

## 1 Einleitung

Nahezu alle biologischen Prozesse in einem Organismus wie z.B. Metabolismus, Wachstum und Vermehrung werden von Hormonen gesteuert. Hormone sind chemische Botenstoffe, die Informationen zwischen zwei oder mehr Zellen transportieren. Sie unterscheiden sich stark in ihrer Struktur. Am häufigsten kommen Polypeptid- oder Protein-Hormone vor wie z.B. Insulin oder die meisten Wachstumsfaktoren. Einige Hormone, wie z.B. Thyroxin und Serotonin, sind kleine Moleküle, die aus modifizierten Aminosäuren entstanden sind. Eine dritte Gruppe bilden die Steroid-Hormone (z.B. Testosteron, Östrogen), die vom Cholesterin ausgehend synthetisiert werden. Desweiteren können auch Fettsäure-Derivative, wie z.B. die Prostaglandine, als Hormone wirken. Trotz ihrer strukturellen Vielfalt lassen sich Hormone anhand ihrer Wasserlöslichkeit in zwei Klassen einteilen. Hydrophile Hormone können in Vesikeln gespeichert werden, werden aber meist frei im Serum transportiert. Daher werden sie auch schnell aus dem Serum eliminiert. Da sie die Plasmamembran nicht durchqueren können, müssen sie mit Rezeptoren an der Zelloberfläche interagieren. Dies führt zur Entstehung eines zweiten Signals in der Zelle, das auf die zellulären Prozesse Einfluß nimmt, wodurch ihre Wirkung indirekt ist. Hydrophobe Hormone benötigen für den Transport an den Zielort Serum-Transportproteine, und ihre Halbwertszeit im Organismus ist lang. Aufgrund ihrer Hydrophobizität können sie die Plasmamembran durchqueren und an zytosolische oder nukleäre Rezeptoren binden. Diese können wiederum spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen binden und so differentiell die Expression von Genen regulieren. Hydrophobe Hormone entfalten ihre Wirkung daher auf direktem Wege.

Zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehört der im Mittelpunkt dieser Arbeit stehende Germ Cell Nuklear Factor (GCNF). Basierend auf dem Expressionsmuster ist es nach dem derzeitigen Stand des Wissens möglich, daß GCNF eine Funktion in der embryonalen Neurogenese und der Keimzellreifung zukommt (Heinzer *et al.*, 1998; Joos *et al.*, 1996; Lei *et al.*, 1997; Süsens *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 1998; Braat *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1994; Cooney *et al.*, 1998; Hummelke *et al.*, 1998; Katz *et al.*, 1997; Lei *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Das humane Ortholog des Germ Cell Nuklear Faktors und seine genaue Funktion und Wirkmechanismus waren zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

## 1.1 Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren

Die nukleären Rezeptoren bilden eine Superfamilie von Transkriptionsfaktoren, die bei der Entwicklung, Differenzierung und Homöostase eine wichtige Rolle spielen (Evans, 1988; Gronemeyer und Laudet, 1995; Mangelsdorf *et al.*, 1995). Viele dieser Moleküle sind ligandenaktivierbare Transkriptionsfaktoren, deren Hauptaufgabe es ist, spezifisch die Transkription von Zielgenen zu regulieren, in dem sie in deren Promotorbereich an *cis*-wirkende DNA-Abschnitte, sogenannte *Response Elements*, binden (McEwan *et al.*, 1995). Dies kann als Monomer meist aber als Hetero- oder Homodimer erfolgen. Nukleäre Rezeptoren bilden somit die direkte Verbindung zwischen extrazellulären hormonellen Signalen und transkriptionellen Antworten.

Die nukleären Rezeptoren lassen sich in drei evolutionär und funktionell unterschiedliche Hauptgruppen unterteilen. Die Typ I-Rezeptoren (Steroidrezeptoren) beinhalten die Rezeptoren für die klassischen Steroide wie den Progesteron-, Östrogen-, Androgen-, Glukokortikoid- und Mineralokortikoid-Rezeptor. Zu den Typ II-Rezeptoren (Nicht-Steroidrezeptoren) gehören der Schilddrüsenhormonrezeptor (TR), der *all-trans*-Retinsäure-Rezeptor (RAR), der *9-cis*-Retinsäure-Rezeptor (RXR) und der Vitamin-D<sub>3</sub>-Rezeptor (VDR). Eine dritte Gruppe wird von den sogenannten Waisen-Rezeptoren (*Orphan*-Rezeptoren) gebildet, für die kein Ligand existiert oder noch kein Ligand gefunden wurde (McKenna *et al.*, 1999). Bisher wurden weit über 300 verschiedene nukleäre Rezeptoren identifiziert (Auwerx *et al.*, 1999).

