

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Isolierung humaner *GCNF*-cDNAs

Ein neuer Waisen-Kernrezeptor der Maus ist von den Arbeitsgruppen von O'Malley und Jetten beschrieben worden. Aufgrund seiner beinahe ausschließlichen Expression in den Keimzellen des Testis und in reifenden Oozyten im Ovar adulter Tiere ist er „Germ Cell Nuclear Factor“ (*GCNF*) (Chen *et al.*, 1994) bzw. „Retinoid Receptor Related Testis Associated Receptor“ (*RTR*) (Hirose *et al.*, 1995) genannt worden. Zur Charakterisierung und Aufklärung der physiologischen Funktion von *GCNF*, insbesondere mit Hinblick auf eine mögliche Funktion bei der Regulierung der zellulären Differenzierung während der männlichen Keimzellentwicklung, sollte das humane Ortholog zur publizierten Maus *GCNF*-Sequenz kloniert werden. Dazu wurde eine humane Testis cDNA-Bank mit einem durch PCR-Amplifizierung hergestellten humanem *GCNF*-Fragment durchmuster.

#### 4.1.1 Herstellung der Sonde

Zur Herstellung der humanen *GCNF*-cDNA Sonde wurde ein cDNA-Fragment aus humaner Testis-cDNA durch RT-PCR mit degenerierten Primern (Primer #2 und #8) amplifiziert. Diese waren durch einen Sequenzvergleich aus dem am besten konservierten Bereich der DNA-Bindungsdomäne von 28 Kernrezeptoren abgeleitet worden. Die amplifizierten Fragmente von 170 bp Länge (siehe Abb. 4) wurden in den pCR-Script SK(+)-Vektor (Stratagene) subkloniert, und die Klone mit dem Oligonukleotid T3 sequenziert. Der Klon #4.1 enthielt ein cDNA-Fragment von 170 bp Länge, das 88.3 % Sequenzidentität zur Maus *GCNF*-cDNA aufwies. Desweiteren wurden cDNA-Fragmente der Kernrezeptoren *TAK1*, *ROR $\gamma$* , *TR3*, *TR4*, *TR*, *RXR $\beta$*  und *TR2-9* gefunden. Das Fragment der humanen *GCNF*-cDNA wurde als Sonde für die Durchmusterung der humanen Testis cDNA-Bank verwendet.

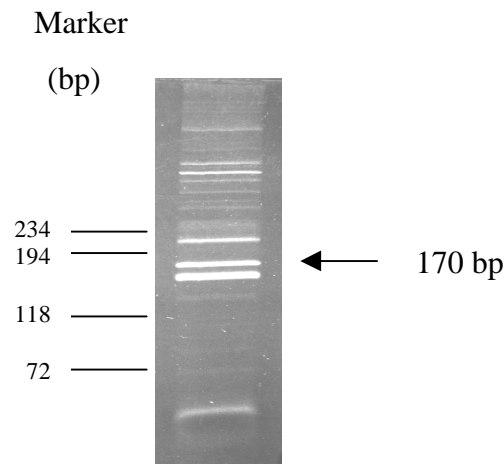


Abb. 4: **Erzeugung eines humanen *GCNF*-Fragments durch RT-PCR.** Einzelstrang cDNA aus humaner Testis-mRNA diente als Matrize für die PCR-Amplifikation mit degenerierten Oligonukleotiden (Primer #2 und #8). Die erhaltenen Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf die *hGCNF*-Bande.

#### 4.1.2 Durchmusterung einer humanen Testis cDNA-Bank

Zur Isolierung humaner vollständiger *GCNF*-cDNAs wurden ungefähr 900.000 rekombinante Phagen einer nicht-amplifizierten humanen Testis-Bank (Krätzschar *et al.*, 1996) mit dem markierten *hGCNF*-cDNA-Fragment durchmustert. Insgesamt 21 Plaques wurden als primäre Kandidaten identifiziert und weiter vereinzelt. Die isolierten positiven Bakteriophagen-Klone wurden durch *in vivo*-Exzision in pBluescript-Plasmide umgewandelt.

#### 4.1.3 Restriktionsanalyse und Sequenzierung

Um die cDNA-Insertion der aufgereinigten Klone zu erhalten, wurde die Plasmid-DNA durch Restriktionsspaltung mit *EcoRI* und *XhoI* analysiert, und beide DNA-Stränge wurden mit flankierenden 3'- und 5'-Vektorprimern und „Primerwalking“ sequenziert. Die zwei cDNA-Klone Klon#1 und Klon#5 mit je 1,9 kb Insertlänge (siehe Abb. 5) und drei weitere Klone

Klon#7 (3,6 kb Insertlänge), Klon#10 (1,8 kb Insertlänge) und Klon#12 (4,3 kb Insertlänge) (siehe Abb. 5) wurden so identifiziert.

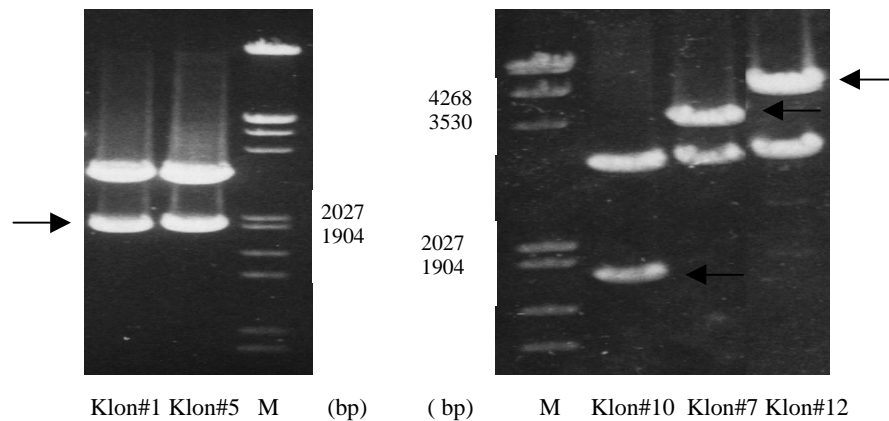


Abb. 5: **Restriktionsanalyse der cDNA-Insertion der isolierten Klone.** Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NheI* geschnitten und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Pfeile zeigen auf die Banden der entsprechenden Inserts. . M = Marker

Durch Sequenzierung ergab sich die exakte Größe der cDNA-Insertionen. Sie betrug für Klon#5 1909 bp und für Klon#1 1910 bp mit einem Poly(A)-Schwanz von 31 bp bzw. 16 bp. Die Sequenzanalyse ergab einen offenen Leserahmen von 480 bzw. 479 Aminosäuren. Beide Klone unterschieden sich nur in einer internen Deletion von drei Basenpaaren (Nukleotid-Position 752-754) in dem offenen Leserahmen bei Klon#1, was zum Verlust eines Serins in der abgeleiteten Aminosäuresequenz, sowie einer etwas abweichenden Polyadenylierungsstelle und 31 zusätzlichen Nukleotiden am 5'-Ende von Klon#1 (siehe Abb. 6), führte.

1 CGGCGCGGAGCCGGGCGGCTCGGGGCCAGAGAGAGCCGCGGCCGGGAGCTCGCGGGCTC  
 61 CTGACAACCTCCTCCCCTCGGCGGACGACGACCACGGCGACTAGGGCGCCGGTTCATGGCG  
 121 GAGCAACAAACCCGGCGCGGACCCTAGGCACCACCGCATGGAGCGGGACGAACCGCCGCC  
 1 M E R D E P P P  
 181 TAGCGGAGGGGGAGGCGGCGGGGGCTCGGCGGGGTTCTTGAGCCTCCCGCCGCGCTCCC  
 9 S G G G G G G S A G F L E P P A A L P  
 >< ><  
 241 TCCGCCCGCCGCGCAACGGTTTCTGTCAGGATGAATTGGCAGAGCTTGACCCAGGCACTAT  
 29 P P P R N G F C Q D E L A E L D P G T I  
 301 TTCTGTTTCAGATGATCGGGCTGAACAACGAACCTGTCTCATTTGTGGGGACCGCGCTAC  
 49 S V S D D R A E Q R T C L I C G D R A T  
 361 AGGCTTGCACATATGGGATCATCTCCTGTGAGGGCTGCAAAGGGTTTTTCAAGCGGAGCAT  
 69 G L H Y G I I S C E G C K G F F K R S I  
 421 TTGCAACAAACGGGTATATCGATGCAGTCGTGACAAGAACTGTGTCATGTCTCGGAAGCA  
 89 C N K R V Y R C S R D K N C V M S R K Q  
 481 GAGGAACAGGTGCCAGTACTGCCGCTGCTCAAATGCCTCCAGATGGGGATGAACCGGAA  
 109 R N R C Q Y C R L L K C L Q M G M N R K  
 541 GGCTATCAGAGAAGATGGCATGCCTGGAGGCCGGAATAAGAGCATTGGGCCAGTCCAGAT  
 129 A I R E D G M P G G R N K S I G P V Q I  
 601 ATCGGAAGAAGAAATCGAAAGGATCATGTCTGGGCAGGAGTTTGAGGAAGAGGCCAATCA  
 149 S E E E I E R I M S G Q E F E E E A N H  
 661 CTGGAGCAACCATGGTGATAGTGACCACAGTTCCCCTGGGAACAGGGCTTCGGAGAGCAA  
 169 W S N H G D S D H S S P G N R A S E S N  
 (---)  
 721 CCAGCCCTCACCAGGCTCCACACTGTCTTCCAGTAGGTCTGTGGAAGTGAATGGATTCAT  
 189 Q P S P G S T L S S S R S V E L N G F M  
 781 GGCCTTCAGGGAACAGTACATGGGAATGTCTGTGCCTCCACATTACCAATATATACCGCA  
 209 A F R E Q Y M G M S V P P H Y Q Y I P H  
 841 CCTTTTTAGCTATTCTGGCCACTCACCCTTCTGCCCAACAAGCTCGCAGCCTGGATCC  
 229 L F S Y S G H S P L L P Q Q A R S L D P  
 901 CCAGTCATACAGTCTGATTACCCAGCTGTTATCAGCCGAGGACCTGGAACCATTTGGGCAC  
 249 Q S Y S L I H Q L L S A E D L E P L G T  
 961 GCCCATGTTGATTGAAGATGGATACGCTGTGACACAGGCAGAACTATTTGCCCTGCTTTG  
 269 P M L I E D G Y A V T Q A E L F A L L C  
 1021 CCGCCTGGCCGACGAGCTGCTCTTTAGGCAGATTGCCTGGATCAAGAACTGCCTTTCTT  
 289 R L A D E L L F R Q I A W I K K L P F F  
 1081 CTGCGAGCTCTCAATCAAGGATTACACGTGCCTCTTGAGCTCTACGTGGCAGGAGCTAAT  
 309 C E L S I K D Y T C L L S S T W Q E L I  
 1141 CCTGCTGTCTTCCCTCACCGTTTACAGCAAGCAGATCTTTGGGGAAGTGGCTGATGTCAC  
 329 L L S S L T V Y S K Q I F G E L A D V T  
 1201 TGCCAAGTACTCGCCCTCCGATGAAGAACTACACAGATTTAGTGATGAAGGGATGGAGGT

```

349  A K Y S P S D E E L H R F S D E G M E V
1261 GATCGAGCGGCTCATCTACCTCTATCACAAGTTCCATCAGCTAAAGGTCAGCAACGAGGA
369  I E R L I Y L Y H K F H Q L K V S N E E
1321 GTATGCTTGCATGAAAGCAATTAACCTCCTAAATCAAGATATCAGGGGTCTGACCAGTGC
389  Y A C M K A I N F L N Q D I R G L T S A
1381 CTCACAGCTGGAACAATTGAATAAACGATACTGGTACATTTGCCAGGATTTTACTGAATA
409  S Q L E Q L N K R Y W Y I C Q D F T E Y
1441 TAAATACACACATCAGCCGAACCGCTTTCCTGATCTCATGATGTGCTTACCTGAGATTCCG
429  K Y T H Q P N R F P D L M M C L P E I R
1501 ATATATTGCAGGAAAGATGGTGAATGTGCCCTGGAGCAGCTGCCCTCCTCTTTAAGGT
449  Y I A G K M V N V P L E Q L P L L F K V
1561 GGTGCTGCATTCCTGCAAGACCAGTGTGGGCAAGGAATGACCTGTTCCAGGCGCCCTCCT
469  V L H S C K T S V G K E *
1621 CAGGCCAACCCACAGCGTCTTGGGTGGGCAGGACAGGCTCTGGAGGGAAAAGCCAGAGAGA
1681 CCAAGATGGAGGCTGTGGAGCAGCATTTCCCGTTGCCTCCATAGCAAGAAGAGTTTTTGT
1741 TTGTTTGTCTGTTTTTTTAACTCATTCTATATATTTATTTACGACAGAGTTGAAT
1801 GTATGGCCTTCAACATGATGCACATGCTTTTGTGTGAATGCAGCCAATGCATTTTCTTAC
1861 AGTTTACAGAATGTGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
      |
      (AAAAAAAAAAAAAAAA)

```

Abb. 6: **Nukleotid-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der beiden vollständigen *hGCNF*-cDNAs Klon#5 und Klon#1.** Die interne Deletion von 3 bp (Nukleotidposition 752-754) bei Klon#1, die zum Fehlen der Aminosäure Serin in der kodierten Proteinsequenz führt, und die alternative Polyadenylierungstelle sind in Klammern dargestellt. Die Regionen, die den PCR-Primern zur Erstellung der 170 bp *hGCNF*-Sonde entsprechen, sind überstrichen. Die putative Lage zweier Introns im *hGCNF*-Gen (nach Position 257 und 299) sind durch (><) markiert. Die Sequenz ist in der Genbank unter der *accession number* U80802 abgelegt worden.

Klon#7 und Klon#12 enthielten einen Großteil des offenen Leserahmens von Klon#5 (von Nukleotidposition 257 bis 1597 in Abb. 6), zeigten jedoch unbekannte Sequenzen von 2,0 kb bzw. 0,4 kb Länge am 5'-Ende (siehe Abb. 7). Der 3'-Bereich nach dem offenen Leseraster umfaßte eine Länge von 0,3 kb bzw. 2,5 kb. Klon#10 enthielt von Nukleotid 300 (verglichen mit Klon#5) an 237 bp des offenen Leserahmens von Klon#5. Am 5'-Ende befand sich eine unbekannte Sequenz von 0,8 kb und am 3'-Ende eine unbekannte Sequenz von 0,8 kb Länge. Klon#7 und Klon#12 zeigten ebenfalls wie Klon#5 keine interne Deletion an Position 752-754.

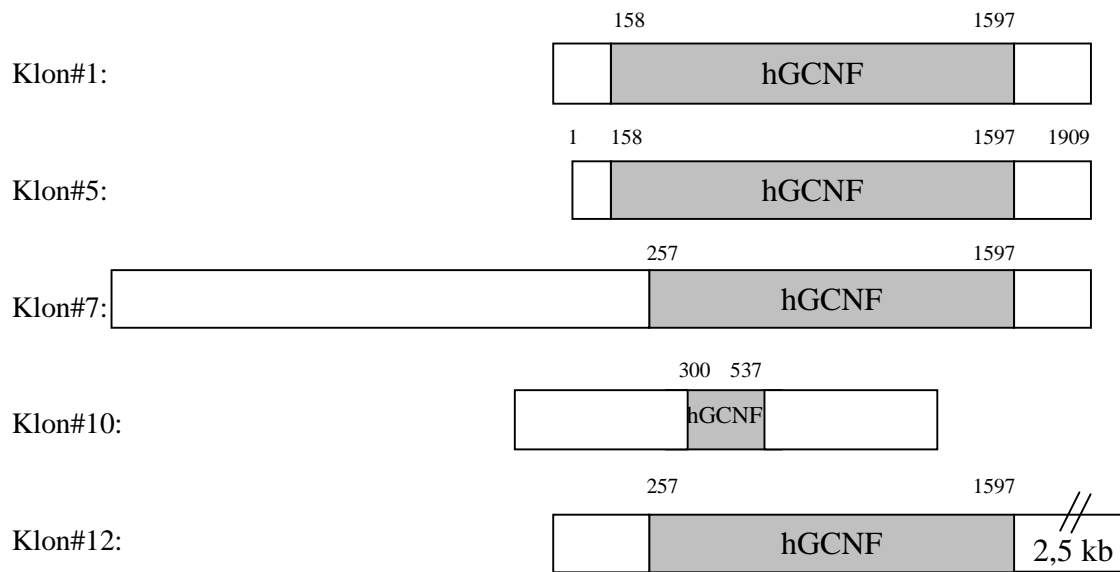


Abb. 7: **Schematische Darstellung der isolierten *hGCNF*-cDNAs.** Die kodierende Sequenz ist grau dargestellt. Die Zahlen entsprechen den Nukleotidpositionen verglichen mit Klon#5 (siehe Abb. 6), der als Bezug für die Nomenklatur verwendet wurde, da mit dieser cDNA nachfolgend gearbeitet wurde. Klon#1 und Klon#5 enthalten vollständige cDNAs.

#### 4.1.4 Sequenzvergleich mit Sequenzen in öffentlichen Datenbanken

Die cDNA-Sequenzen von Klon#1 und Klon#5 wurden mit Sequenzen in der „Gen-Bank“-Sequenzdatenbank verglichen. Dazu wurde das Programm BLAST (Altschul *et al.*, 1990) verwendet. Die Maus *GCNF*-cDNA-Sequenz (Chen *et al.*, 1994) und RTR (Hirose *et al.*, 1995) zeigten mit 89,1 % DNA-Sequenzidentität die stärkste Ähnlichkeit. Aufgrund der hohen Identität zur Maus-*GCNF*-Sequenz wurde angenommen, daß die isolierten cDNAs das humane Ortholog von *GCNF* darstellen und wurden daher mit *hGCNF* bezeichnet. Da Klon#1 eine interne Deletion von drei Basenpaaren trägt (Nukleotid-Position 752-754), die bei der Maus *GCNF*-Sequenz nicht beschrieben ist, wurde nachfolgend mit der humanen *GCNF*-Sequenz Klon#5 weitergearbeitet.

