNF einzugrenzen, die für die Interaktion mit NCoR kritisch ist, wurde die Fähigkeit von verschiedenen hGCNF-Deletionsmutanten zur Interaktion mit NCoR im „pull down“-Test untersucht (siehe 4.5). Es zeigte sich, daß nach Deletion des N-Terminus die LBD von hGCNF für die Bindung an NCoR ausreicht. Die Scharnier-Region ist nicht für die Interaktion notwendig. Dies steht im Gegensatz zu TR und RAR, für die eine sogenannte CoR-Box beschrieben wurde, eine Sequenz innerhalb der Scharnierregion, die für die Bindung an NCoR wichtig ist (Hörlein *et al.*, 1995). Zu der CoR-Box findet sich in hGCNF kein homologer Bereich. Die Zerlegung der LBD in die Bereiche Helix 1-6 und Helix 7-12 zeigte, daß beide Bereiche mit NCoR interagieren können. Dieses Ergebnis ließ bereits auf das Vorhandensein von mehreren Interaktionsbereichen in hGCNF schließen. Die C-terminale Deletion von Helix 12 hatte keinen Einfluß auf die Bindung, das hGCNF-Fragment von Helix 7-10 konnte wie das Fragment Helix 7-12 mit NCoR interagieren. Obwohl verschiedene Studien gezeigt haben, daß die Konformation von Helix 12 eine entscheidende Kontrolle bei der Rekrutierung von Koaktivatoren und Korepressoren ausübt, ist ihr Einfluß je nach Rezeptor verschieden (Glass und Rosenfeld, 2000; Nagy *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2000). Für RXR konnte gezeigt werden, daß Helix 12 die Bindung von Korepressoren sterisch behindert (Zhang *et al.*, 1999), so daß die Deletion von Helix 12 aus dem schwachen Repressor apo-RXR einen starken Repressor macht. Bei TR und RAR führte die Deletion von Helix 12 zur Bindung von NCoR sogar in der Anwesenheit von Ligand (Hörlein *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu war Helix 12 bei der Interaktion von COUP-TF mit NCoR essentiell (Shibata *et al.*, 1997; Bailey *et al.*, 1997). Die

Sequenz von Helix 12 von hGCNF ist ungewöhnlich in Hinblick auf die Tatsache, daß sie nicht die AF-2-Konsensus-Sequenz (Danielian *et al.*, 1992) enthält. Daher wurde für GCNF bereits über einen besonderen Reaktionsmechanismus spekuliert (Greschik und Schüle, 1998; Cooney *et al.*, 1999).

Die weitere Eingrenzung der Interaktionsregion ergab, daß sowohl Helix 7-8 als auch Helix 9-10 mit NCoR interagieren können. In diesem Bereich liegen mindestens zwei Interaktionsstellen mit NCoR. Möglicherweise tragen beide Bereiche in der tertiären Struktur von hGCNF zur Bindung mit NCoR bei. Die weitere Deletion von Helix 1-6 in die Bereiche Helix 1-3, Helix 4-6 und Helix 5-6 ergab, daß Helix 4-6 nur sehr schwach und Helix 5-6 nicht mit NCoR interagieren können. Dagegen zeigte sich für Helix 1-3, daß dieser Bereich an NCoR binden kann. Neue Studien konnten die Funktion von Helix 3-5 als Interaktionsoberfläche von Kernrezeptoren mit Koaktivatoren zeigen (Glass und Rosenfeld, 2000; Feng *et al.*, 1998). Mutationsanalysen bei TR und RXR haben die Bedeutung dieser Region auch für die Bindung von Korepressoren gezeigt (Nagy *et al.*, 1998; Hu und Lazar, 1999). Mutationsanalysen deuten dabei auf eine wichtige Rolle von Helix 3 hin. Möglicherweise ist Helix 3 auch bei hGCNF wesentlich an der Interaktion mit NCoR beteiligt. Um dies zu untersuchen, sind weiterführende Mutationsanalysen bei hGCNF notwendig.

Die Ergebnisse der Eingrenzung des Bindungsbereichs von hGCNF an NCoR decken sich damit auch mit den Ergebnissen aus der Eingrenzung der Repressordomäne von hGCNF (siehe 4.3.3), bei der auch mindestens zwei Repressordomänen im Bereich von Helix 1-6 und Helix 7-12 gefunden wurden. Dies deutet zusätzlich darauf hin, daß die Repression von hGCNF von NCoR vermittelt wird.