### 1.1.1 Struktur und Funktion der nukleären Rezeptoren

Sequenzanalysen und funktionelle Analysen haben gezeigt, daß allen Mitgliedern der Superfamilie der nukleären Rezeptoren eine modulare Struktur gemeinsam ist (siehe Abb. 1), die sich in vier Domänen unterteilen läßt (Evans, 1988). Eine variable N-terminale A/B-Domäne, eine DNA-Bindungsdomäne (C), eine Scharnierregion (D) und eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne (E). Diesen Domänen lassen sich bestimmte Funktionen der Rezeptoren zuweisen:



Abb. 1: **Schematische Darstellung der Grundstruktur von nukleären Rezeptoren.** Alle Mitglieder der Superfamilie der nukleären Rezeptoren besitzen eine ähnliche Domänen-Struktur, bestehend aus einer Transaktivierungsdomäne (A/B), einer DNA-Bindungsdomäne (C), einer Scharnierdomäne (D) und einer Ligandenbindungsdomäne (E), denen sich verschiedene Funktionen der Rezeptoren zuordnen lassen.

Die N-terminale A/B-Domäne ist der Teil der nukleären Rezeptoren, der die größte Variabilität aufweist. Sie ist in der Regel für Transaktivierung und die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren verantwortlich.

Die DNA-Bindungsdomäne (C-Domäne) bindet spezifisch an das entsprechende *Response Element*. Sie enthält zwei Zinkfinger-Motive (siehe Abb. 2), bei denen jeweils ein Zinkatom von zwei Cystein-Paaren koordiniert ist (Gronemeyer und Moras, 1995). Dadurch entsteht eine Struktur aus zwei  $\alpha$ -Helices. Die N-terminale Helix kann basenspezifisch mit dem Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der großen Furche der DNA in Wechselwirkung treten. Die am C-terminalen Ende der Helix gelegene P-Box ist dabei für die Diskriminierung zwischen verschiedenen *Response Elements* von Bedeutung (Umesono und Evans, 1989). Die C-terminale Helix ist zumindest zum Teil an der Dimerisierung zweier Rezeptoren beteiligt. Verantwortlich ist dafür die sogenannte D-Box an der N-terminalen Seite des zweiten Zinkfingers, die einen weiteren Zinkfinger antiparallel über Wasserstoffbrückenbindung und Ionenbindung binden kann (Glass *et al.*, 1994).



Wechselwirkungen in die Ligandenbindungstasche. Dadurch wird eine Konformationsänderung des Rezeptors induziert, die zur Umlagerung der Helix 12 in eine Position führt, was einem Zuklappen des Deckels auf die ligandengebundene Tasche entspricht. Durch diese Konformationsänderung entsteht eine neue Rezeptoroberfläche, die das Binden von Koaktivatoren ermöglicht (Wurtz *et al.*, 1996). Der Sequenzvergleich mit einer Reihe weiterer Mitglieder der Superfamilie der nukleären Rezeptoren läßt auf eine sehr ähnliche Struktur der Ligandenbindungsdomänen schließen. Der beschriebene Mechanismus hat daher wahrscheinlich allgemeine Bedeutung.

### 1.1.2 Steroidrezeptoren

Steroidrezeptoren spielen bei der embryonalen Entwicklung und der Homöostase im adulten Organismus eine wesentliche Rolle. Zu dieser Familie gehören die Rezeptoren für Androgene, Östrogene, Glukokortikoide, Mineralokortikoide und Progesteron. Der Östrogen-Rezeptor bindet als einziger seiner Familie als Dimer an das Palindrom mit der gleichen Halbseite (AGGTCA) wie die Nicht-Steroidrezeptoren. Die übrigen Steroidrezeptoren binden als Dimere an das palindromische *Response Element* AGAACAnnnTGTTCT, wobei das Palindrom typischerweise von drei Nukleotiden unterbrochen ist. Der Grund dafür liegt darin, daß der Östrogen-Rezeptor eine andere P-Box-Sequenz besitzt, die bei den Anderen identisch ist. Für die sich daraus ableitende Frage, wie bei gleichen oder sehr ähnlichen *Response Elements* steroidspezifische Genaktivierung gewährleistet werden kann, gibt es mehrere Antworten. Dies kann über die differenzielle Genexpression des Rezeptors und von Kofaktoren oder aber auch über die selektive Inaktivierung bzw. Generierung der aktiven Form von Hormonen in bestimmten Geweben geregelt werden (Funder, 1993).