Die *hGCNF*-cDNA kodiert für ein Protein von 480 Aminosäuren. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen mit *mGCNF* und der später veröffentlichten *Xenopus-GCNF* Sequenz

wies eine Identität von 98,3 % bzw. 82,7 % auf. Der einzige deutliche Unterschied zwischen den Sequenzen ist eine Insertion bei mGCNF von 15 Aminosäuren zwischen Position 47 und 48 bei hGCNF. Dieser Bereich fehlt bei dem N-terminal kürzerem xGCNF völlig (siehe Abb. 8). Der bei Klon#1 deletierte Aminosäurerest Serin ist sowohl bei Klon#5, Klon#7 und Klon#12 als auch mGCNF vorhanden. Die Polyadenylierungsstelle der cDNA-Insertionen in Klon#5 und Klon#7 liegt 279 bp stromabwärts vom Stop-Kodon und entspricht der Position der Polyadenylierungsstelle, wie sie von Hirose *et al.* publiziert wurde. Nachfolgend publizierte hGCNF Sequenzen von (Agoulnik *et al.*, 1998), (Lei *et al.*, 1997) und (Süsens *et al.*, 1996) zeigten die gleiche Aminosäuresequenz wie das hier beschriebene hGCNF, geringe Nukleotidabweichungen von der *hGCNF*-Sequenz von Lei *et al.* bestehen, aber die entsprechenden Positionen der anderen publizierten Sequenzen stimmen an diesen Stellen überein.





Ein Sequenzvergleich mit den Kernrezeptoren RAR $\gamma$  und RXR $\alpha$  zeigte, daß hGCNF die typische Domänenstruktur der Kernrezeptoren aufweist (siehe Abb. 8). Die A/B-Domäne, die DNA-Bindungsdomäne, die Scharnier-Region und die Ligandenbindungsdomäne (LBD) ließen sich anhand von invarianten oder hoch konservierten Aminosäuren identifizieren. Innerhalb der Ligandenbindungsdomäne konnten die meisten der möglichen Helices, die anhand der Kristallstrukturen von RAR $\gamma$  und RXR $\alpha$  für die Familie der Kernrezeptoren vorhergesagt worden sind (Wurtz *et al.*, 1996), zugeordnet werden. Allerdings ist hGCNF im Bereich des C-Terminus um mindestens zehn Aminosäuren kürzer als die überwiegende Mehrzahl der Kernrezeptoren. Eine bedingte Homologie zur Konsensus-Sequenz der AF-2 Domäne läßt auf die mögliche Existenz einer Helix 12 schließen. Diese enthält aber nicht die sonst konservierte saure Aminosäure (meistens Glu) sondern ein Lys an Position 467 (siehe Abb. 9).

	<--- H8 --->	<----- H9 ----->
hGCNF	...LKVSNEEYACMKAINFLNQ.....DIRGLTSASQLEQLNKRYWYICQDFTEYK	
mGCNF	...LKVSNEEYACMKAINFLNQ.....DIRGLTSASQLEQLNKRYWYICQDFTEYK	
xGCNF	...LKVSNEEYVCMKAINFLNQ.....DIQGISSASQVEQLNKRYWYVCQDFTEYR	
hPPAR $\alpha$	...LELDDSDISLFVAAIICCG.....DRPGLLNVGHIIEKMQEGIVHVLRLHLQSN	
hLXR $\alpha$	...LQLNDAEFALLIAISIFSA.....DRPNVQDQLQVERLQHTYVEALHAYVSIH	
hRAR $\gamma$	...LEMDDTETGLLSAICLICG.....DRMDLEEPEKVDKLEPLLEALRLYARRR	
hZR $\alpha$	...MHLTEDEIALFSAFVLSA.....DRSWLQEKVKIEKLQKIQALQHVLRQKN	
rNGFI-B	...LGVDVPAFACLSALVLIT.....DRHGLQDPRRVEELQNRASCLKEHMAAV	
hRXR $\alpha$	...MQMDKTELGLRAIVLFPN.....DSKGLSNPAEVEALREKVYASLEAYCKHK	
hCOUP-TF	...LHVDSAEYSCLKAIVLFTS.....DACGLSDAAHIESLQEKSQCALEEYVRSQ	
hHNF4	...LQIDDNEYAYLKAIIFDP.....DAKGLSDPGKIKRLRSQVQVSLEDYINDR	
hER	...MNLQGEFVCLKSIIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMKA	
	<--- H8 --->	<----- H9 ----->
	<----- H10 ----->	< H12 >
hGCNF	Y...THQPNRFPDLMMCLPEIRYIAGKMN.....VPLEQLPLLFKVVLHSC	
mGCNF	Y...THQPNRFPDLMMCLPEIRYIAGKMN.....VPLEQLPLLFKVVLHSC	
xGCNF	Y...PHQPNRFPDLMMCLPEVRYIAGKLVN.....VPLEQLPLLFKAFVHSC	
hPPAR $\alpha$	H...PDDIFLFPKLLQKMDLRLVTEHAQLVQIIKKTESDA...ALHPLLQEIYRDMY	
hLXR $\alpha$	H...PHDRMLFPRMLMKLVSLRTLSSVHSEQVFALRLQDK...KLPLLSEIWDVHE	
hRAR $\gamma$	R...PSQPYMFPRMLMKITDLRGISTKGAERAITLKMEIPG...PMPPLIREMLENPE	
hZR $\alpha$	H...REDG.MLTKLICKVSTLRALCGRHTEKLMFAKAIYDPIDVRLHFPLYKELFTSEF	
rNGFI-B	AGD.PQPASCLSRLLGKLPRLTCTQGLQRIQIFCLKLEDLVPPPIVDKIFMDTSLF*	
hRXR $\alpha$	Y...PEQPGRFAKLLLRPALRSIGLKCLEHLFFFKLIGDT...PIDTFMEMLEAPH	
hCOUP-TF	Y...PNQPSRFGKLLLRPLSLRTVSSSVIEQLFFVRLVGKT...PIETLIRDMLLSGS	
hHNF4	Q...YDSRGRFGELLLLLPTLQSIWQIEQIQFIKLFQMA...KIDNLLQEMLLGGS	
hER	GLTLQQQHQLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVV...PLYDLLLEMLDAHR	
	<----- H10 -----><-- H11 -->	< H12 >   AF2
hGCNF	KTSVGKE*	
mGCNF	KTSTVKE*	
xGCNF	KTIVTKE*	
hPPAR $\alpha$	*	
hLXR $\alpha$	*	
hRAR $\gamma$	MFEDDSSQPGPH...	
hZR $\alpha$	EPAMQIDG*	
rNGFI-B		
hRXR $\alpha$	QMT*	
hCOUP-TF	FSFNWPYMSIQCS*	
hHNF4	PSDAPHAHHPLH...	
hER	LHAPTSRGGASV...	

Abb. 9: Sequenzvergleich der C-Termini von GCNF-Proteinen und anderen Mitgliedern der Kernrezeptorfamilie. Die bekannten bzw. putativen helikalen Regionen und die Kernregion der Aktivierungs-Funktion 2 (AF2) innerhalb von Helix 12 sind markiert.

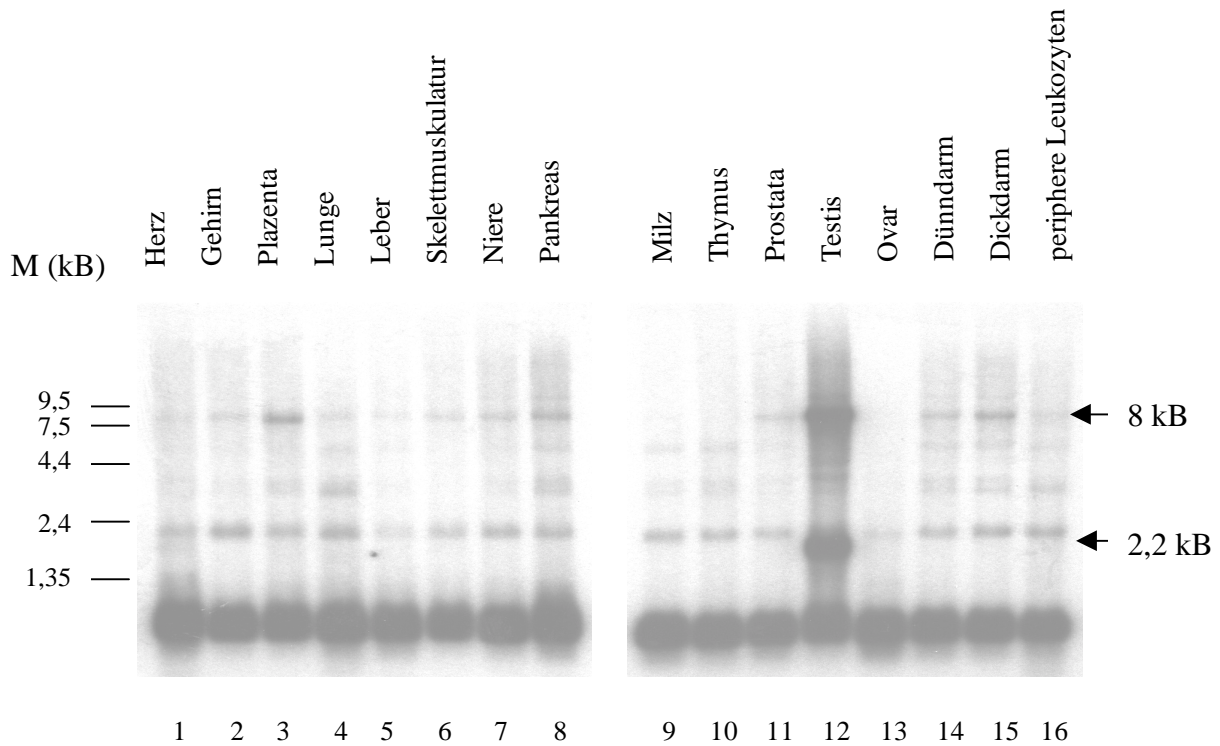
## 4.2 Untersuchung der Genexpression von hGCNF

In der Maus war eine fast ausschließlich auf zwei Gewebe beschränkte Expression von *GCNF* im Ovar und im Testis beschrieben worden (Chen *et al.*, 1994) und (Hirose *et al.*, 1995). Um die Verteilung der Expression von *GCNF* in verschiedenen Geweben beim Menschen zu untersuchen, sollten Northern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt werden.

#### 4.2.1 Genexpression von hGCNF in verschiedenen humanen Geweben

Die Expression von *hGCNF* in verschiedenen adulten humanen Geweben wurde mit Hilfe der kommerziellen Northern Blots (Clontech) „Human Multiple Tissue Blot I“ (Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere, Pankreas) und „Human Multiple Tissue Blot II“ (Milz, Thymus, Prostata, Testis, Ovar, Dünndarm, Dickdarm, periphere Leukozyten), die mit je 2 µg PolyA<sup>+</sup>-RNA beladen waren, untersucht. Als Sonde für die Hybridisierung diente ein 1054 bp *hGCNF*-Fragment (nt 519 bis nt 1572), das der Scharnier- und Ligandenbindungsdomäne (PCR mit Oligonukleotid 2891 und 2869) entsprach, sowie als interner Standard eine humane *Cyclophilin*-Sonde (Haendler *et al.*, 1987). Es zeigte sich, daß im Testis zwei Transkripte gleicher Intensität mit 8 kb und 2,2 kb Länge nachgewiesen werden konnten, während in allen anderen Geweben bis auf das Ovar, das im Gegensatz zur Maus keine *GCNF*-Expression zeigte, nur Transkripte mit 8 kb Länge gefunden wurden (siehe Abb. 10). Die übrigen Banden traten durch die gleichzeitige Hybridisierung mit der *Cyclophilin*-Sonde auf (Haendler *et al.*, 1987). Die Expression der Transkripte wurde durch Messung der Signalstärke mit dem PhosphorImager (Molecular Dynamics) quantifiziert. Zur Bestimmung der relativen Signale wurden die Signalstärken der einzelnen Organe anhand der *Cyclophilin*signale normalisiert. Für die quantitative Auswertung wurden die normalisierten Signale der beiden *hGCNF*-Transkripte des Testis addiert und mit dem Signal des 8 kb-Transkriptes der anderen Gewebe in Relation gesetzt. Die mit Abstand stärkste Expression von *hGCNF* zeigte sich im Testis (gleich 100% gesetzt), während in der Plazenta nur 4,3 %, im Dickdarm 4,0 %, im Pankreas 3,5 % und in den anderen Geweben ca. 2,0 % der Testis-Expression gefunden wurde.

A:



B

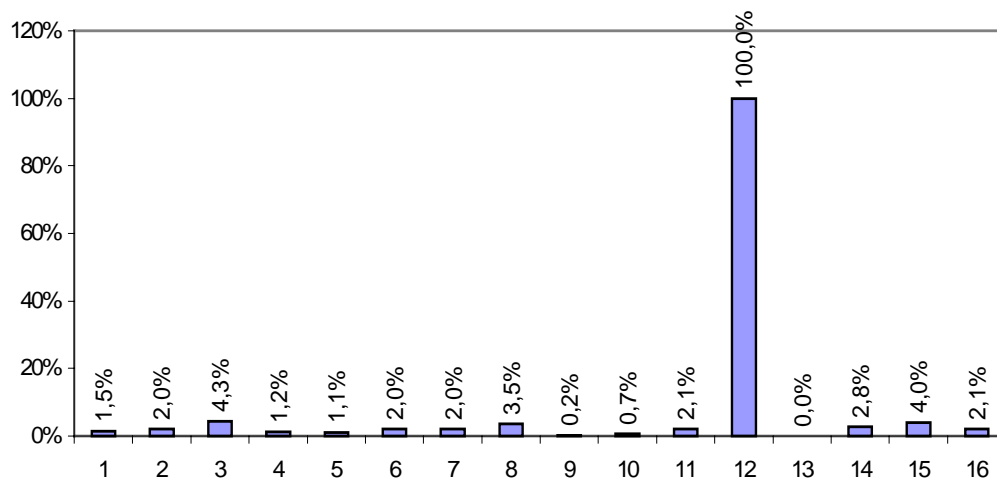


Abb. 10: **Genexpression von *hGCNF* in verschiedenen humanen Geweben.** A: MTN-Blots (Clontech) wurden mit einer *hGCNF*-Sonde hybridisiert. Zur Normalisierung wurden die Blots mit einer *Cyclophilin*-Sonde hybridisiert. Die *hGCNF*-spezifischen Signale sind jeweils mit einem Pfeil markiert. B: Die Expression der Haupttranskripte von *hGCNF* wurde mit dem PhosphorImager quantifiziert und zur Expression von *Cyclophilin* in Relation gesetzt. Dabei wurde die Expression von *hGCNF* gleich 100% gesetzt.

## 4.2.2 Lokalisierung von GCNF im Testis verschiedener Spezies

Die Northern-Blot-Analyse hatte gezeigt, daß *hGCNF*-mRNA hauptsächlich im Testis exprimiert wird. Für die Maus war durch *in situ* Hybridisierungen die Expression von *mGCNF*-mRNA in runden Spermatozoen gezeigt worden (Chen *et al.*, 1994). Da im Testis oftmals der Mechanismus der translationalen Kontrolle zur Regulation der Expression von Proteinen Verwendung findet (Schäfer *et al.*, 1995; Kleene, 1996), läßt sich aus diesen Daten noch nicht eindeutig auf das Vorhandensein von GCNF-Protein in diesen Zellstadien schließen. Um genau zu lokalisieren, von welchen Zellen des Testis GCNF exprimiert wird, sollten immunohistochemische Untersuchungen durchgeführt werden. Dazu sollten *hGCNF*-Fragmente heterolog in *E. coli* exprimiert werden, und diese zur Herstellung von anti-GCNF-Antikörpern verwendet werden. Mit den so gewonnenen Antikörpern sollte dann GCNF in Testis-Gewebeschnitten verschiedener Spezies nachgewiesen werden.

