

**Isolierung und Charakterisierung des humanen
Waisen-Kernrezeptors *Germ Cell Nuclear Factor*
(hGCNF)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker
Marcus Kapelle
aus Berlin

eingereicht im August 2001

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zell- und Molekularbiologie der Schering AG in Berlin angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Kapelle, M., Krätzschar, J., Husemann, M. und Schleuning, W.-D.

cDNA cloning of two closely related forms of human germ cell nuclear factor (GCNF)

Biochim. Biophys. Acta **1352**, 13-17 (1997)

1.Gutachter: Prof. Dr. Peter Donner

2.Gutachter: Prof. Dr. Volker Erdmann

Tag der Disputation: 12. April 2002

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	8
1.1	Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren	9
1.1.1	Struktur und Funktion der nukleären Rezeptoren	9
1.1.2	Steroidrezeptoren	12
1.1.3	Nicht-Steroidrezeptoren	13
1.1.4	Waisen-(<i>Orphan</i>)-Rezeptoren	14
1.1.5	<i>Germ Cell Nuclear Factor</i> (GCNF)	16
1.2	Koaktivatoren und Korepressoren	18
1.3	Die Spermatogenese	20
2	ZIELSETZUNG	22
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Material	23
3.1.1	Geräte	23
3.1.2	Laborchemikalien	24
3.1.3	Chemikalien in der Zellkultur	25
3.1.4	Verbrauchsmaterialien	25
3.1.5	Enzyme	26
3.1.6	Zellen	27
2.1.7	Oligonukleotide	28
3.1.7	Plasmide und Vektoren	31
3.2	Methoden	34
3.2.1	Molekular- und mikrobiologische Methoden	34
3.2.1.1	Präparation von Plasmid DNA aus Bakterienzellen mittels alkalischer Lyse	34
3.2.1.2	Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen	36
3.2.1.3	Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase	36
3.2.1.4	Reinigung von Oligonukleotiden	37
3.2.1.5	DNA-Amplifikation durch PCR	38
3.2.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.2.1.7	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.2.1.8	Fragmentisolierung aus dem Agarose-Gel mit dem Qiagen QIAquick-Gel-Extraction Kit®	40
3.2.1.9	Ligation isolierter DNA-Fragmente	41
3.2.1.10	Transformation von E.coli-Zellen	42
3.2.1.11	Automatische DNA-Sequenzierung mit dem ABI 373 A	43
3.2.1.12	Northern Blot	45
3.2.1.13	Durchmusterung einer humanen Testis cDNA-Bank	46
3.2.1.14	Kultivierung von Hefe-Zellen	49

3.2.1.15	Transformation von Hefe-Zellen	51
3.2.1.16	Kultivierung eukaryontischer Zellen	52
3.2.1.17	Transfektion eukaryontischer Zellen	52
3.2.2	Biochemische und immunologische Methoden	53
3.2.2.1	β-Galaktosidase-Flüssigassay	53
3.2.2.2	Aufschluß von Bakterien-Zellen	54
3.2.2.3	Proteinbestimmung nach Bradford	54
3.2.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
3.2.2.5	Western Blot	56
3.2.2.6	Herstellung und Reinigung von polyklonalen Antikörperseren	57
3.2.2.7	„GST-pull down“	59
3.2.2.8	Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	60
3.2.2.9	Immunhistochemie	61
3.2.2.10	Fluoreszenzmikroskopie	62
4	ERGEBNISSE	63
4.1	Isolierung humaner <i>GCNF</i>-cDNAs	63
4.1.1	Herstellung der Sonde	63
4.1.2	Durchmusterung einer humanen Testis cDNA-Bank	64
4.1.3	Restriktionsanalyse und Sequenzierung	64
4.1.4	Sequenzvergleich mit Sequenzen in öffentlichen Datenbanken	68
4.2	Untersuchung der Genexpression von hGCNF	72
4.2.1	Genexpression von hGCNF in verschiedenen humanen Geweben	73
4.2.2	Lokalisierung von GCNF im Testis verschiedener Spezies	75
4.2.2.1	Expression und Reinigung von hGCNF-His ₆ Fragmenten	75
4.2.2.2	Herstellung und Reinigung der hGCNF-spezifischen-Antiseren	77
4.2.2.3	Immunhistochemische Lokalisation von GCNF	79
4.2.3	Intrazelluläre Lokalisation von hGCNF	82
4.2.3.1	Lokalisation von hGCNF-EGFP	82
4.2.3.2	Lokalisation von hGCNF durch Immunhistochemie	85
4.3	Untersuchungen zur Funktion von hGCNF	86
4.3.1	Einfluß von hGCNF auf die Lebensfähigkeit von Zellen	86
4.3.2	Einfluß von hGCNF auf Reportergenaktivität	87
4.3.2.1	Kotransfektion von Gal _{DBD} -hGCNF _{DE} und Gal _{RE} -TK-Luc	88
4.3.2.2	Kotransfektion von hGCNF _{fl} und DRO-TK-Luc	89
4.3.3	Eingrenzung der Repressordomäne im Transaktivierungsassay	90
4.3.4	Einfluß von NCoR auf die Repression von hGCNF	93
4.4	Nachweis der Interaktion von GCNF und NCoR	94
4.4.1	Nachweis der Interaktion im Hefe-Zwei-Hybridssystem	95
4.4.1.1	Das Prinzip des Hefe Zwei-Hybrid Systems	95

4.4.1.2	Klonierung von hNCoR _{ID-I-II}	96
4.4.1.3	Interaktion zwischen hGCNF und hNCoR	98
4.4.2	Nachweis der Interaktion von GCNF und NCoR im Säugetier-Zwei-Hybrid-System	100
4.4.2.1	Das Prinzip des Säugetier-Zwei-Hybrid-Systems	100
4.4.2.2	Interaktion zwischen mGCNF und mNCoR	100
4.4.2.3	Interaktion von hGCNF mit hNCoR	102
4.4.3	Nachweis der Interaktion <i>in vitro</i>	103
4.4.3.1	„GST-pull-down-Test“	104
4.5	Eingrenzung der Bindungsregion von GCNF an NCoR <i>in vitro</i>	105
4.6	Nachweis der Genexpression von NCoR in verschiedenen Zellstadien der Spermatogenese	109
5	DISKUSSION	112
5.1	Isolierung humaner <i>GCNF</i>-cDNAs	112
5.2	Die <i>hGCNF</i>-cDNA und das hGCNF-Protein	113
5.3	Das Expressionsmuster von hGCNF	115
5.4	Einfluß von hGCNF auf die Lebensfähigkeit von Zellen	119
5.5	hGCNF ist ein transkriptioneller Repressor	120
5.6	GCNF kann mit NCoR interagieren	121
5.7	Eingrenzung der Interaktionsregion von hGCNF an NCoR	122
5.8	NCoR wird in Keimzellen während der Spermatogenese exprimiert	123
5.9	Funktion von GCNF	124
6	ZUSAMMENFASSUNG	126
7	ABSTRACT	127
8	LITERATURVERZEICHNIS	128
9	ANHANG	142
9.1	Abkürzungen	142
9.2	cDNA-Sequenzen	145
	DANKSAGUNG	149
	LEBENS LAUF	150