Im Gegensatz zu allen anderen nukleären Rezeptoren sind alle nicht-ligandengebundenen Steroidrezeptoren mit einem Multiproteinkomplex aus Chaperonen wie Hsp90 und Hsp56 assoziiert, die die Rezeptoren in einer inaktiven aber ligandenzugänglichen Konformation halten (Pratt, 1993). Diese Komplexe können im Kern und auch im Zytoplasma vorliegen (mit Ausnahme des nicht aktivierten Glukokortikoid-Rezeptors, der nur im Zytoplasma vorliegt), die nach Ligandenbindung in den Kern transloziert werden. Erst nach Ligandenbindung und Dissoziation der Hitze-Schock-Proteine können Steroidrezeptoren dimerisieren und an die DNA binden.

### 1.1.3 Nicht-Steroidrezeptoren

Zu den Nicht-Steroidrezeptoren gehören der Schilddrüsenhormon-Rezeptor, der *all-trans* Retinsäure-Rezeptor, der *9-cis*-Retinsäure-Rezeptor und der Vitamin-D<sub>3</sub>-Rezeptor. Die Mitglieder dieser Gruppe sind wahrscheinlich die ältesten nukleären Rezeptoren, wie aus ihrer starken Heterogenität geschlossen werden kann. Im Gegensatz zur Steroidrezeptorfamilie haben sie nur eine kurze A/B-Domäne und eine eigene P-Box. Sie besitzen eine hohe Affinität zur DNA und können an ihr *Response Element* oft auch ohne Ligand binden. Die Nicht-Steroidrezeptoren bilden keine stabilen Komplexe mit Hitze-Schock-Proteinen und sind im Kern lokalisiert. Obwohl sie die gleiche P-Box besitzen, binden sie an sehr verschiedene *Response Elements*. Ein und derselbe Rezeptor kann manchmal sogar an verschiedene *Response Elements* binden.

Nicht-Steroidrezeptoren binden an die Sequenz AGGTCA entweder als einfache Halbseite, als direkte Wiederholung (*direct repeat*) AGGTCA(0-5n)AGGTCA oder als inverse Wiederholung AGGTCA(0-5n)TGACCT, wobei die beiden Halbseiten von 0 bis 5 Nucleotiden unterbrochen sein können. Die Bindung an das DNA *Response Element* kann als Monomer, meist aber als Homo- oder Heterodimer erfolgen. Einer der wichtigsten Dimerisierungspartner in Heterodimeren ist der *Retinoic X Receptor*, RXR.

Die meisten Mitglieder dieser Familie der Nicht-Steroidrezeptoren haben mehrere Isoformen, die entweder auf separate Gene (z.B. TR $\alpha$  und TR $\beta$ ) oder alternatives mRNA-Splicing (TR $\alpha$ 1 und TR $\alpha$ 2) (Izumo und Mahdavi, 1988; Lazar *et al.*, 1989) zurückzuführen sind. Diese Isoformen können zum Teil eine sehr unterschiedliche Gewebeverteilung und Aktivität besitzen.

Der Schilddrüsenhormon-Rezeptor ist ein multifunktionelles Protein. Er kann in der Abwesenheit eines Liganden als transkriptioneller Repressor wirken und in der Anwesenheit von Schilddrüsenhormon (z.B. Thyroxin, T<sub>4</sub>) als transkriptioneller Aktivator funktionieren (Chen *et al.*, 1995; Horlein *et al.*, 1995; Zamir *et al.*, 1996). Auch der nicht-ligandengebundene-TR liegt im Nukleus bereits gebunden an die DNA vor. Er bindet als Heterodimer mit dem *Retinoid X Receptor* (RXR) mit der größten Affinität an die DNA. Das gebundene *Response Element* besteht meist aus einem DR4-Element. Einmal an die DNA gebunden wird die Repression durch die Interaktion mit den Korepressoren *Nuclear Receptor Co-Repressor* (NCoR) und *Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor* (SMRT) vermittelt. Nach der Ligandenbindung dissoziieren die Repressoren vom Rezeptor, und es werden Koaktivatoren wie z.B. SRC-1, Grip1 oder RIP140 ( Takeshita *et al.*,

1996; Voegel *et al.*, 1996; Cavailles *et al.*, 1995) gebunden, die zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen führen (siehe nächstes Kapitel). Darüber hinaus verursacht die Ligandenbindung durch die Rekrutierung von Kofaktoren und Histondeacetylasen eine Auflösung der Chromatinstruktur über mehrere hundert Basenpaare (Wong *et al.*, 1995). Dies reicht allerdings alleine nicht für die transkriptionelle Aktivierung aus (Wong *et al.*, 1997).

