

6 Zusammenfassung

Die Spermatogenese ist ein Prozeß, bei dem aus diploiden Voläuferkeimzellen reife, haploide Spermatozoen entstehen. Die molekularen Mechanismen seiner Regulation sind bisher wenig untersucht. Die cDNA des nukleären Waisen-(Orphan)-Kernrezeptors GCNF war aus der Maus isoliert worden und sein Expressionsmuster als keimzellspezifisch beschrieben worden. Daher wurde für GCNF eine Funktion bei der Keimzellentwicklung vermutet und die gezielte Einflußnahme auf seine Funktion als möglicher Ansatz einer neuartigen Fertilitätskontrolle in Erwägung gezogen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung und Charakterisierung von humanem GCNF beschrieben. Die humane vollständige GCNF-cDNA wurde aus einer humanen Testis cDNA-Bank isoliert und zeigte eine hohe Identität mit der Maus-GCNF-Sequenz (89,1% bzw. 98,3% Identität bezogen auf die cDNA- bzw. Proteinsequenz). Das Expressionsmuster von hGCNF-mRNA wurde im Northern-Blot untersucht und ergab eine beinahe ausschließliche Expression im Testis. Um darüber hinaus die Expression von hGCNF-Protein im Testis eingehender zu untersuchen, wurden hGCNF-Fragmente in *E.coli* exprimiert, aufgereinigt und zur Herstellung von Antiseren verwendet. Mit Hilfe der affinitätsgereinigten Antikörper wurde GCNF im Testis von Mensch, Affe, Hund und Maus nachgewiesen. Es zeigte sich, daß GCNF keimzellspezifisch erst postmeiotisch in den runden und elongierten Spermatischen exprimiert wird. Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation wurde ein hGCNF-EGFP-Fusionsprotein in HeLa-Zellen exprimiert. Es wurde eine hauptsächlich nukleäre und schwache zytoplasmatische Expression gefunden. Dieses Ergebnis wurde auch durch einen immunhistochemischen Nachweis von in HeLa-Zellen exprimiertem, vollständigem hGCNF bestätigt. In Transaktivierungsexperimenten wurde die Funktion von hGCNF untersucht. Es zeigte sich, daß hGCNF als Repressor auf die Transkription eines Reportergens wirkte. Durch die Erstellung von Deletionsmutanten konnte der repressorische Bereich auf die Ligandenbindungsdomäne eingegrenzt werden, innerhalb derer möglicherweise zwei repressorische Domänen vorliegen. Um die Interaktion von GCNF mit dem Korepressor NCoR zu untersuchen, wurden das Hefe- und Säuger-Zweihybridsystem und das GST-Pull-Down-System verwendet. In allen drei Systemen konnte die Interaktion von GCNF mit NCoR bestätigt werden. Mit Hilfe von Deletionsanalysen wurde der Interaktionsbereich von GCNF mit NCoR im GST-Pull-Down-Experiment auf drei Bereiche innerhalb der Ligandenbindungsdomäne eingegrenzt.