

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der Untersuchung zur Thekazelldifferenzierung des bovinen Ovars wurde das Hormon "relaxin-like factor" als Markergen genutzt.

Der "relaxin-like-factor" (RLF) ist ein neues Mitglied der Insulin-IGF-Relaxin-Hormon- und Wachstumsfaktorfamilie. Im Gegensatz zu anderen Species wird RLF im bovinen Ovar in hohem Maße exprimiert und eignet sich daher sehr zur Charakterisierung der Genexpression ovarieller Zellen. Das Rind verfügt über kein Relaxin, zeigt aber dennoch eine relaxin-ähnliche Physiologie in der späten Trächtigkeit. Es ist wahrscheinlich, daß RLF als ein wiederkäuerspezifisches "Ersatzhormon" für Relaxin fungiert.

In der vorliegenden Arbeit galt es, nach Isolierung und Sequenzierung des bovinen RLF-Promotorbereiches, diesen durch Restriktionsanalyse zu charakterisieren und eine Untersuchung vorhandener Transkriptionsfaktorbindungsstellen vorzunehmen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde versucht, aus einer genomischen Bibliothek bzw. genomischer DNA mittels einer Polymerasenkettenreaktion (PCR) den RLF-Promotorbereich zu gewinnen. Nachdem sowohl diese Ansätze als auch die Anreicherung von DNA mittels eines genomischen Blots nicht zu den gewünschten Ergebnissen führten, konnte über eine inverse PCR ein 2,2 kb großes RLF-Fragment gewonnen werden. Sowohl dieser RLF-Abschnitt als auch der in einem parallelen Screening einer genomischen Bibliothek isolierte positive Klon erwiesen sich nach Sequenzierung und Vergleich beide als das Gen für RLF.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zur weiteren Analyse des nun isolierten Promotorbereiches drei Restriktionsanalysen durchgeführt. Dies führte zur Ermittlung spezifischer Enzymkennungsschnittstellen, anhand derer später Deletionskonstrukte hergestellt werden konnten. Im dritten Teil der Arbeit wurden per Computeranalyse identifizierte putative Transkriptionsfaktorbindungsstellen durch "electrophoretic mobility shift assays" verifiziert. Hierzu wurde der sich unmittelbar dem Transkriptionsstart anschließende Promotorbereich von 750 Basenpaaren fragmentiert und auf das Vorhandensein von Transkriptionsfaktorbindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, SF-1 und C/EBP β hin untersucht. Es wurden Kernproteinextrakte von Thekazellen tertiärer Follikel verwendet.

In der Vergangenheit konnten für die Promotorregion des murinen und des Ratten-RLF-Gens SF-1-Bindungsstellen identifiziert werden.

Anhand der hier durchgeführten Untersuchungen wurden nun auch für die Promotorregion des bovinen RLF-Gens SF-1-Bindungsstellen nachgewiesen, deren Affinität aber im Vergleich zur Bindung an authentische SF-1-Bindungsstellen eher gering ist.

Zusammengefaßt führen diese Ergebnisse zu dem Schluß, daß mehrere Transkriptionsfaktoren oder auch -komplexe in synergistischer Weise die RLF-Transkription modulieren.

Bindungsstellen für AP-1 und C/EBP β konnten nicht nachgewiesen werden.

6 Summary

Wiebke Stribier

Molecular assessment of theca cell differentiation from bovine follicles.

In this study the relaxin-like factor was used as a genetic marker to investigate the differentiation of theca cells from bovine ovarian follicles.

The relaxin-like factor (RLF) is a new member of the insulin/IGF/relaxin hormone and growth factor family. RLF is expressed in significantly higher amounts in the bovine ovary in contrast to other species and is thus very useful in the characterisation of follicular cell differentiation and gene expression. In the cow the relaxin gene is not functional, although this animal exhibits a relaxin-like physiology during late pregnancy. It therefore seems likely that RLF could function as a natural substitute for relaxin in ruminants.

In the present thesis putative transcription factor binding sites in the bovine RLF promoter were characterised after cloning and sequencing the promoter region of the RLF gene and mapping of the restriction sites. In the first part of this study, different attempts were made to isolate the RLF- promoter region from native or gel-enriched genomic DNA or from a genomic library by the polymerase chain reaction (PCR). After failing with this different methodologies, a 2.2 kb genomic fragment was finally obtained by employing an inverse PCR strategy. This fragment as well as a positive clone from parallel screening of a new genomic library proved to be the desired gene for RLF. In the second part of this study, the isolated promoter region was subjected to restriction analysis in order to identify cutting sites for producing deletion constructs.

In the third part of this study, putative transcription factor binding sites were identified by computer analysis and verified experimentally by "electrophoretic mobility shift assays" (EMSA). For this, the proximal region of the promoter was digested using restriction enzymes into distinct fragments and binding sites for the transcription factor AP-1, SF-1 and C/EBP β were investigated with nuclear extracts from theca cells derived from tertiary follicles. Recently, binding sites for SF-1 have been identified in the promoter region of the mouse and rat RLF genes. In the present study we could now identify SF-1 binding sites also on the bovine RLF promoter, whose affinity however, appear to be lower in comparison to genuine SF-1 binding sites. Taken together, these results lead to the conclusion that multiple

transcription factors or complexes should be involve synergistically in modulating RLF transcription. Binding sites for AP-1 and C/EBP β , though important for ovarian function, were not identified.