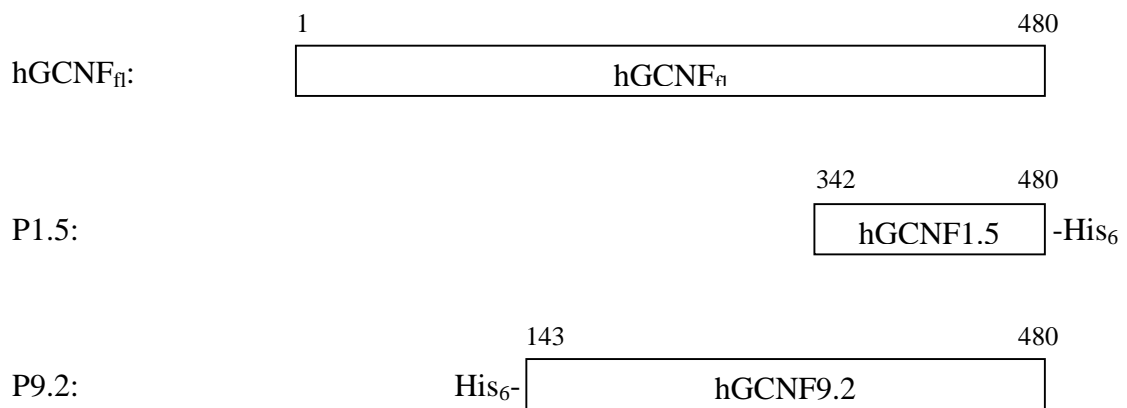
### 4.2.2.1 Expression und Reinigung von hGCNF-His<sub>6</sub> Fragmenten

Zwei Konstrukte für die *E. coli*-Expression von hGCNF-His<sub>6</sub> mit jeweils einem 139 As langen C-terminalen hGCNF-Fragment mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag (P1.5) und einem 338 As langen C-terminalen hGCNF-Fragment mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag (P9.2) wurden erstellt. Das kürzere Konstrukt p1.5 wurde durch PCR-Amplifikation (Oligo #3106 und #3107) eines *hGCNF*-Fragments von Nukleotid 1181 bis 1597 unter Einfügen der Restriktionsschnittstellen *SphI/BamHI* und der sechs C-terminalen Histidine und anschließender Klonierung in den Vektor pUC19 generiert. Das längere hGCNF-Fragment von Nukleotid 584 bis 1597, welches annähernd den gesamten ligandenbindenden Bereich von hGCNF umfaßt, wurde durch PCR-Amplifikation (Oligo #3112 und #3113) erzeugt und über die so eingeführten Restriktionsschnittstellen *SphI/HindIII* in den Vektor pQE31 (Qiagen) kloniert. Das entstandene Plasmid wurde als p9.2 bezeichnet. Beide hGCNF-Fragmente sind durch die Klonierung bedingt N-terminal an 9 Aminosäuren des *lacZ*-Gens aus der *Multiple Cloning Site* fusioniert. Als Matrize für die PCR-Amplifikation diente jeweils die cDNA Klon#5. Beide Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

Die Expression der beiden GCNF-Proteinfragmente erfolgte im *E. coli*-Stamm BL20. Da dieser nicht den *lac*-Repressor exprimiert, mußte die Expression nicht durch IPTG induziert werden.

Die Analyse der Totalextrakte durch SDS-PAGE zeigte im Vergleich zur Negativkontrolle bei p1.5 eine prädominante Bande bei ca. 19 kDa und bei p9.2 eine prädominante Bande bei ca. 45 kDa (siehe Abb. 11). Als negative Kontrolle wurden Totalextrakte nicht transformierter BL20-Zellen aufgetragen.

**A:**



**B:**

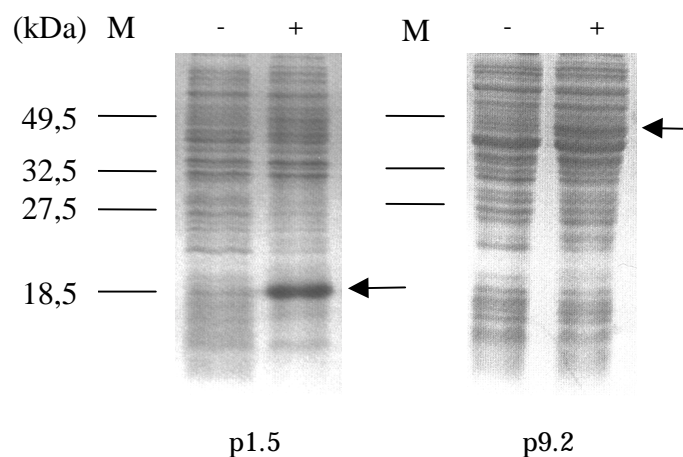


Abb. 11: **Expression von hGCNF-His<sub>6</sub>-Fragmenten.** A: Schematische Darstellung der Proteinfragmente für die *E.coli*-Expression. Zum Vergleich wurde hGCNF<sub>ri</sub> dargestellt. Als Ausgangsvektor diente pUC19. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an. B: Bakterientotallysate wurden aus mit p1.5 und p9.2 transformierten und nicht transformierten BL20-Zellen hergestellt. Die Lysate wurden auf einem 12,5 % igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt. (-) = nicht transformiert, (+) = transformiert. Die Pfeile zeigen die Banden der exprimierten hGCNF-Fragmente an. (M) = Marker

Um sauberes Antigen für die Immunisierung zu erhalten, wurden die hGCNF-Fragmente unter denaturierenden Bedingungen (Guanidiniumhydrochlorid) an NiNTA-Säulen (Qiagen) aufgereinigt. Das 139-Aminosäuren- (P1.5) und das 338-Aminosäuren- (P9.2) Fragment lagen nach der Aufreinigung sauber vor (siehe Abb. 12). Nach der Auftrennung im SDS-PAA-Gel wurden beide exprimierten hGCNF-Fragmente N-terminal ansequenziert (durchgeführt von Norbert Otto). Die ermittelten Sequenzen entsprachen den erwarteten Proteinsequenzen.

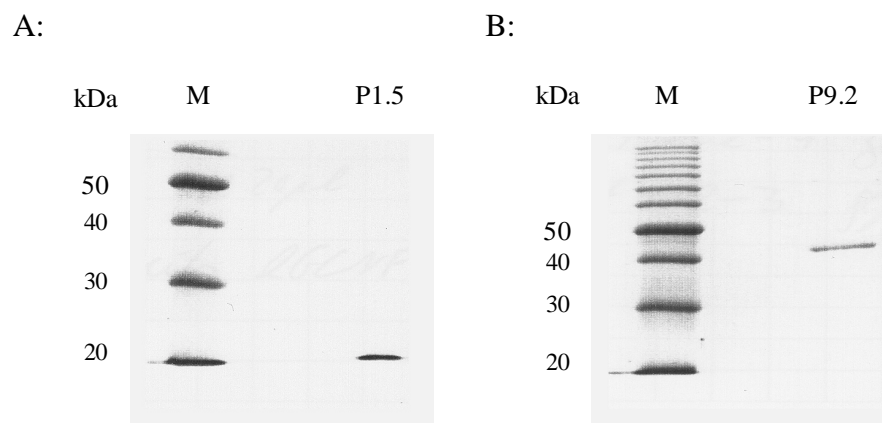


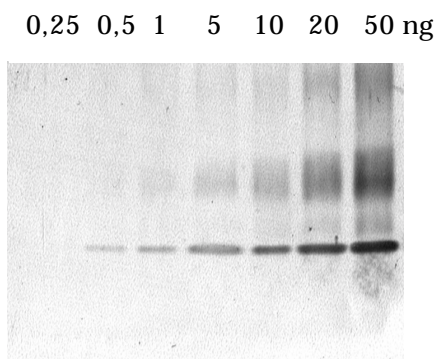
Abb. 12: **Reinigung der exprimierten hGCNF-His<sub>6</sub>-Fragmente an Ni-NTA-Sepharose.** Die exprimierten hGCNF-Fragmente P1.5 (hGCNF-His<sub>6</sub>) (A:) und P9.2 (His<sub>6</sub>-hGCNF) (B:) wurden an Ni-NTA-Sepharose Säulen aufgereinigt und anschließend auf 12,5 %igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt. (M) = Marker

#### 4.2.2.2 Herstellung und Reinigung der hGCNF-spezifischen-Antisera

Die beiden aufgereinigten hGCNF-Fragmente wurden zur zusätzlichen Reinigung durch SDS-PAGE aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und zur Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen pro Fragment verwendet (Firma Eurogentec, Liegé, Belgien). Die Titer der erhaltenen Antisera wurden im ELISA abgeschätzt. Aufgrund der zunächst niedrigen Titer wurden die Tiere insgesamt sieben mal immunisiert. Erste Vorversuche zur immunhistochemischen Lokalisierung von GCNF im Testis hatten keine positiven Ergebnisse gezeigt. Daher wurden die Antisera durch Affinitätschromatographie an den jeweiligen Antigen-beladenen NiNTA-Säulen aufgereinigt (siehe 4.2.2.1). Diese waren durch Bindung

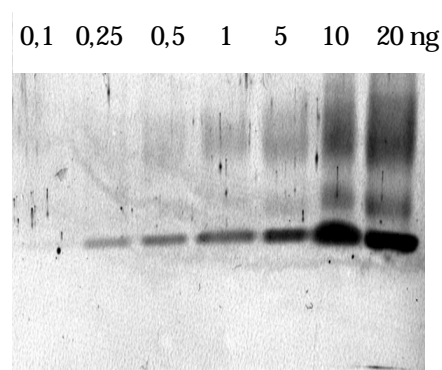
des rekombinanten 338-Aminosäuren-hGCNF-Fragments (P9.2) und des 139-Aminosäuren-hGCNF-Fragments (P1.5) an NiNTA-Sepharose erstellt worden. Die gereinigten Antikörper gegen das kürzere hGCNF-Fragment wurden mit anti-hGCNF-1.5 (1) und anti-hGCNF-1.5 (2), die Antikörper gegen das längere Fragment wurden mit anti-RGCNF-9.2 (1) und (2) benannt. Die Antikörper-Präparationen hatten eine Antikörperkonzentration von ca. 2-10 µg/ml. Zur Abschätzung der Qualität der gereinigten Seren wurden sie im Westernblot getestet. Anhand von Verdünnungsreihen des Antigens P9.2 konnte gezeigt werden, daß anti-hGCNF (1) bei einer effektiven Konzentration von ca. 50 ng/ml noch 0,5 ng Antigen detektiert. Mit anti-RGCNF9.2 (2) (ca. 40 ng/ml) ließen sich sogar noch Proteinmengen bis zu 0,1 ng nachweisen (siehe Abb. 13).

A:



anti-hGCNF-1.5-(1)

B:



anti-hGCNF-9.2-(1)

Abb. 13: **Nachweis der hGCNF Antigene mit den aufgereinigten anti-hGCNF Antikörpern.** A: Verdünnungsreihe des exprimierten hGCNF-Fragmentes P9.2 und Detektion mit dem Antikörper anti-hGCNF-1.5-(1). Steigende Mengen P9.2 wurden auf einem 12,5 %igem SDS-PAA-Gel separiert und mit ca. 50 ng/ml anti-hGCNF-1.5-(1) Antikörper nachgewiesen. B: Verdünnungsreihe des exprimierten hGCNF-Fragmentes P9.2 und Detektion mit dem Antikörper anti-hGCNF-9.2-(1). Steigende Mengen P9.2-Protein wurden auf einem 12,5 %igem SDS-PAA-Gel separiert und mit ca. 40 ng/ml anti-hGCNF-9.2-(1)-Antikörper nachgewiesen.



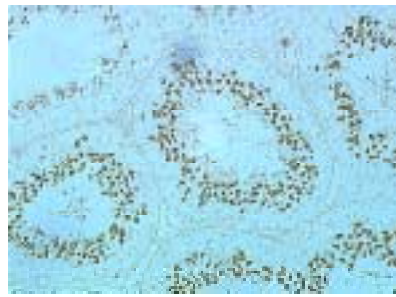
### 4.2.2.3 Immunhistochemische Lokalisation von GCNF

Zur Lokalisation von GCNF im Testis verschiedener Spezies wurden Paraffin-Gewebeschnitte (2-4 µm) vom Menschen, Affen, Hund und Maus mit den aufgereinigten Antiseren gegen das lange und kurze hGCNF-Fragment (siehe 4.2.2.2) angefärbt. Als negativ Kontrolle dienten ProteinA-gereinigte Kaninchen-IgGs bzw. aufgereinigte anti-ZPC-IgGs (Dr. U.Eberspächer, Schering AG), als positiv Kontrolle wurden anti-CRISP Antiseren (Dr. U.Eberspächer, Schering AG) verwendet. Wie in Abb. 14 zu sehen ist, ließen sich beim Hund spezifisch postmeiotische runde Spermatozoen in ca. einem von fünf Tubuli anfärben, was für eine zeitlich eng begrenzte Expression spricht. Die Färbung war in extranukleären Strukturen lokalisiert, die dem proakrosomalen Bläschen entsprechen. Beim Affen und Menschen (siehe Abb. 15) konnte in nahezu allen Tubuli eine deutliche Färbung von postmeiotischen runden und elongierten Spermatozoen gezeigt werden und eine schwache Färbung von einigen reifen Spermien. Die Färbung war ebenfalls hauptsächlich an den Rändern der proakrosomalen Bläschen lokalisiert. Ohne die Gegenfärbung mit Hämatoxylin ließ sich zusätzlich auch Färbung von einigen Nuklei zeigen, die vorher durch die Gegenfärbung verdeckt wurde. Bei der Maus konnten die Restkörperchen von sich differenzierenden Spermatozoen angefärbt werden und ohne Gegenfärbung erkennbar auch proakrosomale Bläschen. Die Signale waren aber deutlich schwächer als bei den anderen Spezies. Die negativen Kontrollen zeigten bei allen Spezies keine bzw. ganz schwache Hintergrundfärbung, während die positiv Kontrolle sehr deutliche Signale in den Nuklei der runden Spermatozoen zeigten. Insgesamt konnten bei allen Spezies mit den anti-GCNF-Antiseren postmeiotische Keimzellen angefärbt werden, mit leicht unterschiedlicher Intensität und Verteilung über die Stadien der Spermio-genese.

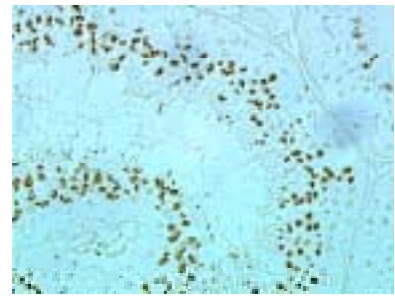
Desweiteren wurden Organe vom Affen untersucht, die beim Menschen *GCNF*-mRNA-Expression von bis zu ca. 5 % des testikulären Levels gezeigt hatten. Weder in der Schilddrüse, der Bauchspeicheldrüse, noch der Prostata konnten spezifische Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



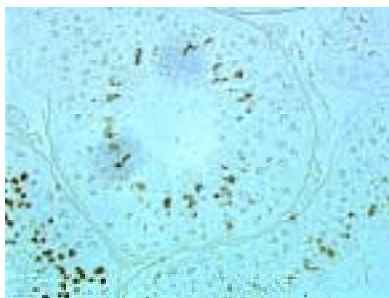
Affe/anti GCNF/ohne



Affe/anti GCNF/ohne



Affe/anti GCNF/ohne



Affe/anti GCNF/ohne



Affe/anti GCNF/ohne



Hund/anti GCNF/ohne



Hund/anti GCNF/ohne

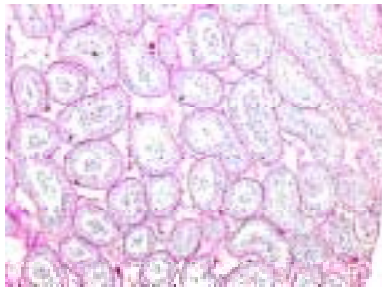


Hund/anti GCNF/ohne

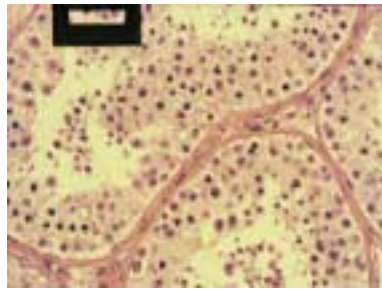


Hund/neg. Kontrolle/ohne

Abb. 14: **Immunhistochemische Lokalisation von GCNF im Testis.** GCNF wurde in Testis-Paraffin-Gewebeschnitten (2-4  $\mu$ m) vom Affen und Hund mittels affinitätsgereinigter anti-hGCNF Antikörper detektiert. Zur besseren Erkennung der spezifischen Signale wurden einige Schnitte nicht gegengefärbt. Als negativ Kontrolle dienten gereinigte anti-ZPC-Antikörper. HE=Gegenfärbung mit Hämatoxylin, ohne= ohne Gegenfärbung



Mensch/HE



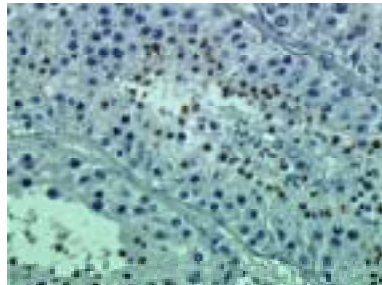
Maus/HE



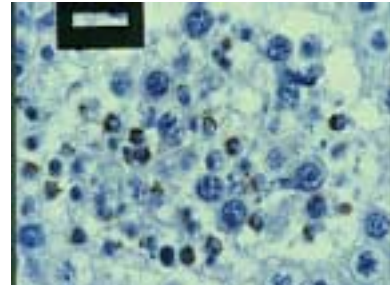
Mensch/anti GCNF/ohne



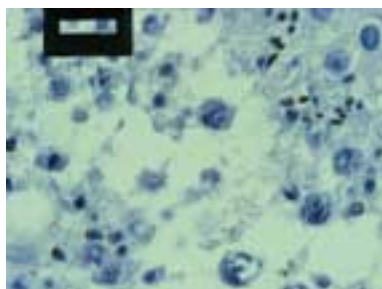
Mensch/anti GCNF/ohne



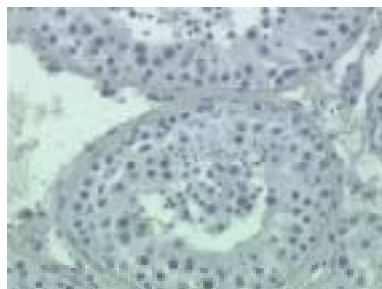
Mensch/anti GCNF/HE



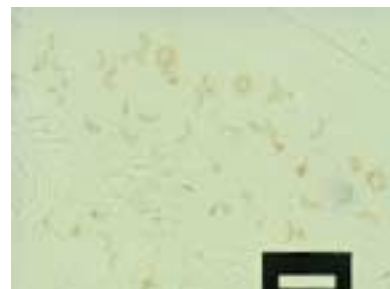
Mensch/anti GCNF/HE



Mensch/anti GCNF/HE



Mensch/neg.Kontrolle/HE



Maus/anti GCNF/ohne

Abb. 15: **Immunhistochemische Lokalisation von GCNF im Testis.** GCNF wurde in Testis-Paraffin-Gewebeschnitten (2-4  $\mu\text{m}$ ) vom Menschen, Affen, Hund und Maus mittels affinitätsgereinigter anti-hGCNF Antikörper detektiert. Zur besseren Erkennung der spezifischen Signale wurden einige Schnitte nicht gegengefärbt. Als negativ Kontrolle dienten gereinigte anti-ZPC-Antikörper. HE=Gegenfärbung mit Hämatoxylin, ohne= ohne Gegenfärbung

### 4.2.3 Intrazelluläre Lokalisation von hGCNF

Aufgrund der Ergebnisse aus den Experimenten zur immunhistochemischen Lokalisierung von GCNF im Testis (prädominant extranukleäre Signale) sollte untersucht werden, in welchem zellulären Kompartiment GCNF ohne Ligand nach Expression in HeLa-Zellen lokalisiert ist. Dazu wurde zum einen direkt die Lokalisation des Fusionsproteins aus dem grün fluoreszierendem Protein (GFP) und hGCNF anhand von Fluoreszenzmikroskopie untersucht, zum anderen wurde wildtyp hGCNF ohne Fusionsanteil exprimiert und durch immunhistochemischen Nachweis an fixierten Zellen lokalisiert. Das „Green Fluorescence Protein“ (GFP) aus *Aequorea victoria* und dessen Mutanten sind erfolgreich als Lokalisationsmarker in tierischen Zellen verwendet worden (Chalfie *et al.*, 1994). Im Folgenden wurde die fluoreszenzoptimierte Mutante EGFP (Cormack *et al.*, 1996) der Firma Clontech verwendet.