Die Retinsäure-Rezeptoren lassen sich in zwei Familien unterteilen (Leid *et al.*, 1992). Die *Retininoic Acid Receptors* (RARs) und ihre verschiedenen Typen und Isoformen werden durch *all-trans* und *9-cis* Retinsäure aktiviert, wohingegen die *Retinoic X Receptors* (RXRs) nur durch *9-cis* Retinsäure aktiviert werden (Levin *et al.*, 1992). Retinoide spielen eine entscheidende Rolle sowohl bei der Musterbildung, Differenzierung und dem Wachstum von Zellen als auch bei der Reproduktion und dem Sehvorgang. Retinol (Vitamin A) kann von Tieren nicht *de novo* synthetisiert werden und wird mit der Nahrung aufgenommen. Das ebenfalls biologisch aktive Retinal und die Retinsäure können durch oxidativen Metabolismus generiert werden (Napoli und Race, 1987).

Der *Retinoic X Receptor* (RXR) kann als Homodimer an sein *Response Element* binden oder aber als Heterodimerisierungspartner fungieren. Die Bindung von TR, RAR, VDR, COUP-TF und PPAR an ihre *Response Elements* wird durch die Heterodimerisierung mit RXR erheblich verstärkt (Yu *et al.*, 1991). Die Wirkung von Schilddrüsenhormon, Retinoiden und Vitamin D kann so durch die Dimerisierung mit dem gemeinsamen Partner RXR moduliert werden (Kliwer *et al.*, 1992). Durch das Vorhandensein von einer Vielzahl an Isoformen und ihrer zelltypspezifischen Expression wird durch die Heterodimerisierung eine große Diversität erzeugt.

#### 1.1.4 Waisen-(*Orphan*)-Rezeptoren

Die Familie der sogenannten Waisen-(*Orphan*)-Rezeptoren beinhaltet jene Rezeptoren, für die kein Ligand existiert oder noch kein Ligand gefunden wurde. Etwa 75% der bisher bekannten Kernrezeptoren sind Waisenrezeptoren. Sie sind wahrscheinlich sehr früh während der Evolution entstanden, da viele von ihnen auch in Insekten, Nematoden und anderen Nichtvertebraten gefunden wurden (Kostrouch *et al.*, 1995). Einige dieser Rezeptoren können auch ligandenunabhängig als Transkriptionsfaktoren wirken und erfüllen damit streng genommen die Definition eines Rezeptors nicht mehr (Enmark *et al.*, 1996). Inzwischen

wurden auch entfernte Mitglieder dieser Familie kloniert, denen z.B. Domänen, die in den klassischen Rezeptoren konserviert sind, fehlen. Dem Rezeptor Dax-1 fehlen z.B. die konventionellen Zinkfinger der DNA-Bindungsdomäne, wohingegen die Ligandenbindungsdomäne konserviert ist (Zanaria *et al.*, 1994).

Im Gegensatz zur Familie der Steroidrezeptoren, deren P-Box C-terminal des ersten Zinkfingers die Aminosäurereste GSCKV beinhaltet, besteht die P-Box bei nahezu allen Waisen-Rezeptoren aus den Aminosäuren EGCKG/A und erkennt die *Response Elements* mit der Sequenz AGGTCA entweder in der Form als direkte Wiederholung mit 0 bis 5 Nukleotiden Abstand zueinander (Umesono *et al.*, 1991) oder als einfache Halbseite (Wilson *et al.*, 1993). Für die Waisenrezeptoren, die als Monomere binden, konnten für die DNA-Bindung wichtige sogenannte A- und T-Boxen C-terminal von der DNA-Bindungsdomäne identifiziert werden (Wilson *et al.*, 1993). Sie können zwischen Nukleotidsequenzen 5' zum AGGTCA-Motif diskriminieren (Harding und Lazar, 1993). Viele der Waisenrezeptoren können mit RXR Heterodimere bilden (Kliwer *et al.*, 1992), einige können sowohl als Monomer oder als Homo- bzw. Heterodimer an die DNA binden (Glass 1994), wie z.B. für HNF-4 und Rev-Erba gezeigt werden konnte. Oftmals liegen Waisenrezeptoren sehr spezifisch in bestimmten Geweben vor. So wird z.B. HNF-4 in der Leber (Sladek *et al.*, 1990), GCNF in Reproduktionsgeweben (Chen *et al.*, 1994) und RZR $\beta$  in bestimmten Arealen des Gehirns (Becker-André *et al.* 1994) exprimiert.

Obwohl die Funktion von Waisenrezeptoren auch auf andere Art und Weise als durch Ligandenbindung geregelt werden kann, wie z.B. Phosphorylierung, regulierte Genexpression oder indirekt durch Membrandepolarisation (Davis und Lau, 1994), dürfte wahrscheinlich der Großteil der Waisenrezeptoren ligandenabhängig reguliert sein. Über die klassischen niedermolekularen, lipophilen Liganden der Steroidrezeptoren (Weinberger und Bradley, 1990) hinaus kommen dafür prinzipiell aber auch völlig andere Substanzen in Frage. So kann der *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR) durch Fettsäuren (Göttlicher *et al.*, 1992), Prostaglandine und Leukotrien-D4-Rezeptor-Antagonist (Boie *et al.*, 1993) aktiviert werden. RZR $\beta$  kann Melatonin binden (Becker-André *et al.* 1994) und der *Farnesoid X-activated Receptor* (FXR) kann durch Farnesol und *Juvenile Hormone III* aktiviert werden (Forman *et al.*, 1995).