5.8 NCoR wird in Keimzellen während der Spermatogenese exprimiert

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß hGCNF und NCoR miteinander interagieren können und NCoR wahrscheinlich die repressorischen Eigenschaften von hGCNF vermitteln kann. Um zu untersuchen, ob das während der Spermatogenese exprimierte GCNF auch zur gleichen Zeit mit NCoR exprimiert wird und somit eine Interaktion *in vivo* überhaupt stattfinden kann, wurde die Expression von NCoR während der Spermatogenese untersucht. Es zeigte sich, daß NCoR in aufgereinigten Rattenkeimzellen in den Zellstadien von den primären Spermatozyten bis zu den elongierten Spermatischen exprimiert wird. Aus Mangel an humanen

Keimzellen konnte nur für den gesamten humanen Testis die Expression von NCoR nachgewiesen werden. Es ist allerdings anzunehmen, daß humanes NCoR wie das Ratten-NCoR in den gleichen Zellstadien exprimiert wird wie GCNF und somit auch *in vivo* eine Interaktion von hGCNF und hNCoR während der Spermatogenese stattfinden kann.

5.9 Funktion von GCNF

Die biologische Funktion von GCNF konnte bisher nicht geklärt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß GCNF in Abwesenheit eines Liganden als Repressor der Transkription wirkt (siehe 4.3.2). Da bisher kein Ligand für GCNF identifiziert werden konnte, kann über den Wirkmechanismus nur spekuliert werden. Zum einen kann die Funktion von GCNF möglicherweise darin liegen, Zielgene zu reprimieren. Eine Regulation dieser Repression wäre zum Beispiel über eine gesteuerte Expression von GCNF möglich. Zum anderen könnte ein noch zu identifizierender Ligand zur Aktivierung von GCNF führen, die dann zur Rekrutierung von Koaktivatoren und Histonacetyltransferasen führt und eine verstärkte Expression von Zielgenen zur Folge haben würde.

Die Ergebnisse zur Lokalisation von GCNF sprechen dafür, daß GCNF seine Funktion im adulten Organismus im Testis und dort in den postmeiotischen runden Spermatischen ausübt (siehe 4.2.2). Möglicherweise kommt GCNF in diesen Zellstadien eine Funktion bei der Regulation der Spermatogenese zu (Chen *et al.*, 1994, Katz *et al.*, 1997). Aufgrund der Entdeckung, daß GCNF an das innerhalb der Superfamilie der Kernrezeptoren einmalige DR0-Response Element (Chen *et al.*, 1994, Yan *et al.*, 1997) binden kann, wurden die Protamingene als Kandidatenzielgene ermittelt, da sie DR0-Elemente im Promotorbereich enthalten. (Hummelke *et al.*, 1998). Protamine werden wie GCNF postmeiotisch während der Spermio-genese exprimiert. Der Austausch der Histone durch Protamine führt zu einer hochkondensierten Packung der DNA in den Spermienköpfen. Das zeitliche und räumliche Expressionsmuster von GCNF und der Protamingene und die Identifikation von DR0-Elementen im Promotorbereich der Protamingene unterstützen die Hypothese, daß GCNF seine biologische Funktion im adulten Organismus durch die Regulation der Expression der Protamingene ausübt.

Darüberhinaus konnte die Expression von GCNF in einem engen räumlichen und zeitlichen Fenster während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden. Beginnend am Tag E6,5

nimmt die Expression von GCNF zunächst im posterioren Teil des Embryos zu bis zum Tag E8,5, an dem die stärkste Expression von GCNF im Neuroektoderm des sich entwickelnden Nervensystems nachzuweisen ist und nimmt dann bis zum Tag E10,5 wieder ab (Süsens *et al.*, 1997). Ab dem Tag E10,5 ist keine Expression von GCNF bis zu ihrem erneuten Auftreten im Testis der adulten Tiere nachzuweisen. Dies deutet auf eine Funktion von GCNF bei Entwicklungsprozessen (Neurogenese) zusätzlich zur Gametogenese hin. In der Arbeitsgruppe von A. Cooney wurden zur Aufklärung der physiologischen Funktion von GCNF *Knock out*-Mutanten erstellt. Die GCNF *Knock out*-Mäuse zeigten einen embryonal lethalen Phänotyp, was ebenfalls für eine nichtredundante, essentielle Rolle von GCNF während der Embryogenese spricht.

Da die GCNF *Knock out*-Mäuse nicht die Pubertät erreichten, konnte in diesem Modell die Funktion von GCNF während der Spermatogenese nicht geklärt werden. Dieses Problem könnte umgangen werden, indem induzierbare *Knock out*-Mäuse erstellt werden. In einem solchen Modell könnte der gezielte *Knock out* von GCNF im adulten Tier zur Klärung der Frage führen, ob GCNF eine essentielle Funktion bei der Regulation der Spermatogenese zukommt und als Ansatzpunkt für die Entwicklung eines Kontrazeptivums dienen könnte.