#### 4.2.3.1 Lokalisation von hGCNF-EGFP

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von hGCNF wurde ein Konstrukt hergestellt (p14), das für ein Fusionsprotein aus EGFP und hGCNF kodiert. Dazu wurde durch PCR-Amplifikation (Oligonukleotid #3125 und #3118) ein vollständiges *hGCNF*-cDNA-Fragment erzeugt und über die eingeführten Schnittstellen *HindIII/XhoI* in den EGFP-tragenden Vektor pEGFP-C1 (Clontech) (*HindIII/SalI*) an das 3'-Ende im Leseraster fusioniert. Als Matrize wurde das Plasmid pYEP-hGCNF5(AT) verwendet, das die im 5'-Bereich modifizierte, bei gleicher kodierenden Aminosäuresequenz, GC-ärmere hGCNF Variante (siehe Abb. 16) enthält (Dr. M.Husemann, Schering AG). Das Fusionsprotein wurde transient in HeLa-Zellen exprimiert und die Verteilung des Proteins mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie in der lebenden Zelle analysiert. Als Kontrollen wurden EGFP (pEGFP-C1) und das Fusionsprotein aus EGFP und dem humanen Östrogen-Rezeptor EGFP-hER (pGFP-ER(46)) verwendet.

M E R D E P P P

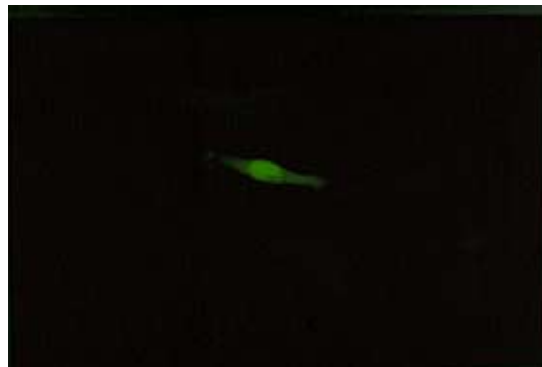
5'- ... ATG GAG CGT GAT GAA CCT CCA CCT AGT GGA GGT GGA GGT GGT GGT GGA  
TCA GCT GGA TTT CTA GAA CCT CCA GCT GCA CTT CCA CCT CCA CCT AGG aac ggt  
ttc tgt cag gat gaa ... -3'

Abb. 16: Nukleotidsequenz des 5'-Bereichs der kodierenden hGCNF(AT)-Sequenz von **Aminosäurenposition 1 an**. Der fett gedruckte Bereich (96 Nukleotide) entspricht der synthetischen hGCNF-Sequenz, die bei gleicher Aminosäuresequenz GC-ärmer ist als die ursprünglich klonierte *hGCNF*-cDNA. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist für die ersten acht Aminosäuren wiedergegeben.

In Abb. 17 sind exemplarisch die Ergebnisse von den transfizierten Zellen dargestellt. Das Kontrollprotein EGFP-hER zeigte eine beinahe ausschließliche Grün-Fluoreszenz im Zellkern. Im Gegensatz dazu war die Grün-Fluoreszenz in EGFP-transfizierten Zellen homogen über das Zytoplasma und den Zellkern verteilt. Dies ist auch für CHO-K1-Zellen beschrieben worden (Rizutto *et al.*, 1995). Die Expression des EGFP-hGCNF Fusionsproteins führte zu einer deutlichen grünen Fluoreszenz des Nukleus (wie durch die DAPI-Kernfärbung zu erkennen ist) und einer leichten Färbung des Zytoplasmas. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß hGCNF zum größten Teil im Zellkern lokalisiert ist und sich nur wenig Protein im Zytoplasma befindet. Die nukleäre Lokalisation von EGFP-hGCNF ist daher auf den Einfluß von hGCNF zurückzuführen.



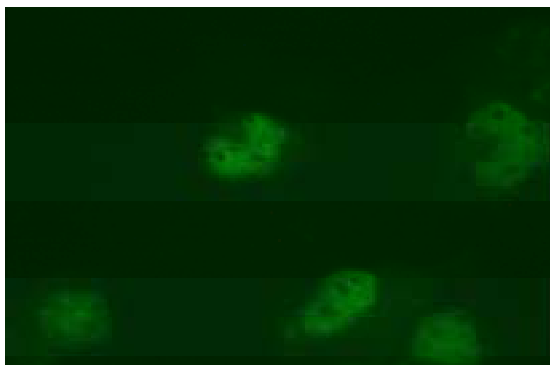
a) EGFP



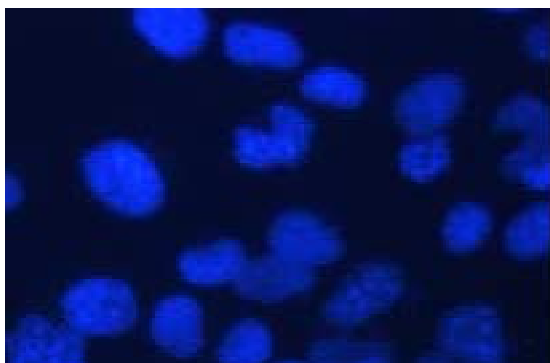
b) hGCNF-EGFP



c) hGCNF-EGFP



d) hGCNF-EGFP



e) DAPI

Abb. 17: **Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von hGCNF durch hGCNF-EGFP Fusionsprotein.** In HeLa-Zellen wurde hGCNF-EGFP Fusionsprotein b,c,d,e) oder EGFP a) exprimiert. Lebende Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die selben Zellen wie in d) wurden mit DAPI gefärbt und die Fluoreszenz mit den entsprechenden Filtern detektiert. Die Aufnahmen d) und e) wurden von Dr. A.Cooney (Houston) erstellt.

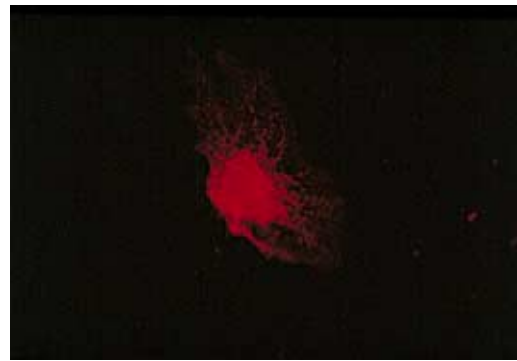
#### 4.2.3.2 Lokalisation von hGCNF durch Immunhistochemie

Um die Ergebnisse zur Lokalisation des Fusionsproteins EGFP-hGCNF (siehe 4.2.3.1) im Zellkern zu bestätigen und zusätzlich die Funktionalität der gereinigten anti-hGCNF-Antikörper nachzuweisen, wurde hGCNF in HeLa Zellen exprimiert und durch Immunhistochemie lokalisiert. Dazu wurden zwei hGCNF kodierende Expressionsplasmide erstellt, indem durch PCR-Amplifikation (Oligonukleotid #3126 und #3118) mit pYEP-hGCNF5(AT) als Matrize *hGCNF*-Fragmente amplifiziert wurden, die über die eingeführten Schnittstellen *NheI/XhoI* in die Vektoren pSI (p15a) und pCI (p15b) der Firma Promega eingefügt wurden. Mit diesen Konstrukten transfizierte HeLa-Zellen wurden fixiert und mit gereinigten anti-hGCNF-Antikörpern und als Negativkontrolle mit anti-ZPC-Antiserum (Dr. Eberspächer, Schering AG) inkubiert. Zur Detektion wurde ein sekundärer Cy3-markierter anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova) verwendet, wodurch sich die Lokalisation durch Rot-Fluoreszenz am Fluoreszenzmikroskop analysieren ließ. Wie in der Abb. 18 exemplarisch zu sehen ist, zeigten nicht transfizierte Zellen ein sehr schwaches Hintergrundsignal, während die transfizierten Zellen eine spezifische, zellkernassoziierte Rot-Fluoreszenz zeigten. Außerdem zeigte sich vereinzelt auch an peri-nukleären Strukturen Färbung, die wahrscheinlich dem Endoplasmatischen Retikulum zuzuordnen ist. Das anti-ZPC-Antiserum führte nur zu einer schwachen zytoplasmatischen Färbung. Dieses Ergebnis bestätigt die Daten der nukleären Lokalisation von EGFP-hGCNF (siehe 4.2.3.1) und unterstreicht weiterhin die Verwendbarkeit der gereinigten anti-hGCNF-Antikörper für die Immunhistochemie.

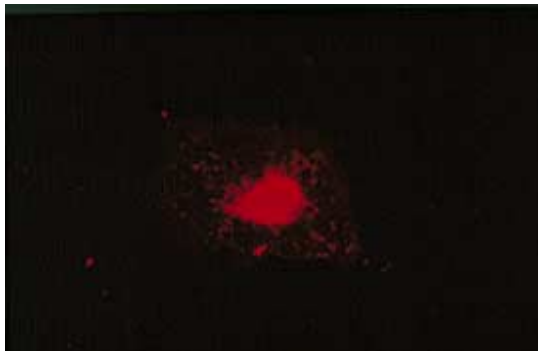
Zusammenfassend haben die Experimente zur Lokalisation von hGCNF gezeigt, daß sowohl EGFP-hGCNF als auch Wildtyp-hGCNF in den Zellkern transloziert werden.



a: neg. Kontrolle



b: anti GCNF



c: anti GCNF

Abb. 18: **Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von hGCNF durch Immunhistochemie.** Vollständiges hGCNF wurde in HeLa-Zellen exprimiert und mit anti-GCNF-Antikörpern nachgewiesen. Die Signale des Fluoreszenzfarbstoff markierten zweiten Antikörpers wurde im Fluoreszenzmikroskop detektiert. Als negativ Kontrolle diente ein gereinigter anti-ZPC Antikörper.

### 4.3 Untersuchungen zur Funktion von hGCNF

#### 4.3.1 Einfluß von hGCNF auf die Lebensfähigkeit von Zellen

Bei den Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von EGFP-hGCNF (siehe 3.2.4.1) war beobachtet worden, daß die stark EGFP-hGCNF exprimierenden Zellen (stark grün fluoreszierend) anscheinend früher abstarben als wenig oder nicht EGFP-hGCNF exprimierende Zellen. Um einen möglichen Einfluß von hGCNF auf die Lebensfähigkeit von Zellen zu untersuchen, wurden BHK-Zellen mit EGFP-Plasmid als Reporter und steigenden



Mengen hGCNF<sub>fl</sub>-Konstrukt kotransfiziert. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen wurde nach 24 h bestimmt. Wie aus der Abb. 19 ersichtlich ist, zeigte sich kein nennenswerter Einfluß der hGCNF-Expression auf die Anzahl der EGFP exprimierenden Zellen.

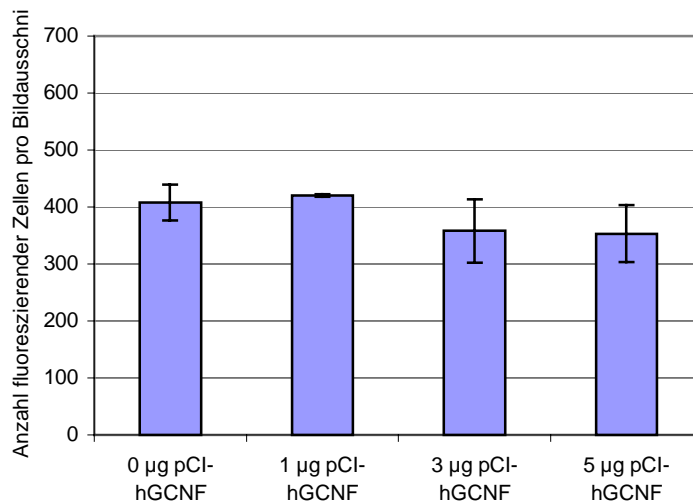


Abb. 19: **Einfluß von hGCNF auf die Lebensfähigkeit von Zellen.** BHK-Zellen wurden mit pEGFP-C1 und steigenden Mengen hGCNF<sub>fl</sub>-Konstrukten kotransfiziert. Die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen wurde nach 24 h durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

#### 4.3.2 Einfluß von hGCNF auf Reporteragenaktivität

Die Sequenzanalyse der aus der cDNA abgeleiteten hGCNF-Proteinsequenz hatte ergeben, daß GCNF zur Familie der Kernrezeptoren gehört, welche durch Bindung an spezifische DNA-Bereiche die Transkription von Zielgenen regulieren. In der Arbeitsgruppe von Borgmeyer konnte gezeigt werden, daß hGCNF, wie auch mGCNF, an DR0-Elemente und in schwächerem Ausmaß auch an SF-1 „*Extended Halfsites*“ bindet (Borgmeyer, 1997). Um erste Aussagen über die Funktion von hGCNF machen zu können, sollte im Transaktivierungsassay die Fähigkeit von hGCNF untersucht werden, ein Reportergen zu regulieren. Dazu wurden zwei Modelle verwendet. Zum einen sollte der Einfluß vom Fusionsprotein Gal<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>LBD</sub> auf das Reportergen *Gal<sub>RE</sub>-TK-Luc* zum anderen der Einfluß von hGCNF<sub>fl</sub> auf das Reportergen

*DR0<sub>2</sub>-TK-Luc* untersucht werden. Durch Verwendung des Gal<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>LBD</sub> Fusionsproteins sollten mögliche unspezifische Effekte von hGCNF durch zufällige Bindung an DR0-Elemente im Genom der Wirtszelle ausgeschlossen werden. Die Daten sollten nachfolgend durch Verwendung von Reporterplasmiden mit dem natürlichen DR0-Element verifiziert werden.

#### 4.3.2.1 Kotransfektion von Gal<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>DE</sub> und Gal<sub>RE</sub>-TK-Luc

Der Einfluß von Gal<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>DE</sub> auf die Reporteragenaktivität von *Gal<sub>RE</sub>-TK-Luc*-Plasmiden wurde mit einem dualen Transaktivierungsassay durch Kotransfektion von BHK-Zellen und P19-Zellen mit dem Expressionsplasmid und dem Reporterplasmid untersucht. P19-Zellen exprimieren nach Stimulation mit Retinsäure endogenen GCNF (Heinzer *et al.*, (1998)). Diese Zelllinie sollte daher alle nötigen Kofaktoren, die für die Funktion von GCNF benötigt werden, exprimieren. Um unspezifische Effekte ausschließen zu können, wurde zusätzlich mit einem Konstrukt (pSV40), das konstitutiv *Renilla*-Luziferase exprimiert, kotransfiziert und gegen die gemessene *Renilla*-Luziferase-Aktivität normiert. Zur Erstellung des Expressionsplasmids (p11) wurde der Scharnier- und Ligandenbindungsbereich von *hGCNF* durch PCR amplifiziert (Oligonukleotid #3117 und #3118) und über die eingeführten Restriktionsschnittstellen *EcoRI/XhoI* unter Beibehaltung des Leserasters an das 3'-Ende von *Gal<sub>DBD</sub>* (Vektor *pCMX-Gal<sub>DBD</sub>*) fusioniert. Als Reporteragen wurde ein Konstrukt verwendet, das drei Kopien des Gal-Elements (17mer) mit dem Thymidin-Kinase Promotor (-105/+51) vor dem Luziferase-Gen trägt (*pGal-TK-Luc*). Wie in der Abb. 20 zu erkennen ist, exprimiert das Reporterkonstrukt eine basale Luziferaseaktivität. Durch Kotransfektion mit steigenden Mengen Gal<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>DE</sub>-kodierendem Plasmid (Konstrukt p11) (20, 40, 80, 120 ng) zeigte sich eine konzentrationsabhängige Repression der Reporteragenaktivität auf ca. 35 % des basalen Wertes. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit BHK-Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).

In diesem Modell funktioniert hGCNF ohne das Vorhandensein eines möglichen Liganden als Repressor der Reporteragenaktivität.