Viele Waisenrezeptoren werden mit Stoffwechsel- und Erbkrankheiten in Verbindung gebracht und sind daher mögliche Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Wirkstoffe für die therapeutische Behandlung (Mangelsdorf und Willy, 1998). Der Aufklärung der biologischen

Funktion der Familie der Waisenrezeptoren durch systematische Ligandensuche oder *Knock Out*-Techniken, wird auch in Zukunft eine zentrale Rolle zukommen.

### 1.1.5 *Germ Cell Nuclear Factor (GCNF)*

GCNF wurde erstmals 1994 als neues Mitglied der Familie der Waisen-Kernrezeptoren beschrieben (Chen *et al.*, 1994). Aufgrund seiner keimzellspezifischen Expression in den Spermatiden im Testis und in den Oozyten im Ovar der Maus wurde er *Germ Cell Nuclear Factor* (GCNF) benannt. Durch Sequenzvergleich konnte für die abgeleitete Proteinsequenz der klonierten Maus-cDNA die typische Domänenstruktur der Kernrezeptoren mit einer putativen DNA-Bindungs- und einer Ligandenbindungsdomäne gezeigt werden. Die meisten der für die Retinoid-Rezeptoren beschriebenen  $\alpha$ -helikalen Regionen (Helix 1-10) (Wutz *et al.*, 1996) ließen sich auch in GCNF identifizieren, wobei aber der, die AF-2 Funktion tragende, C-Terminus nicht konserviert ist. GCNF ist nicht eng mit anderen Kernrezeptoren verwandt und bildet als einziges Mitglied eine eigene Subfamilie (VI) in dem phylogenetischen Stammbaum der Superfamilie der Kernrezeptoren (Laudet, 1997). Maus-GCNF (mGCNF) wurde unabhängig von verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert und als *Retinoid Receptor Related Testis Specific Receptor* (RTR) (Hirose *et al.*, 1995) und *Neuronal Cell Nuclear Factor* (NCNF) (Bauer *et al.*, 1997) benannt. Zur Vereinheitlichung der Namengebung wurde vom „Nuclear Receptors Nomenclature Committee“ (1999) eine neue Nomenklatur vorgeschlagen, nach der GCNF die systematische Bezeichnung MR6A1 erhielt.

Homologe von GCNF wurden bisher in *Xenopus laevis* (xGCNF) (Dreyer *et al.*, 1996, Joos *et al.*, 1996), *Danio rerio* (zGCNF) (Baat *et al.*, 1999) und vier Varianten im *Homo sapiens* (hGCNF) (Süsens *et al.*, 1996; Kapelle *et al.*, 1997; Lei *et al.*, 1997, Agoulnik *et al.*, 1998) beschrieben, die wahrscheinlich auf alternatives Splicen zurückzuführen sind. Das Gen für den humanen GCNF konnte auf Chromosom 9 lokalisiert werden (Lei *et al.*, 1997; Agoulnik *et al.*, 1998).

Die Aminosäuresequenz der Homologe ist stark konserviert. hGCNF und mGCNF sind 98% identisch und hGCNF und xGCNF sind 83% identisch, wobei die meisten Unterschiede in der Scharnier-Region liegen. Die hohe Identität in der Ligandenbindungsregion deutet auf eine funktionelle Konservierung hin und läßt vermuten, daß ein möglicher Ligand für alle Homologe gleich ist. Bisher ist allerdings für GCNF kein Ligand bekannt.

In der adulten Maus konnte die Expression einer 2,4 kB großen und einer 7,5 kB großen mRNA beinahe ausschließlich im Hoden und ganz schwach im Ovar gezeigt werden (Chen *et al.*, 1994). Durch *in situ* Hybridisierung wurde die Expression von GCNF spezifisch in den post-meiotischen runden Spermatiden (Stadien VI-VIII der Spermatogenese) nachgewiesen (Hirose *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). In Oozyten der Maus wurde GCNF in den späten Stadien der folliculären Entwicklung gefunden (Chen *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu ist die Expression von GCNF in Zebrafisch und *X.laevis* in den Oozyten deutlich stärker als im Hoden (Braat *et al.*, 1999). In allen anderen Organen der adulten Tiere war die Expression von GCNF generell sehr niedrig.