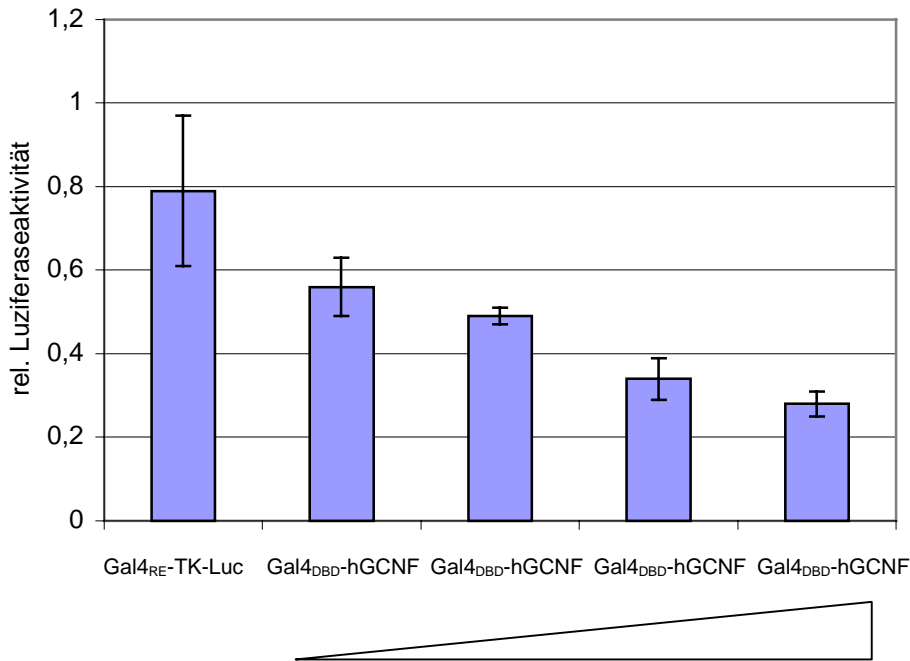


Abb. 20: **Einfluß von Gal4<sub>DBD</sub>-hGCNF auf die Reporteragenaktivität.** P19-Zellen wurden mit steigenden Mengen Gal4<sub>DBD</sub>-hGCNF-Plasmid (20, 40, 80, 120 ng) und jeweils dem Reporterplasmid Gal<sub>RE</sub>-TK-Luc kotransfiziert. Gemessen wurde die *Firefly*-Luziferaseaktivität. Diese wurde durch Messung der kotransfizierten konstitutiven *Renilla*-Luziferaseaktivität normiert.

#### 4.3.2.2 Kotransfektion von hGCNF<sub>fl</sub> und DRO-TK-Luc

Zur Bestätigung der Daten aus 4.3.2.1 wurde der Einfluß des Wildtyp-hGCNF kodierenden Expressionsplasmids p15b auf die Reporteragenaktivität von *DRO-TK-Luc* im dualen Transaktivierungsassay durch Kotransfektion von BHK- und P19-Zellen gemessen. Die Daten wurden ebenfalls durch Kotransfektion mit *Renilla*-Luziferase-Konstrukten normiert.

Wie in der Abb. 21 zu sehen ist, zeigt das Reporterplasmid eine basale Expression an Luziferase. Nach Kotransfektion mit steigenden Mengen (6, 9, 12, 15 ng) an Wildtyp-hGCNF (p15b) ist eine dosisabhängige Repression auf ca. 20 % der basalen Reporteragenaktivität zu erkennen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit BHK-Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wurden die Daten aus 4.3.2.1 bestätigt. Sowohl vollständiges hGCNF als auch nur das Scharnier-LBD-Fragment wirken als Repressor auf die Expression von Zielgenen.

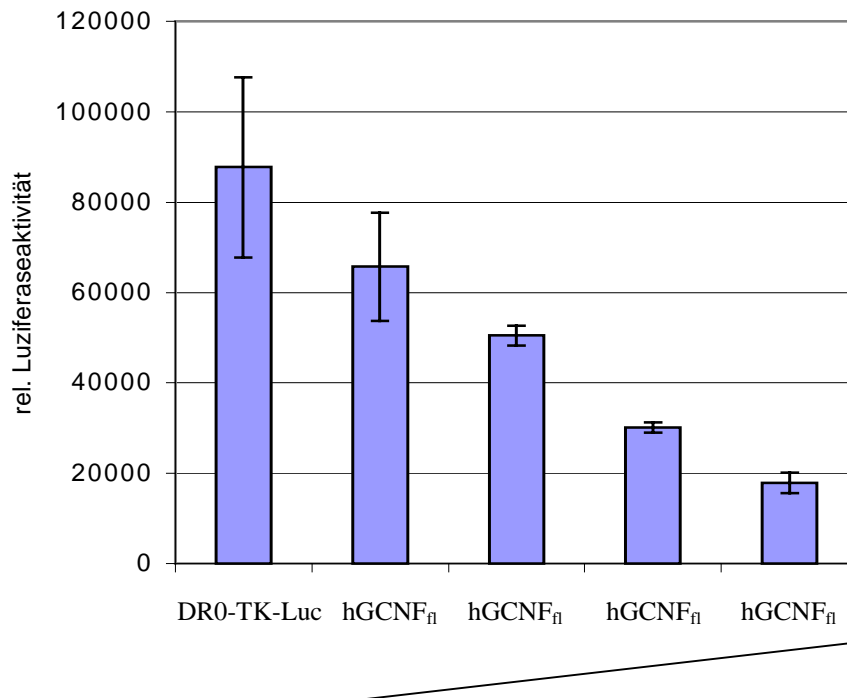


Abb. 21: **Einfluß von Wildtyp-hGCNF auf die Reporterogenaktivität.** P19-Zellen wurden transient mit steigenden Mengen (6, 9, 12, 15 ng) des GCNF<sub>fl</sub>-Konstrukts p15b und dem Reportergen DR0-TK-Luc tragenden Plasmid pDR0-TK-Luc transfiziert. Gemessen wurde die *Firefly*-Luziferaseaktivität. Die Werte wurden durch Messung der kotransfizierten konstitutiven *Renilla*-Luziferaseaktivität normiert.

### 4.3.3 Eingrenzung der Repressordomäne im Transaktivierungsassay

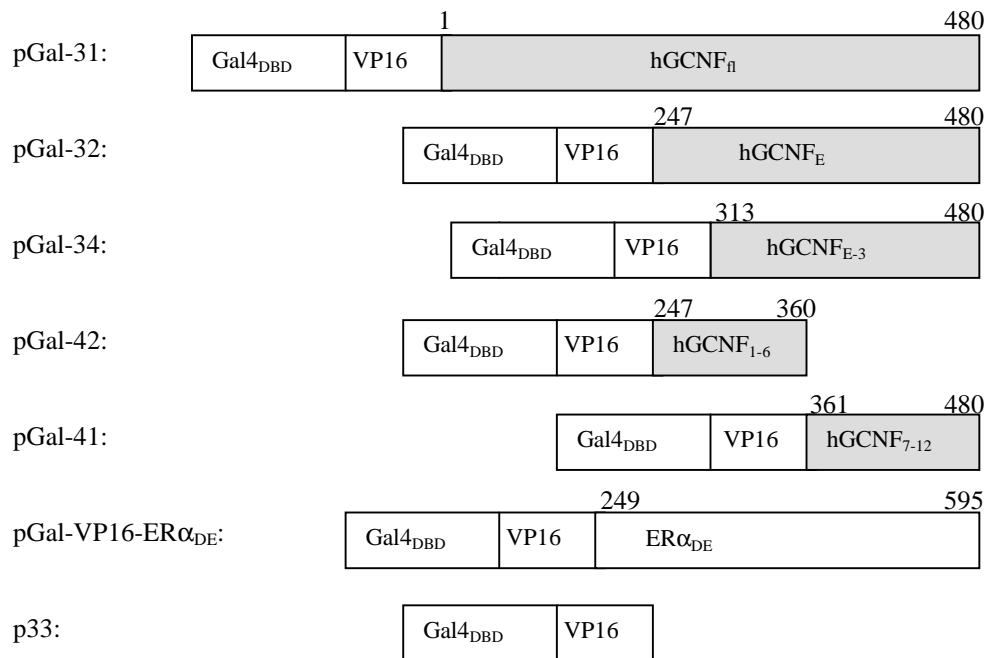
Die im Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Ergebnisse zeigten, daß sowohl Wildtyp-hGCNF als auch das hGCNF<sub>DE</sub>-Fragment in der Lage sind, die Transkription des unter der Kontrolle von Gal4- bzw. DR0-Elementen stehenden Reportergens *Luziferase* zu reprimieren. Um die Repressordomäne von hGCNF einzugrenzen, sollte ein etwas modifizierter Transaktivierungsassay verwendet werden. Bisher wurde die Repression der basalen Promotoraktivität des Thymidin-Promotors gemessen. Nun sollte der Einfluß von hGCNF-Fragment-Fusionen an das Fusionsprotein Gal<sub>DBD</sub>-VP16 bestimmt werden, das ein starker Transaktivator des Reporters *Gal4-TK-Luc* ist. Durch die Fusion eines Kontrollproteins an den C-Terminus sollte die aktivierende Eigenschaft von Gal-VP16 nicht wesentlich beeinflusst werden. Durch die Fusion eines Repressors an Gal-VP16 sollte dessen Transaktivierungsfunktion reprimiert werden.

Als Positivkontrolle wurde ein Gal4<sub>DBD</sub>-VP16 Konstrukt (p33) durch Insertion des Gal4<sub>DBD</sub>-Fragmentes aus pCMX-Gal<sub>DBD</sub> über die *KpnI*-Schnittstelle in den Vektor pCMX-PL2-VP16 erzeugt. Die Negativkontrolle Gal4<sub>DBD</sub>-VP16-ER $\alpha$  wurde durch Insertion des ER $\alpha$ <sub>DE</sub>-Fragmentes aus pCMX-Gal<sub>DBD</sub>-ER $\alpha$ <sub>DE</sub> (Dr.L.Toschi, Schering AG) über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/NheI* in das Konstrukt Gal4<sub>DBD</sub>-VP16 (p33) hergestellt. Basierend auf dem Konstrukt Gal4<sub>DBD</sub>-VP16 (p33) wurden verschiedene Deletionsmutanten von hGCNF im durchgehenden Leseraster an das 3'-Ende von Gal4<sub>DBD</sub>-VP16 fusioniert (siehe Abb. 22). Dazu wurden jeweils durch PCR-Amplifikation *hGCNF*-Fragmente unter Einführung der Schnittstellen *EcoRI/NheI* amplifiziert und in das Konstrukt p33 ligiert. Für die PCR-Amplifizierung und anschließende Klonierung der hGCNF-Fragmente wurden folgende Oligonukleotide verwendet: Konstrukt pGal-31 (#3165,#3166), pGal-32 (#3167,#3166), pGal-34 (#3170,#3166), pGal-42 (#3167,#3176), pGal-41 (#3175,#3166).

Die auf die *Renilla*-Aktivität normierten Ergebnisse des Transaktivierungsassays sind in Abb. 22 dargestellt. Die Positivkontrolle Gal4<sub>DBD</sub>-VP16 zeigte verglichen mit der basalen Reporteraktivität eine 134-fache Aktivierung des Reportergens *Luziferase*. Die Fusion von ER $\alpha$ <sub>DE</sub> an den C-Terminus führte nur zu einer geringen Abnahme der Reporteraktivität. Durch die Fusion von hGCNF<sub>fl</sub> an Gal4<sub>DBD</sub>-VP16 wurde die *Luziferase*aktivität verglichen mit Gal4<sub>DBD</sub>-VP16 auf 41% reprimiert. Dieses Ergebnis bestätigte die unter 4.3.1 beschriebene Repressorfunktion von hGCNF<sub>fl</sub>. Das hGCNF<sub>E</sub>-Fragment führte zu einer Reprimierung der Gal4<sub>DBD</sub>-VP16 Aktivität auf 18 %. Daraus läßt sich ableiten, daß nur die Ligandenbindungsdomäne von hGCNF für die Vermittlung der Repression ausreicht. Durch eine weitere Deletion der ersten drei Helices der LBD blieb die Reporteraktivität mit einem Wert von 14 % wenig verändert. Eine weitere Eingrenzung der hGCNF-Fragmente auf die Bereiche von Helix 1-6 und 7-12 zeigte, daß jeweils eine Repression auf 26 % bzw. 28 % erreicht wurde. Es liegen also mindestens zwei Repressordomänen vor, die im Bereich von Helix 1-6 und 7-12 lokalisiert sind.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Ergebnisse der Transaktivierungsassays gezeigt haben, daß für die Vermittlung der Repression von hGCNF die Ligandenbindungsdomäne ausreicht. Innerhalb dieser liegen möglicherweise zwei Repressordomänen vor, da beide Teilstücke der LBD von Helix 1-6 und 7-12 reprimierend wirken.

A:



B:

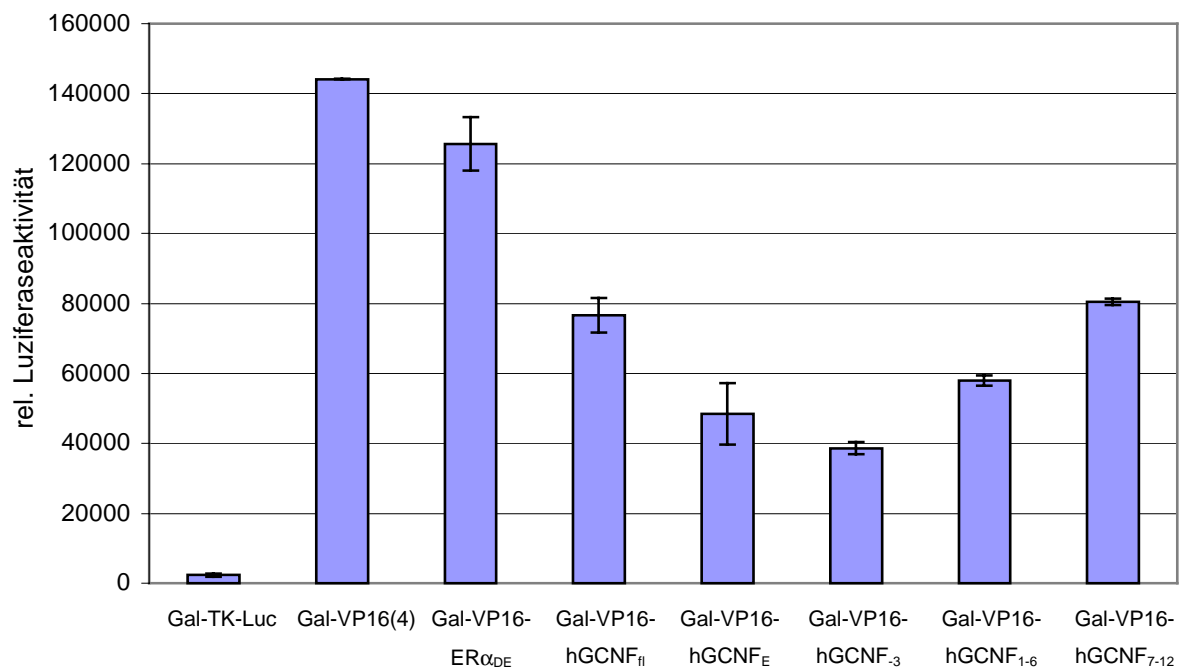


Abb. 22: **Eingrenzung der Repressordomäne von hGCNF im Transaktivierungsassay.** A: Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte. Als Ausgangsvektor wurde p33 verwendet. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an B: BHK-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt Gal<sub>RE</sub>-TK-Luc und verschiedenen Deletionsmutanten von hGCNF fusioniert an Gal4<sub>DBD</sub>-VP16 kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente Gal4<sub>DBD</sub>-VP16-ER $\alpha$ . Die gemessene Luciferaseaktivität wurde anhand der gemessenen Renilla-Luziferaseaktivität normiert.

#### 4.3.4 Einfluß von NCoR auf die Repression von hGCNF

Wie unter 4.3.1 beschrieben wurde, konnte gezeigt werden, daß GCNF reprimierend auf die Genexpression von Gal4- und DR0-Reporterkonstrukten wirkt. Transkriptionelle Repression wird durch die Rekrutierung von Kofaktoren, sogenannten Korepressoren, vermittelt. Die beiden wichtigsten Korepressoren sind der von der Arbeitsgruppe von Rosenfeld beschriebene NCoR (*Nuclear Receptor Co-Repressor*) (Hörlein *et al.*, 1995) und der von der Arbeitsgruppe von Evans beschriebene SMRT (*Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor*) (Chen *et al.*, 1995). Beide interagieren z.B. mit dem nicht-ligandengebundenen Thyroid-Rezeptor, einem Kernrezeptor, der ähnlich wie GCNF ohne Ligand als Repressor wirkt. Für NCoR existierten erste Hinweise, daß er mit GCNF interagieren kann (Cooney persönliche Mitteilung). Um zunächst eine mögliche Beteiligung von NCoR an der Vermittlung der Repression von hGCNF aufzuzeigen, sollte der Einfluß von steigenden Mengen mNCoR auf die Repression von hGCNF im dualen Transaktivierungsassay untersucht werden. Dazu wurden, wie unter 4.3.1 beschrieben, BHK-Zellen mit dem Expressionsplasmid Gal4<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>DE</sub> (p11), dem Reporterplasmid Gal-TK-Luc und zusätzlich steigenden Mengen mNCoR<sub>fl</sub>-Konstrukt kotransfiziert. Zur internen Normierung wurde zusätzlich das konstitutiv Renilla-Luziferase exprimierende Plasmid pSV40 kotransfiziert. Wie in der Abb. 23 dargestellt ist, erfolgte durch Gal4<sub>DBD</sub>-GCNF<sub>DE</sub> alleine eine Repression der basalen Luziferaseaktivität des Reporters auf ca. 68 %. Durch die zusätzliche Kotransfektion von steigenden Mengen (10, 20, 40 ng) mNCoR<sub>fl</sub>-Konstrukt (Dr. H. Beekman, Schering AG) konnte diese Repression auf ca. 38 % der basalen Reporteraktivität verstärkt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß NCoR in der Lage ist, die repressorischen Eigenschaften von GCNF zu vermitteln.

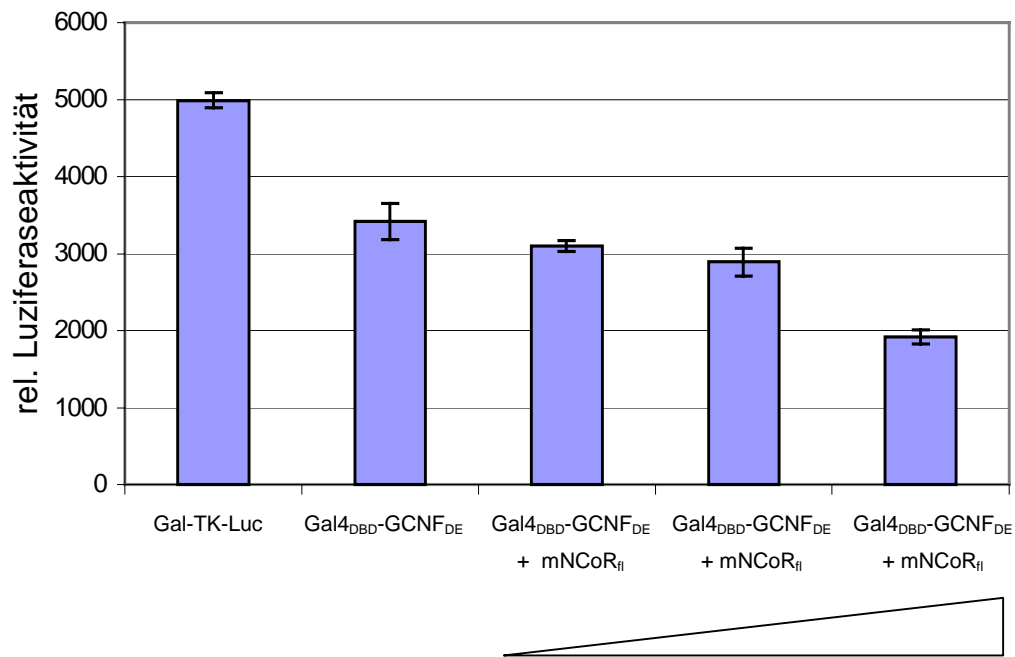


Abb. 23: **Einfluß von mNCoR auf die Repression von hGCNF im Transaktivierungsassay.** BHK-Zellen wurden transient mit dem Reporterplasmid pGal<sub>RE</sub>-TK-Luc und zusätzlich mit Gal<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>DE</sub> und steigenden Mengen (10, 20, 40 ng) mNCoR<sub>fl</sub> kodierenden Plasmiden transfiziert. Die gemessene Luziferaseaktivität wurde anhand von konstitutiv exprimierter *Renilla*-Luziferaseaktivität normalisiert.

Da sowohl hNCoR als auch hSMRT von den entsprechenden Arbeitsgruppen (siehe oben) für weitere Experimente nicht zur Verfügung gestellt wurden, sollten beide nachkloniert werden. Dies gelang nur für die C-terminalen Interaktionsdomänen ID-I und -II von hNCoR (siehe 4.4.1.2). Aus diesem Grund sollte nachfolgend nur die Interaktion von NCoR mit hGCNF untersucht werden.

#### 4.4 Nachweis der Interaktion von GCNF und NCoR

Im Kapitel 3.3 konnte gezeigt werden, daß hGCNF ein transkriptioneller Repressor ist. Zusätzlich konnte durch die Verstärkung der Repression von hGCNF durch Koexpression von mNCoR<sub>fl</sub> ein erster Hinweis dafür erbracht werden, daß NCoR an der Vermittlung der Repression beteiligt ist. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, sollte die Möglichkeit der Interaktion von hGCNF mit NCoR nachgewiesen werden. Dazu sollte die Interaktion *in vivo*



im Hefe- und Säugetierzellen-Zwei-Hybrid System untersucht werden und als unabhängiges System *in vitro* im GST-pull-down Experiment verifiziert werden.

#### 4.4.1 Nachweis der Interaktion im Hefe-Zwei-Hybridssystem

##### 4.4.1.1 Das Prinzip des Hefe Zwei-Hybrid Systems

Das Zwei-Hybrid-System ist ein Testsystem zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen auf der Grundlage des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4 (Fields & Song, 1989). Gal4 reguliert in seiner natürlichen Funktion die Expression von Genen, die für Enzyme des Galaktosidastoffwechsels kodieren. Die Domänenstruktur von Gal4 mit seinen zwei funktionell trennbaren Domänen für die DNA-Bindung (AS 1-147) und für die Aktivierung der Transkription (AS 768-881) ist die Basis des Testsystems und wird bei der Herstellung der Hybridkonstrukte genutzt. Dabei besteht eines der beiden Konstrukte „Köder“ aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal4<sub>DBD</sub>) fusioniert mit einem bekannten Protein X und das zweite Konstrukt aus der Gal4-Transaktivierungsdomäne (Gal4<sub>AD</sub>) fusioniert mit einem Protein Y. In einem Rekonstitutionsexperiment kann in einem Gal<sup>-</sup> Hefestamm mit der Hilfe von Reportergenen (z.B. *his3*, *lacZ*), die unter der Kontrolle des funktionellen Gal4-Transkriptionsfaktors stehen, eine potentielle Interaktion zwischen Protein X und Protein Y über die Aktivität der Reporterprodukte Imidazolglycerolphosphatdehydratase und  $\beta$ -Galaktosidase gemessen werden.

Die Anwendungsmöglichkeiten des Zwei-Hybrid-Systems sind vielfältig. So können Interaktionen zwischen zwei bekannten Proteinen gezielt untersucht werden. Die minimale Interaktionsdomänen zwischen zwei interagierenden Proteinen können durch Deletionskonstrukte kartiert und der Einfluß von Punktmutationen auf die Bindung ermittelt werden. Alternativ kann der Einfluß anderer Faktoren, z.B. die Koexpression anderer Bindungspartner oder die Zugabe von Liganden, auf die Interaktion zweier Proteine untersucht werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet des Systems ist die Isolierung und Identifizierung von neuen unbekannt Proteinen, die mit einem Köderprotein interagieren. Dazu wird eine Gal4<sub>AD</sub>-cDNA-Expressionsbank nach Bindungspartnern des Gal4<sub>DBD</sub>-Köderproteins durchsucht. Hefezellen, in denen es zu einer Interaktion des Köderfusionsproteins mit einem

unbekanntes Protein Z kommt, können über positive Selektion isoliert und die cDNA-Sequenz, die für das Protein Z kodiert, ermittelt werden. Der große Vorteil eines solchen Systems im Vergleich zu anderen Systemen besteht darin, daß die analysierten Interaktionen intrazellulär unter physiologischen Bedingungen stattfinden. Auch schwache Interaktionen können durch die hohe Sensitivität des Assays detektiert werden. Ein Nachteil des Testsystems ist, daß sich nicht alle Proteine als Köder eignen, z.B. wenn sie selbst eine transaktivierende Funktion ausüben oder extrazellulär lokalisiert sind.

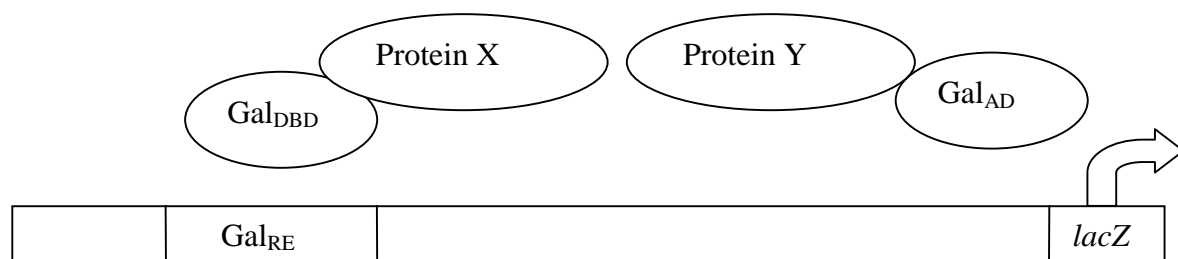


Abb. 24: **Schematische Darstellung des Prinzips des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.** Durch die Interaktion der Proteine X und Y werden die funktionellen Domänen Gal<sub>DBD</sub> und Gal<sub>AD</sub> rekonstituiert. Dadurch kommt es zur Expression des unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors Gal4 stehenden Reportergens *lacZ*.

#### 4.4.1.2 Klonierung von hNCoR<sub>ID-I-II</sub>

Zur Herstellung eines C-terminalen hNCoR-Fragments, das die von Seol *et al.* (1996) beschriebene Interaktionsbereiche ID-I und -II (*nuclear receptor interaction domain I und II*) enthält, wurde eine PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden #3144 und #3145 auf humane Prostata cDNA durchgeführt. Das erhaltene Fragment von 1810 bp Länge wurde über die eingeführten Schnittstellen *Bam*HI/*Sal*I in den Vektor pGAD424 eingeführt und somit an das 3'-Ende der Gal<sub>AD</sub> fusioniert (p21). Anschließend wurde, unter Verwendung der Oligonukleotide #3146-#3156, durch Sequenzierung von Strang und Gegenstrang die Sequenz bestimmt. Der Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz (598 AS) vom bisher nicht publizierten humanen NCoR-Fragmentes mit der entsprechenden Maus-NCoR-Sequenz zeigte eine Identität von 91 %.

mNCoR	KHEAARLEENLRSRSAAVSEQQLEQKNLEVEKRSVQCVCTSSALPSGKAQPHASVVYSE	1918
hNCoR	KHEAARLEENLRSRSAAVSEQQLEQKTLEVEKRSVQCLYTSSAFPSGKQPSSVVYSE *****.*****:****:***.***	
mNCoR	AGKDKGPPPKSRYEELRTRGKTTITAANFIDVITRQIASDKDARERGSQSSDSSSSLS	1978
hNCoR	AGKDKGPPPKSRYEELRTRGKTTITAANFIDVITRQIASDKDARERGSQSSDSSSSLS *****	
mNCoR	SHRYETASDAIEVISPASSPAPPQEKQAYQPDVMKANQAENESTRQYEGPLHHYRSQQE	2038
hNCoR	SHRYETPSDAIEVISPASSPAPPQEKLTQYQPEVVKANQAENDPTRQYEGPLHHYRPQQE *****.*****:*:***:*****:*****.***	
mNCoR	SPSPQQQPPLPSSQSEGMQVPRTHRLITLADHICQIITQDFARNQVPSQAS---TST	2094
hNCoR	SPSPQQQ--LPPSSQAEGMQVPRTHRLITLADHICQIITQDFARNQVSSQTPQPPTST ***** *****:*****.***.***	
mNCoR	FQTSPSALSSTPVRTKTSRYSPEQSQTVLHPRPGPRVSPENLVDKSRGSRPGKSPERS	2154
hNCoR	FQNSPSALVSTPVRTKTSNRYSPEQAQSVHHQRPGSRVSPENLVDKSRGSRPGKSPERS **.* ** ** ** **.*****	
mNCoR	HIPSEPYEPIPPQGPVHEKQDSMLLSQRGVDPAEQRSDSRSPGISISYLPSPFFTKLES	2214
hNCoR	HVSSEPYEPIPPQVPVHEKQDSLILLSQRGAEPAEQRNDARSPGISISYLPSPFFTKLEN *:.***** * .*****:*****:*****.*:*****.*****.	
mNCoR	TSPMVKSKKQEIFRKLNSGGGSDMAAQPGEIFNLPAVTTSGAVSSRSHSFADPASN	2274
hNCoR	TSPMVKSKKQEIFRKLNSGGGSDMAAQPGEIFNLPAVTTSGSVSRGHSFADPASN *****:****.*****	
mNCoR	LGLEDIIRKALMGSFDDKVEDHGVMVSHVPGIMPASSTSVVTSSEARRDEGEPSPHAG-	2333
hNCoR	LGLEDIIRKALMGSFDDKVEDHGVMVSPMGVVPGTANTSVVTSGETRREEGDPSPHSGG *****:***:***.*.*****.*:***:***:***:*	
mNCoR	VCKPKLINKSNRKSRSPIPGQSYLGTTERPSSVSVHSEGDYHRQTPGWAWEDRPSSTGS	2393
hNCoR	VCKPKLISKSNRKSRSPIPGQYLGTERPSSVSVHSEGDYHRQTPGWAWEDRPSSTGS *****.*****.*****	
mNCoR	TQFPYNPLTIRMLSSPTPIACAPSAITQAAPHQQRNIWEREPAPLLSAQYETLSDSDD	2453
hNCoR	TQFPYNPLTMRMLSSPTPIACAPSAVNQAAPHQQRNIWEREPAPLLSAQYETLSDSDD *****:***** *****:*****	

Abb. 25: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz von mNCoR mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der klonierten hNCoR-cDNA-Sequenz. Die Zahlen geben die Position der Aminosäurereste der mNCoR-Sequenz an (Seol *et al.*, 1996). Positionen, die in beiden Sequenzen identisch sind, sind mit „\*“ markiert. Der Interaktionsbereich ID-II reicht von AS 2063-2142, ID-I von AS 2239-2300.

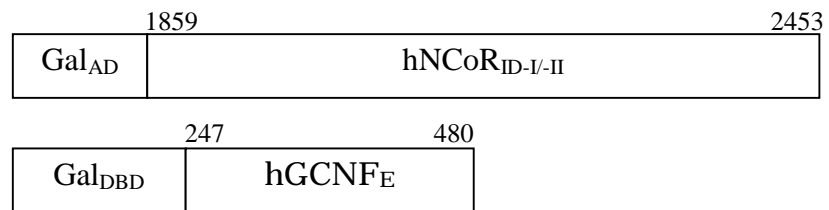
#### 4.4.1.3 Interaktion zwischen hGCNF und hNCoR

Zur Erstellung des Köderkonstruktes Gal4<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>LBD</sub> (pQ1) wurde durch PCR-Amplifikation die Ligandenbindungsdomäne von hGCNF amplifiziert und über die eingeführten Schnittstellen *NdeI/PstI* in den Vektor pAS2 (Clontech) eingebracht (Arbeitsgruppe Dr. M.Husemann, Schering AG). Die Sequenz wurde durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin untersucht. Die Herstellung von Gal4<sub>AD</sub>-hNCoR<sub>ID-I/II</sub> (p22) wurde unter 4.4.1.2 beschrieben.

Zur Untersuchung der Interaktion wurden das Reporteragen *lacZ* tragende Y187 Hefe-Zellen sequentiell mit Gal4<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>LBD</sub>-Konstrukten und Gal4<sub>AD</sub>-hNCoR<sub>ID-I/II</sub>-Konstrukten transformiert. Mit Hilfe eines  $\beta$ -Galaktosidasetests wurde dann die Reporteragenaktivität mehrerer verschiedener Klone gemessen (siehe Abb. 26).

Hefe-Klone, die mit dem Vektor pAS2 und p22 (Gal4<sub>AD</sub>-hNCoR<sub>ID-I/II</sub>) transformiert wurden, zeigten eine sehr geringe Reporteragenaktivität. Im Gegensatz dazu wurde in Klonen, die mit pQ1 (Gal4<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>LBD</sub>) und pGAD transformiert worden waren, eine leichte Hintergrundaktivität des Reporteragens gemessen. Dies ist eventuell auf das Fehlen von Korepressoren in der Hefe zurückzuführen, da ein vergleichbares Konstrukt in Säugerzellen zur Repression der Reporteragenaktivität führte (siehe 4.3.2.1). Nach der Kotransformation von Y187-Zellen mit NCoR- und GCNF-Fusionsproteinen (p22 und pQ1) zeigte sich eine vierfache Induktion der Reporteragenaktivität verglichen mit Klonen, die Gal4<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>LBD</sub> (pQ1) exprimierten. Diese Daten zeigen, daß hNCoR und hGCNF im Hefesystem in der Lage sind zu interagieren.

A:



B:

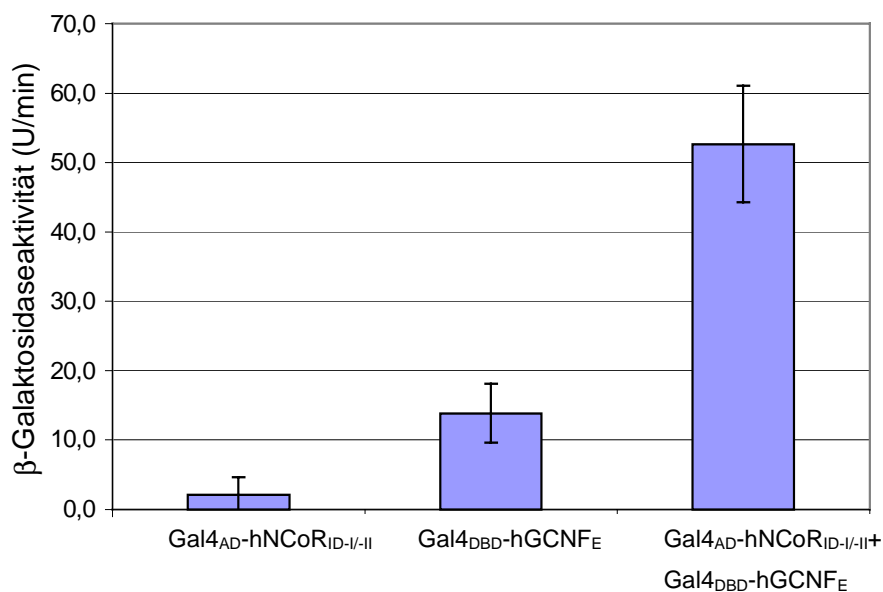


Abb. 26: Nachweis der Interaktion zwischen hNCoR und hGCNF im Hefe Zwei-Hybrid System.