Zusätzlich zur Expression von GCNF in adulten Tieren konnte ebenso eine Expression während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden (Süsens *et al.*, 1997). Durch *in situ* Hybridisierung wurde GCNF in Maus Embryos ab Tag 6,5 im Ektoderm, ab Tag 7,5 im Ekto-, Meso- und Endoderm detektiert. Am Tag 8,5 ist die Expression am stärksten im Neuroektoderm des sich entwickelnden Nervensystems und nimmt bis zum Tag 10,5 wieder ab. Im Gegensatz zu *X.laevis* bleibt aber die Expression erhalten, während sie bei *X.laevis* völlig verschwindet (Joos *et al.*, 1996; Süsens *et al.*, 1997).

Darüber hinaus konnte die Expression von GCNF auch in den embryonalen Karzinomzelllinien F9, NT2/D1 und P19 nachgewiesen werden (Lei *et al.*, 1997). Maus-P19- und humane NT2/D1-Zellen lassen sich durch Behandlung mit Retinsäure zu Neuronen differenzieren. Dies führt zu einer transienten Steigerung der GCNF-mRNA-Expression auf das 5-fache (Heinzer *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 1999).

Die spezifische Expression von GCNF in den Keimzellen im adulten Organismus, das Expressionsmuster im Embryo und die transiente Expression in der Zelllinie P19 während der Retinsäure-induzierten Differenzierung sprechen dafür, daß GCNF eine Funktion bei der Keimzellreifung und der neuronalen Differenzierung hat. Diese Vermutungen werden weiterhin unterstützt durch einen lethalen GCNF-*Knock Out* (Cooney, unveröffentlicht) und die Expression einer dominant-negativen GCNF-Variante, die zu einer gestörten Organogenese führte (Bauer *et al.*, 1998).

GCNF kann als einziger Kernrezeptor mit hoher Affinität als Homodimer an die direkte Wiederholung der Basenfolge AGGTCA binden (DR0: 5'-AGGTCA AGGTCA-3'), wobei zwischen den beiden Halbseitenelementen kein Nukleotid liegt (Chen *et al.*, 1994; Borgmeyer, 1997; Yan *et al.*, 1997). Mit geringerer Affinität ist auch die Bindung als Monomer (Yan *et al.*, 1997) bzw. Dimer (Cooney *et al.*, 1998) an das erweiterte Halbseitenelement 5'-TCA

AGGTCA-3' möglich, das identisch mit dem SF-1 und COUP-TF *Response Element* ist (Lala *et al.*, 1992; Burbach *et al.*, 1994). RXR und GCNF können nicht dimerisieren (Borgmeyer *et al.*, 1997), andere Heterodimerisierungspartner für GCNF sind bisher nicht bekannt.

Durch Computeranalyse von bekannten 5'-nicht translatierten Promotorregionen wurden DR0 Elemente unter anderem auch in Protamingenen gefunden. Diese stark basischen Moleküle ersetzen während der Spermiogenese Histone und führen zu einer noch dichteren Verpackung der DNA in den Spermien (Meistrich *et al.*, 1988). Ihre Expression korreliert zeitlich mit der Expression von GCNF in den späten Stadien der Keimzellreifung und macht die Protamine zu wahrscheinlichen Zielgen-Kandidaten für eine Regulation durch GCNF (Yan *et al.*, 1997; Hummelke *et al.*, 1998).

Da bisher kein Ligand für GCNF bekannt ist, wurden funktionelle Untersuchungen zur Transkription in der Abwesenheit von Hormon durchgeführt. Es wurde gezeigt, daß Maus GCNF Zielgene reprimiert und ohne Ligand, ähnlich wie der Schilddrüsenhormonrezeptor oder COUP-TF, als transkriptioneller Repressor wirkt (Bauer *et al.*, 1997; Cooney *et al.*, 1998). Ob ein hypothetischer Ligand nur zu einer Derepression führt oder GCNF zu einem Transaktivator macht, ist bisher nicht vorherzusagen.

## 1.2 Koaktivatoren und Korepressoren

Kernrezeptoren können die Transkription von Zielgenen reprimieren oder nach Bindung eines Liganden aktivieren. Diese Funktion wird durch die Assoziation mit weiteren Kofaktoren, sogenannten Korepressoren oder Koaktivatoren, vermittelt. Die kondensierte Chromatin-Struktur verhindert physikalisch die Bindung von Transkriptionsfaktoren und des RNA-Polymerase II-Komplexes an die Ziel-DNA (Struhl, 1998; Kadonaga, 1998). Koaktivatoren besitzen eine intrinsische Histonacetylierungsaktivität, die durch Hyperacetylierung der Histone zu einer offenen, für Transkriptionsfaktoren zugänglichen Form des Promotors führt (Ogryzko *et al.*, 1996; Spencer *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu führen Korepressoren durch Assoziation und Aktivierung mit Histondeacetylasen zur Hypoacetylierung der Histone und so zu einer kompakten, transkriptionell reprimierten Form der DNA (Heinzel *et al.* 1997, Nagy *et al.*, 1997). Zusätzlich zu dieser Funktion der Chromatin-Modellierung bilden Koaktivatoren durch direkte Protein-Protein Interaktion auch die Brücke zwischen den Kernrezeptoren und dem allgemeinen Transkriptionsapparat (Jenster, 1998). Diese Funktion ist essentiell, da eine