A: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an. Für das hNCoR-Konstrukt sind die entsprechenden Aminosäurepositionen der mNCoR-Sequenz angegeben. B: Mit Gal<sub>DBD</sub>-hGCNF<sub>E</sub>-Konstrukt stabil transformierte Y187 Hefe Zellen wurden zusätzlich mit Gal<sub>AD</sub>-hNCoR<sub>(ID-I/-II)</sub>-Konstrukt transformiert. Die β-Galaktosidaseaktivität des Reportergens *lacZ* wurde im Flüssigttest bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3, 6 bzw. 8 Klonen.

#### 4.4.2 Nachweis der Interaktion von GCNF und NCoR im Säugetier-Zwei-Hybrid-System

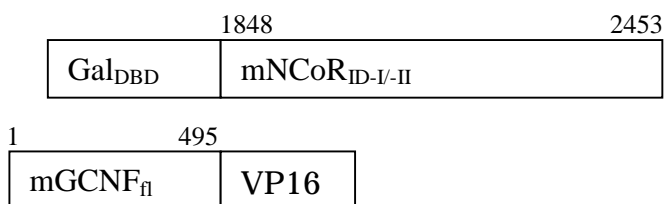
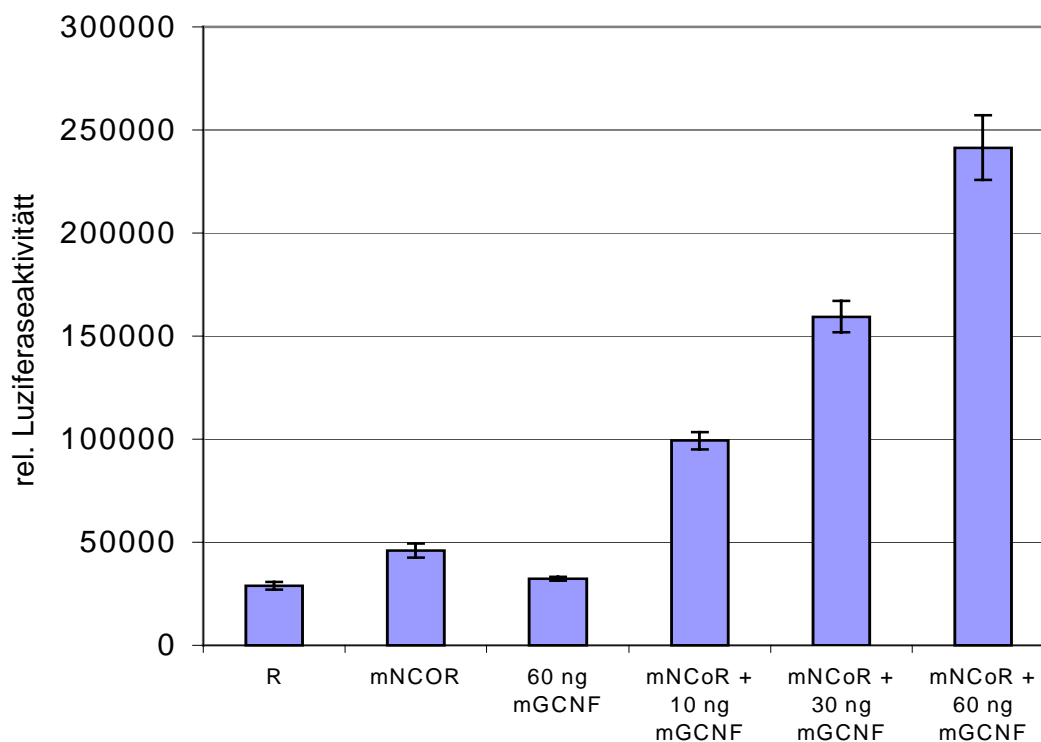
##### 1.1.1.1 Das Prinzip des Säugetier-Zwei-Hybrid-Systems

Das Säugetier-Zwei-Hybrid-System basiert auf dem gleichen Prinzip wie das Hefe-System (siehe 3.4.1.1). Als Köder wird ebenfalls ein Fusionsprotein aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal4<sub>DBD</sub>) und einem bekanntem Protein X verwendet. Im Gegensatz zum Hefe-System besteht das zweite Konstrukt aus der VP16-Transaktivierungsdomäne (VP16<sub>AD</sub>) fusioniert mit einem bekannten Protein Y. VP16 ist ein Protein des *Herpes Simplex Virus* und hat eine starke transkriptionsaktivierende Funktion. Da in eukaryontischen Zellen exprimiert wurde, konnte nicht die Gal<sub>AD</sub> verwendet werden. Der Vorteil des Systems gegenüber dem Hefe-System liegt darin, daß die Interaktion in eukaryontischen Zellen unter physiologischen Bedingungen untersucht werden kann.

##### 4.4.2.2 Interaktion zwischen mGCNF und mNCoR

Um die Daten des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems zu bestätigen, wurde zunächst die Interaktion von mGCNF und mNCoR in eukaryontischen Zellen untersucht. Dazu wurden BHK-Zellen transient mit Gal4<sub>DBD</sub>-mNCoR, mGCNF<sub>fl</sub>-VP16 und als Reporter Gal4<sub>RE</sub>-TK-Luc transfiziert. Das Gal4<sub>DBD</sub>-mNCoR<sub>ID-I/II</sub> Fusionskonstrukt wurde durch Klonierung eines *mNCoR*-PCR-Fragmentes (Nukleotidposition 5658-7478 nach Seol *et al.*,1996) über die eingeführte Schnittstelle *BamHI* in den Vektor pCMX-Gal<sub>DBD</sub> erstellt (Dr. H.Beekman, Schering AG). Das mGCNF<sub>fl</sub>-VP16 Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. A.Cooney (Houston, Texas) zur Verfügung gestellt.

Wie aus der Abb. 27 ersichtlich ist, hatten jeweils die Konstrukte Gal4<sub>DBD</sub>-mNCoR und mGCNF-VP16 keinen nennenswerten Einfluß auf die Expression des Reporters *Luziferase*. Erst nach Kotransfektion der beiden Konstrukte zeigte sich eine deutliche Reporteraktivierung, die konzentrationsabhängig von GCNF bis auf ca. den fünffachen Wert, bezogen auf Gal4<sub>DBD</sub>-mNCoR, anstieg. Daraus läßt sich folgern, daß auch im eukaryontischen System die Interaktion von mGCNF mit mNCoR möglich ist..

**A:****B:**

**Abb. 27: Nachweis der Interaktion zwischen mGCNF und mNCoR im Säugetier-Zwei-Hybrid System.** **A:** Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Die Zahlen geben die Aminosäureposition an. **B:** BHK-Zellen wurden transient mit Gal<sub>4</sub><sub>DBD</sub>-mNCoR<sub>ID-I-II</sub>, mGCNF-VP16 und jeweils als Reporter Gal<sub>4</sub><sub>RE</sub>-TK-Luc transfiziert. Alle Werte wurden durch die konstitutive Expression von *Renilla*-Luziferase normalisiert. (R) = Reporter Gal<sub>RE</sub>-TK-Luc, (mNCoR) = Gal<sub>DBD</sub>-mNCoR<sub>ID-I-II</sub>, (mGCNF) = mGCNF<sub>fl</sub>-VP16

#### 4.4.2.3 Interaktion von hGCNF mit hNCoR

Zur Untersuchung der Interaktion von humanem GCNF mit humanem NCoR wurde ebenfalls das Säugetier-Zwei-Hybrid-System verwendet. Zunächst wurde das Konstrukt VP16-hGCNF<sub>DE</sub> (p30) erstellt. Dazu wurde das hGCNF<sub>DE</sub>-Fragment aus Konstrukt p11 mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI/NheI* herausgeschnitten und im durchgehenden Leseraster in den Vektor pCMX-PL2-VP16 kloniert. Das humane NCoR-Fusionskonstrukt Gal<sub>DBD</sub>-hNCoR<sub>ID-I-II</sub> (p21) wurde durch PCR-Amplifikation (Oligonukleotid #3144 und #3142) eines *hNCoR*-Fragmentes mit humaner Prostata-cDNA als Matrize und anschließender Klonierung in den Vektor pCMX-Gal<sub>DBD</sub> über die Restriktionsschnittstellen *BamHI/NheI* generiert.

Die Konstrukte p30 und p21 wurden zusammen mit dem Reporter Gal<sub>RE</sub>-TK-Luc in BHK-Zellen kotransfiziert und die Reporterogenaktivität des Luziferasegens bestimmt. Die gemessenen Werte wurden durch Bestimmung der kotransfizierten *Renilla*-Luziferaseaktivität normiert. Es zeigte sich, daß die Negativkontrollen VP16-hGCNF<sub>DE</sub> und Gal<sub>DBD</sub>-hNCoR<sub>ID-I-II</sub> alleine die Reporterogenaktivität erhöhten (siehe Abb. 28). Nach Kotransfektion der beiden Konstrukte konnte eine etwa 1,5 fache Steigerung der Luziferaseaktivität gemessen werden, bezogen auf die Aktivität der beiden Konstrukte alleine. Dies zeigt, daß auch hGCNF und hNCoR im Säugetiersystem interagieren können, allerdings ist die Interaktion nicht so stark wie zwischen mGCNF und mNCoR.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Daten aus der Interaktionsanalyse von GCNF und NCoR im Säugetier-Zwei-Hybrid-System die Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems bestätigt haben.



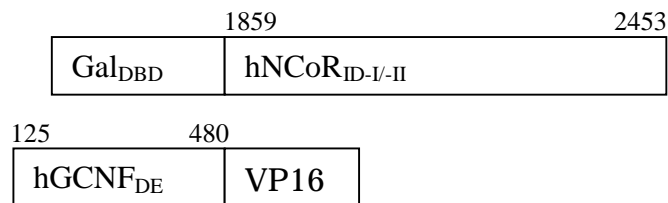
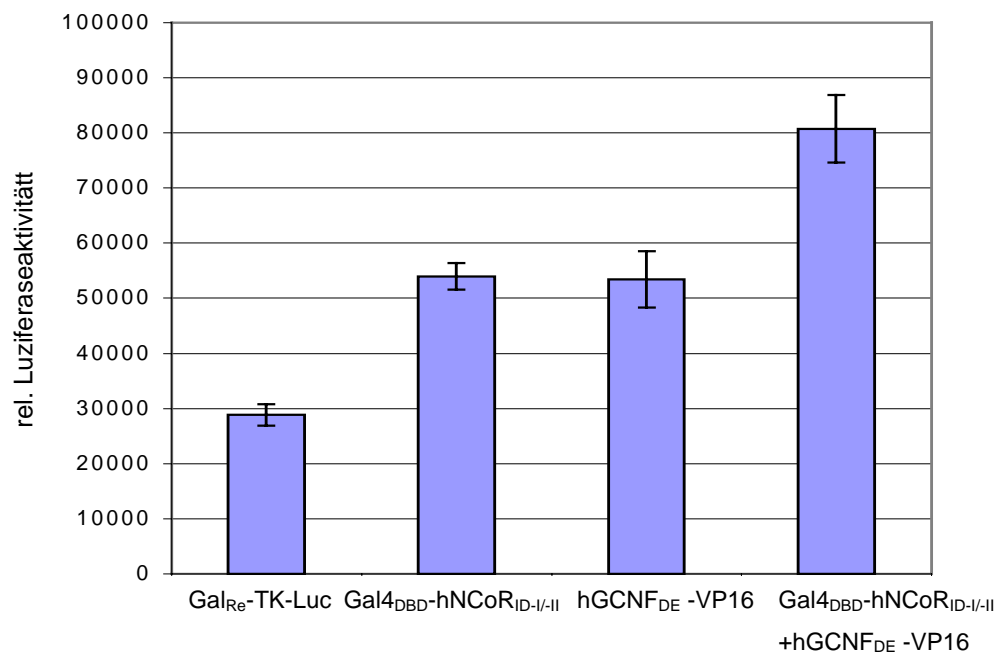
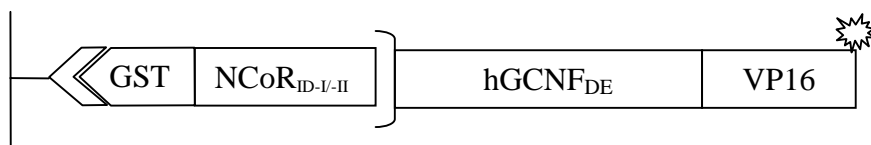
**A:****B:**

Abb. 28 :**Nachweis der Interaktion zwischen hGCNF und hNCoR im Säugetier-Zwei-Hybrid System.** **A:** Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Die Zahlen geben die Aminosäurenposition an. Für das hNCoR-Konstrukt sind die entsprechenden Aminosäurenpositionen der mNCoR-Sequenz angegeben. **B:** BHK-Zellen wurden transient mit Gal<sub>DBD</sub>-hNCoR<sub>ID-I-II</sub>, VP16-hGCNF<sub>DE</sub> und jeweils als Reporter Gal<sub>RE</sub>-TK-Luc transfiziert. Alle Werte wurden durch Messung der Expression von *Renilla*-Luziferase normalisiert.

#### 4.4.3 Nachweis der Interaktion *in vitro*

Die Ergebnisse des Hefe- und des Säugetier-Zwei-Hybrid-System haben gezeigt, daß GCNF und der Korepressor NCoR in beiden Systemen miteinander interagieren können. Um dieses Ergebnis zusätzlich in einem unabhängigen System zu bestätigen, sollte die Interaktion *in vitro*

nachgewiesen werden. Dazu wurde der sogenannte „GST-pull-down-Test“ verwendet. Bei diesem Test wird ein bekanntes Protein X als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) in *E.coli*-Zellen exprimiert und an Glutathion-Sepharose gebunden. Das bekannte Protein Y wird dann unter Verwendung von radioaktivem Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert. Bei erfolgreicher Interaktion der Proteine X und Y kann das radioaktive Protein Y durch die Protein X-beladene-Glutathion-Sepharose nach Zentrifugation sedimentiert und durch SDS-PAGE autoradiographisch nachgewiesen werden.



Glutathion-Sepharose

Abb. 29: **Schematische Darstellung des Prinzips des „GST-pull-down-Tests“.** Das Fusionsprotein GST-NCoR<sub>ID-I-II</sub> wurde durch Bindung an Glutathion-Sepharose immobilisiert und zur Sedimentation von *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem hGCNF<sub>DE</sub>-VP16 verwendet, das in der SDS-PAGE autoradiographisch nachgewiesen wurde. Der Stern symbolisiert die radioaktive Markierung.

#### 4.4.3.1 „GST-pull-down-Test“

Das Fusionsprotein GST-mNCoR<sub>ID-I-II</sub> wurde durch Klonierung eines mNCoR-Fragmentes (Nukleotidposition 5658-7478 nach Seol *et al.*, 1996), das die Interaktionsdomänen ID-I und – II enthält, in durchgehendem Leseraster über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI/*Eco*RI in den Vektor pGEX-2T (Pharmacia) generiert (Dr. H. Beekman, Schering AG). Für die *in vitro* Transkription/Translation wurde sowohl hGCNF<sub>fl</sub> (p15a) als auch VP16-hGCNF<sub>DE</sub> (p30) verwendet, wobei das für die Interaktion nicht relevante Protein VP16 als Negativkontrolle diente (Konstrukt pCMX-PL2-VP16). Die Interaktionsanalyse zeigte, daß hGCNF<sub>fl</sub> und VP16-hGCNF<sub>DE</sub> mit mNCoR auch *in vitro* interagieren (siehe Abb. 30). Die Interaktion ist spezifisch, da keine Bindung an GST auftrat und die Negativkontrolle VP16 ebenfalls kein Signal zeigte.

Damit konnte in drei unabhängigen Systemen (Hefe-Zwei-Hybrid, Säugetier-Zwei-Hybrid und GST-pull down) gezeigt werden, daß GCNF und NCoR interagieren können.

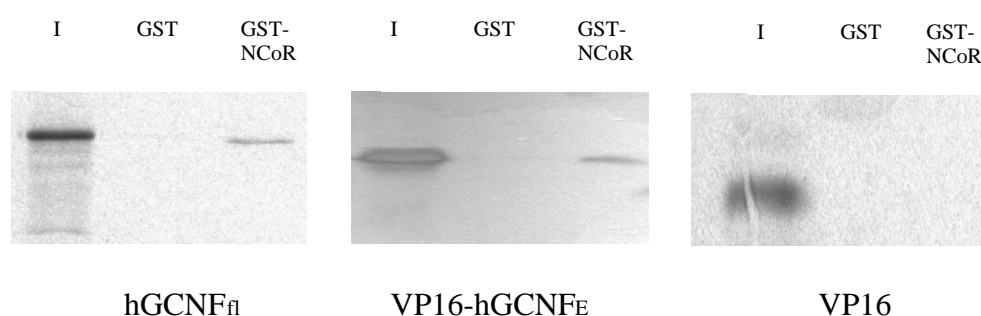


Abb. 30: Nachweis der Interaktion zwischen hGCNF und mNCoR im „GST-pull down assay“. In *E.coli* exprimiertes GST-NCoR und GST wurde an Glutathion-Sepharose gebunden und zur Sedimentation von radioaktiv markierten hGCNF Fusionsproteinen verwendet. (I) = Input, (GST) = Glutathion-S-Transferase, (GST-NCoR) = Glutathion-S-Transferase-mNCoR<sub>ID-I-II</sub>. Der Input entspricht 1/10 der Menge des eingesetzten markierten Proteins.