Hormon- und Rezeptor-abhängige Transkription von „nackten“ DNA-Matrizen *in vitro* auch Koaktivatoren benötigt (Jenster *et al.*, 1997).

Einige Kernrezeptoren wie der Retinsäure-Rezeptor und der Schilddrüsenhormonrezeptor können in Abwesenheit ihres Liganden an ihr Zielgen binden und dort aktiv die Transkription reprimieren. Dies geschieht durch die Interaktion mit den beiden am besten untersuchten und sehr homologen Korepressoren NCoR und SMRT (Chen und Evans, 1995; Horlein *et al.*, 1995; Sande und Privalsky, 1996; Seol *et al.*, 1996) über die Scharnier-/Ligandenbindungsdomäne. Sie besitzen eine Repressordomäne, deren Aktivität durch die Rekrutierung von Sin3 und Histondeacetylasen vermittelt wird. Dieser NCoR/Sin3/HDAC-Komplex enthält zusätzlich eine Reihe weiterer Proteine. Steroidrezeptoren binden in Abwesenheit des Liganden Hitzeschockproteine und keine Korepressoren, können aber nach Bindung von Antagonisten (wie z.B. RU 486 beim Progesteronrezeptor) Korepressoren rekrutieren, die die Transaktivierungsdomäne maskieren und aktiv die Transkription reprimieren.

Durch die Bindung eines Agonisten kommt es zu einer Konformationsänderung des Kernrezeptors. Die  $\alpha$ -Helix 12 orientiert sich zum Rezeptor hin, was zur Dissoziation des Korepressors und zur Bindung eines Koaktivators führt. Dabei interagiert die AF-2 Domäne des Kernrezeptors mit dem sogenannten LXXLL-Motiv (X steht für eine beliebige Aminosäure) des Koaktivators (Freedman *et al.*, 1999). Koaktivatoren tragen mehrere solcher Motive, so daß ein Rezeptor-Dimer über die AF-2 Domänen jeweils einen Koaktivator binden kann (Nolte *et al.*, 1998; Darimont *et al.*, 1998). Darüber hinaus kommt es nach der Ligandenbindung zu weiteren Interaktionen der Koaktivatoren wie z.B. SRC-1 und TIF-2 und der Kernrezeptoren mit Proteinen mit einer intrinsischen Histondeacetylierungsfunktion wie z.B. CBP/p300 oder p/CAF (Blanco *et al.*, 1998; Korzus *et al.*, 1998), die alle zusammen an der Chromatinmodellierung und der Rekrutierung des RNA-Polymerase-II-Initiationskomplexes beteiligt sind. Die Expression der meisten Koaktivatoren ist nicht auf ein bestimmtes Organ oder einen Zelltyp beschränkt, und sie sind in der Lage, die Transkription von vielen Kernrezeptoren zu vermitteln (Jenster *et al.*, 1998).

### 1.3 Die Spermatogenese

Der Hoden besteht aus einer Vielzahl an Samenkanälchen, die ca. 30-70 cm lang sind. Alle Vor- und Endstufen der Samenzellen, die sich in den Samenkanälchen befinden, werden als Keimzellen bezeichnet. Die Vorgänge, die sich bei der Samenzellbildung abspielen, werden zusammenfassend als Spermatogenese bezeichnet (siehe Abb. 3). Die Spermatogenese ist im reifen Hoden ein kontinuierlicher Prozeß, bei dem verschiedene Stadien durchlaufen werden:

- Spermatozytogenese: Die Spermatozytogenese geht von den Spermatogonien (Abkömmlinge der Urgeschlechtszellen [Gonozyten]) aus, die der Basalmembran der Samenkanälchen breit anliegen. Sie sind proliferationsfreudige Zellen, die sich häufig und ausschließlich mitotisch teilen. Dabei entstehen sowohl Zellen, die denen der Ausgangszellen gleichen und damit für weitere Mitosen zur Verfügung stehen, als auch solche, die eine weitere Entwicklung zu Spermatischen durchlaufen und als primäre Spermatozyten bezeichnet werden.