#### 4.5 Eingrenzung der Bindungsregion von GCNF an NCoR *in vitro*

Im Abschnitt 4.4 wurde nachgewiesen, daß GCNF und NCoR interagieren können. Dabei zeigte sich bereits, daß dafür die Ligandenbindungsdomäne von GCNF ausreicht. Zusätzlich wurde im Abschnitt 4.3.3 gezeigt, daß mindestens zwei Bereiche innerhalb der ligandenbindenden Domäne (Helix 1-6 und Helix 7-12) die Repression vermitteln können.

Um die Bindungsregion innerhalb von GCNF an NCoR genauer zu kartieren, sollte im *in vitro* System („GST-pull-down-Test“) durch Verwendung von Deletionsmutanten die Bindungsregion bestimmt werden. Wie im Abschnitt 4.4.3.1 beschrieben, wurde für dieses System ein GST-mNCoR Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Die für die *in vitro* Transkription/Translation verwendeten hGCNF-Deletionsmutanten wurden durch PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/NheI* in den Vektor pCMX-PL2-VP16 kloniert (siehe Abb. 32). Für die PCR-

Amplifizierung und anschließende Klonierung der hGCNF-Fragmente wurden folgende Oligonukleotide verwendet: Konstrukt p15a (siehe 4.2.3.2), p32 (#3167,#3166), p42 (#3167,#3176), p41 (#3175,#3166), p44 (#3175,#3173), p46 (#3167,#3182), p45 (#3170,#3176), p47 (#3175,#3183), p48 (#3184,#3173).

Bei den so entstandenen Fusionsproteinen aus VP16 und hGCNF war der VP16-Anteil für die Bindung an NCoR unerheblich und diente nur als negative Kontrolle.

Die Ergebnisse zeigten zunächst (wie bereits in Abschnitt 4.4.3.1 beschrieben), daß sowohl hGCNF<sub>N</sub> als auch hGCNF<sub>E</sub> in der Lage sind, mit mNCoR zu interagieren. Aus den Ergebnissen zur weiteren Eingrenzung ging hervor, daß, wie bereits bei der Eingrenzung der Repressordomäne unter 4.3.3 beschrieben, sowohl die GCNF-Fragmente Helix 1-6 als auch Helix 7-12 *in vitro* mit NCoR interagieren. Um den interagierenden Bereich genauer zu lokalisieren, wurden beide interagierende Fragmente weiter verkleinert. Wie aus der Abb. 32 ersichtlich ist, zeigte das Fragment Helix 1-3 noch eine schwache Bande, während das Fragment Helix 4-6 und das Fragment Helix sheet-6, das die  $\beta$ -Faltblattstruktur zwischen Helix 5 und Helix 6 einschließt, kein Signal mehr zeigten. Das Fragment Helix 7-12 wurde auf den Bereich von Helix 7-10 verkleinert, der ebenfalls mit NCoR interagiert. Daher wurde dieses Fragment weiter in die Subfragmente Helix 7-8 und Helix 9-10 zerlegt. Beide Bereiche zeigten im *GST-pull-down-Test* noch eine schwache Bande. Zusammenfassend ließ sich sowohl für das hGCNF Fragment Helix 1-3 als auch Helix 7-8 und 9-10 eine Interaktion mit mNCoR *in vitro* nachweisen. Bei den eingegrenzten Interaktionsbereichen muß es sich nicht zwangsläufig um verschiedene Bindungsbereiche von NCoR handeln, da die beschriebenen Helices eventuell im nativen Wildtyp-GCNF-Protein alle zu einer Bindungsstelle beitragen.

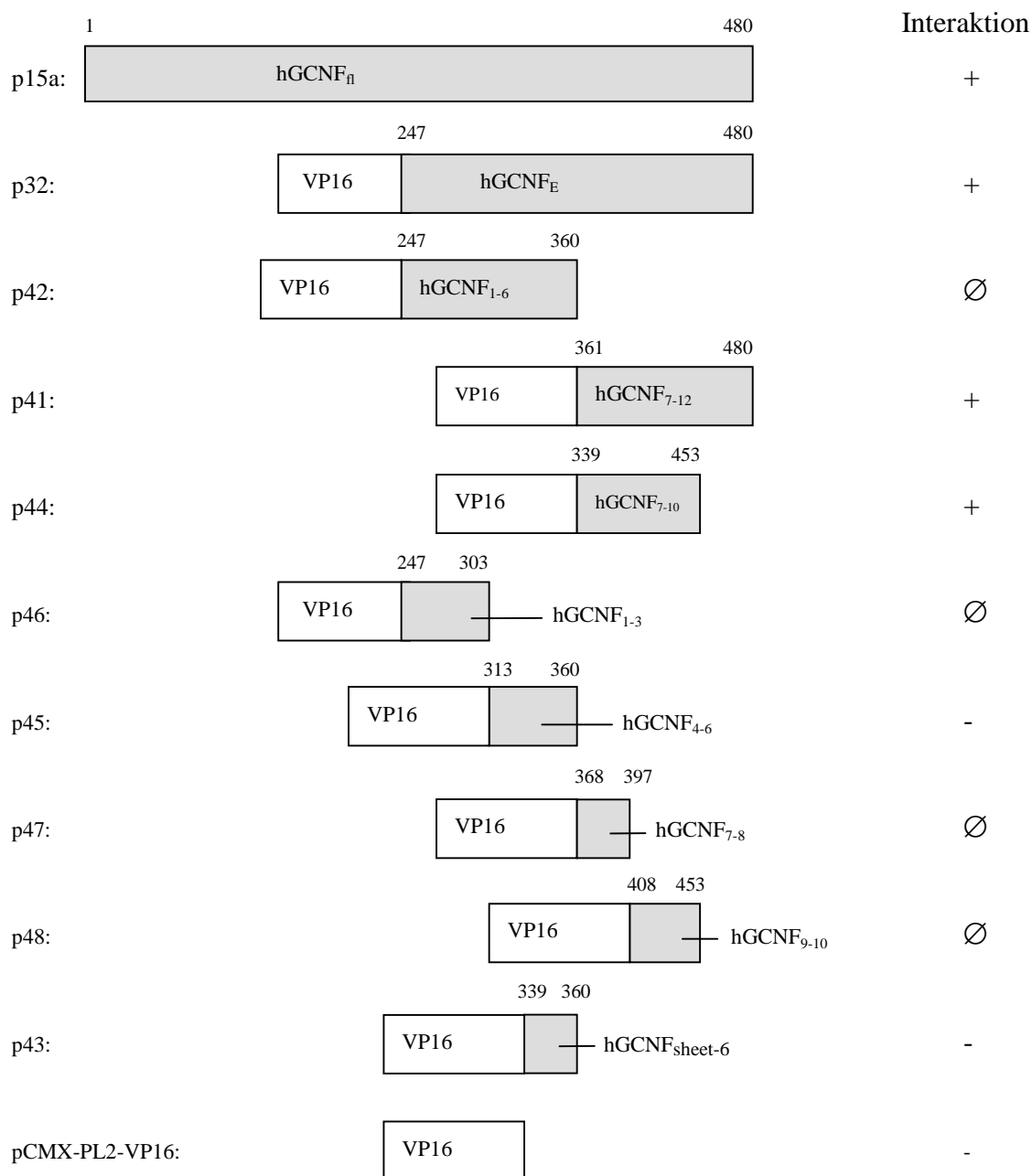


Abb. 31: **Eingrenzung der Bindungsregion von GCNF an NCoR *in vitro* im GST-pull-down-Test. Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte.** Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an. Der hGCNF-Anteil am Fusionsprotein ist grau unterlegt. Die Symbole in der Spalte „Interaktion“ bedeuten: + = gut, ∅ = durchschnittlich, - = schlecht

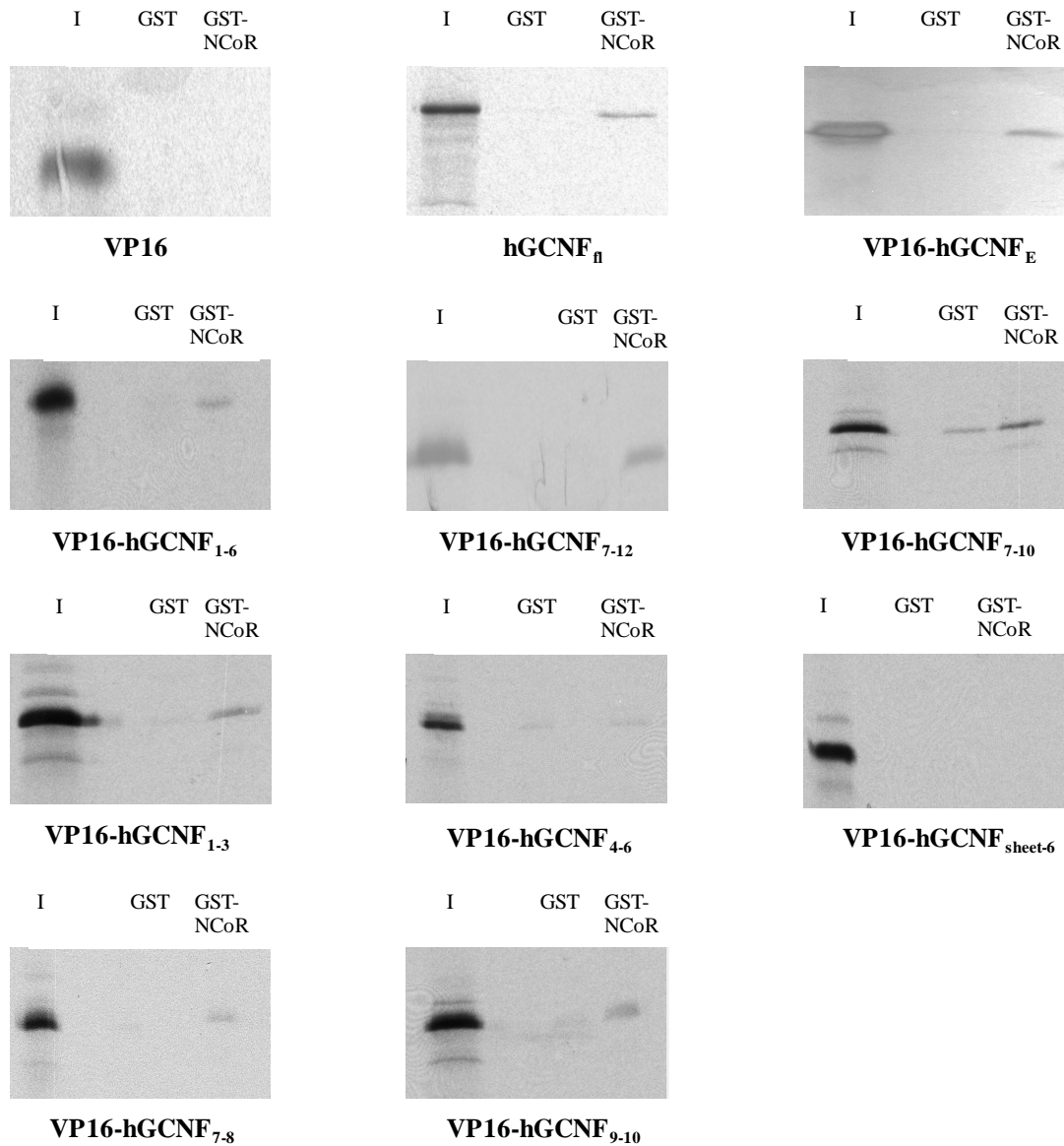


Abb. 32: **Eingrenzung der Bindungsregion von GCNF an NCoR *in vitro* im GST-pull-down-Test.** In *E.coli* exprimierte GST-NCoR und GST wurde an Glutathion-Sepharose gebunden und zur Sedimentation von radioaktiv markierten VP16-hGCNF Fusionsproteinen verwendet. (I) = Input, (GST) = Glutathion-S-Transferase, (GST-NCoR) = Glutathion-S-Transferase-NCoR<sub>ID-I/II</sub>. Der Input entspricht 1/10 der Menge des eingesetzten markierten Proteins.

#### 4.6 Nachweis der Genexpression von NCoR in verschiedenen Zellstadien der Spermatogenese

In den Abschnitten 4.4 und 4.5 war durch die drei unabhängigen Testsysteme Hefe-Zwei-Hybrid System, Säugetier-Zwei-Hybrid System und „GST-pull-down-Test“ gezeigt worden, daß GCNF und NCoR interagieren können. Um zu untersuchen, ob dies auch *in vivo* möglich ist, sollte die NCoR-Expression in den verschiedenen Zellstadien der Spermatogenese untersucht werden, in denen auch GCNF exprimiert wird. Dazu sollten, anhand von RT-PCR, *NCoR*-Transkripte in aufgereinigten Keimzellen nachgewiesen werden.

Ratten-cDNA aus aufgereinigten primären Spermatozyten, runden Spermatisden und elongierten Spermatisden aus Ratten Testis wurde von Dr. M.Fritsch (Schering AG) zur Verfügung gestellt. Für die Amplifikation der *rNCoR*-Fragmente wurden die *rNCoR* spezifischen Oligonukleotide #3180 und #3181 verwendet. Im Agarosegel konnten in den vier untersuchten Zellfraktionen (primäre Spermatozyten, primäre Spermatozyten/runde Spermatisden, runde Spermatisden und elongierte Spermatisden) die erwarteten PCR-Produkte von ca. 150 bp Länge nachgewiesen werden (siehe Abb. 32). Die negativ Kontrolle (Wasser) zeigte kein Signal.

In den Keimzellstadien, in denen GCNF exprimiert wird, konnte damit auch die Expression von NCoR nachgewiesen werden.

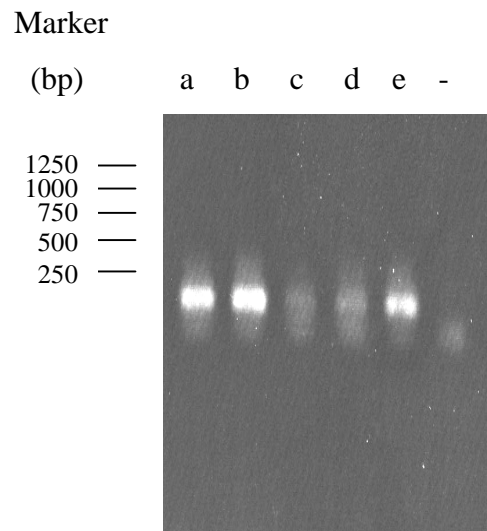


Abb. 33: **RT-PCR Nachweis von *rNCoR*-Transkripten in verschiedenen Keimzellstadien aus Ratten Testis.** RNA aus verschiedenen aufgereinigten Keimzellstadien aus Ratten Testis wurde revers transkribiert und mit den für *rNCoR* spezifischen Oligonukleotiden #3180 und #3181 als Matrize in der PCR verwendet. (a) = primäre Spermatozyten, (b) = primäre Spermatozyten/runde Spermatozyten, (c) runde Spermatozyten, (d) = elongierte Spermatozyten, (-) = negativ Kontrolle. Das erhaltene Produkt wurde im Agarosegel separiert. Als negativ Kontrolle diente Wasser.

Um auch für *hGCNF* und *hNCoR* zu zeigen, daß beide Proteine in denselben Zellstadien exprimiert sind und somit *in vivo* eine Interaktion möglich ist, sollte ebenfalls die Expression von *hNCoR* untersucht werden. Da keine humanen aufgereinigten Keimzellen vorlagen, wurde kommerziell erhältliche humane *Testis*-cDNA verwendet. Für die Amplifikation des *hNCoR*-Fragments wurden die Oligonukleotide #3152 und #3142 verwendet. Das Ergebnis ist in Abb. 34 dargestellt. Im Agarosegel konnte eine Bande von ca. 650 bp detektiert werden. Humanes *NCoR* wird in der *Testis* exprimiert. Die Negativkontrolle (Wasser) zeigte kein Signal.

Die nachgewiesene Expression von *NCoR* im humanen Testis bzw. in runden und elongierten Ratten-Spermatozyten, also den Zellstadien der Spermatozytogenese in denen auch *GCNF* exprimiert wird, läßt darauf schließen, daß die gezeigte mögliche Interaktion von *GCNF* und *NCoR* auch *in vivo* stattfinden kann.



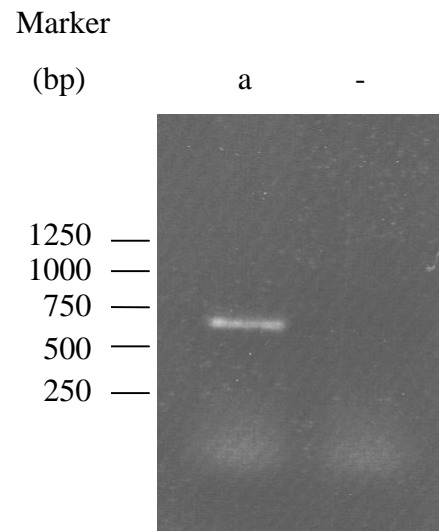


Abb. 34: RT-PCR Nachweis von *hNCoR*-Transkripten in humaner *Testis*-cDNA. Einzelstrang-cDNA aus humaner *Testis*-RNA wurde als Matrize mit den für *hNCoR* spezifischen Oligonukleotiden #3152 und #3142 zur PCR-Amplifikation verwendet. (a) = humane *Testis*-cDNA, (-) = negativ Kontrolle, (M) = Marker. Das erhaltene Produkt wurde im Agarosegel separiert. Als negativ Kontrolle diente Wasser.