- Meiose: In dieser Phase durchlaufen die primären Spermatozyten zwei aufeinanderfolgende Teilungen. Zu Beginn der Reifeteilung trägt jeder primäre Spermatozyt durch Verdopplung des Chromosomensatzes 46 Chromosomen. Diese werden während der 1. meiotischen Zellteilung auf die Hälfte reduziert und auf die beiden entstehenden Zellen verteilt. Die Prophase der 1. Reifeteilung dauert bis zu 22 Tagen, weshalb in Schnitten durch Samenkanälchen stets viele primäre Spermatozyten angetroffen werden. Die nachfolgenden Metaphase, Anaphase und Telophase laufen in rascher Folge ab. Das Ergebnis der 1. Reifeteilung sind kleine Zellen, die haploiden sekundären Spermatozyten. Sekundäre Spermatozyten haben nur noch 23 Chromosomen. Sie sind in Schnitten kaum zu finden, da ihre Interphase sehr kurz ist und sie sofort nach ihrer Entstehung in die 2. Reifeteilung eintreten. Dabei werden die beiden Chromatiden jedes Chromosoms auf die Tochterzellen verteilt. Das Ergebnis der Teilung der sekundären Spermatozyten sind die haploiden Spermatischen. Diese liegen am Lumen der Samenkanälchen und besitzen sehr dichtes Chromatin.

- Spermiogenese: Die Spermiogenese ist der Prozess der Differenzierung der Spermatischen und damit der Ausbildung der Spermien. Die runden Spermatischen gehen zunächst in elongierte Spermatischen über, es kommt zur Ausbildung des akrosomalen Bläschens, das sich abflacht und wie eine Kappe auf den Zellkern legt. Das akrosomale Bläschen enthält Enzyme, die bei der Befruchtung eine große Rolle spielen, da sie durch Proteolyse der *Zona pelucida* die Aufnahme des Spermatozoons in die Eizelle erst ermöglichen. Wenn sich der Schwanz des Spermiums voll ausgebildet hat, schnürt sich ein Teil des Zytoplasmas als Restkörper ab. Der Restkörper

wird von den Sertoli-Zellen phagozytiert und abgebaut. Das Endergebnis der Spermiogenese sind die Spermatozoen.

Der gesamte Prozeß der Spermatogenese verläuft innerhalb eines Samenkanälchens von außen (Basallamina) nach innen (Lumen). Beim Menschen dauert dieser Prozeß ca. 74 Tage. Dabei entwickeln sich die Keimzellen nicht alle gleichzeitig von der Basallamina zum Lumen hin, sondern verschiedene benachbarte Areale innerhalb des Samenkanals befinden sich in unterschiedlichen Differenzierungsstadien. Die Verteilung der Keimzellen im gleichen Entwicklungsstadium entspricht, wenn man die gesamte Länge eines Samenkanälchens betrachtet, eher ineinander gesteckter Schrauben, so daß ein Schnitt quer durch einen Samenkanal immer mehrere verschiedene Stadien der Spermatogenese gleichzeitig zeigt.

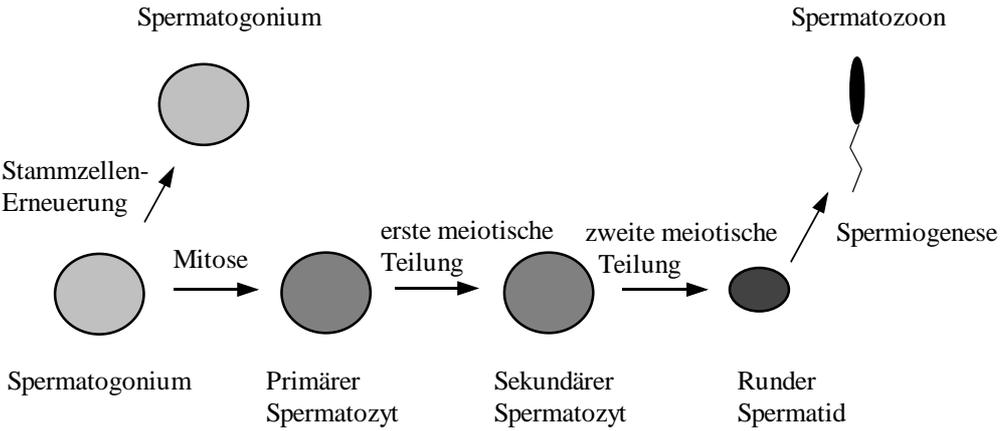


Abb. 3: **Schematische Darstellung der Spermatogenese.** Nur ein kleiner Teil der Spermatogonien durchläuft die vollständige Differenzierung zum fertigen Spermatozoon. Die meisten Spermatogonien proliferieren und erhalten so die Menge an undifferenzierten Stammzellen.