

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
vertreten in der
Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
durch das Institut für Biologie
der Universität zu Lübeck

Direktor Prof. Dr. Enno Hartmann

Expressionsanalysen geschlechtsspezifischer Gene

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Vorgelegt von
Dipl.-Biol.
Jan-Hendrik Bebermeier
aus Hamburg

Lübeck 2006

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Kai-Uwe Kalies
2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2007
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.01.2007

gez. Prof. Dr. rer. nat. Erich Hartmann
-Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1.	Zusammenfassung		S. 1
2.	Einleitung		S. 2
3.	Material und Methoden		
3.1	Material		
3.1.1	Verwendete Chemikalien, Geräte und Enzyme		S. 18
3.1.2	Oligonukleotide		S. 18
3.1.3	cDNA-Microarrays		S. 19
3.2	Herkunft der verwendeten Zellen		
3.2.1	Genitalhautfibroblasten und LNCaP Zellen		S. 20
3.2.2	Humane PBMCs		S. 20
3.3	Kulturbedingungen, Nährmedien und Hormone		
3.3.1	hVHF und LNCaP-Zellen		S. 20
3.3.2	PBMC		S. 21
3.4	RNA-Isolierung		
3.4.1	hVHF		
3.4.1.1	Probennahme hVHF		S. 21
3.4.1.2	RNA-Isolierung hVHF		S. 21
3.4.2	PBMC		
3.4.2.1	Probennahme PBMC		S. 21
3.4.2.2	PBMC-Isolierung		S. 22
3.4.2.3	RNA-Isolierung PBMC		S. 22
3.4.3	RNA-Kontrolle		S. 22
3.4.4	Referenz-RNA		S. 23
3.4.5	RNA-Amplifikation		S. 24
3.5	Vorbehandlung der Microarrays		
3.5.1	Postprocessing der Microarrays		S. 25
3.5.2	Blockierung von MA-Oberflächen		S. 26
3.6	Microarray-Hybridisierung		S. 26
3.7	Scannen der Microarray-Hybridisierung		S. 28
3.8	Datenauswertung		S. 28
3.9	Semiquantitative RT-PCR		S. 29
4.	Ergebnisse		
4.1	AR-spezifische Cofaktoren		
4.1.1	Genomweiter Vergleich von Androgenwirkung in LNCaP- und GSF-Zellen		S. 30
4.1.2	AR-spezifische Coregulator-Expressionsprofile in GSF- und LNCaP-Zellen		S. 32

4.1.3	Einfluß der Kulturbedingungen auf AR-spezifische Coregulatoren in GSF-Zellen	S. 36
4.1.4	AR-Coregulator Transkript Profile in verschiedenen Prostata-Geweben	S. 38
4.1.5	Vergleichende in-silico-Analyse von AR-spezifischen Coregulator-Profilen in 35 verschiedenen humanen Geweben	S. 39
4.1.6	Validierung von Microarray-Ergebnissen mittels semi-quantitativer Real-Time PCR	S. 41
4.2	Geschlechtsspezifische Expressionsmuster in PBMC	
4.2.1	Signifikanz-Analyse von geschlechtsspezifischen Genen	S. 45
4.2.2	Anwendung der geschlechtsspezifischen Transkriptliste bei Intersex-Personen	S. 48
4.2.3	Vergleich 46,XY männlicher Phänotyp gegen 46,XY weiblicher Phänotyp	S. 54
4.2.4	Vergleich 46,XX weiblicher Phänotyp gegen 46,XX mit partieller Virilisierung	S. 56
4.3	Einfluß von DHT auf PBMC-Expressionsprofil	S. 60
4.4	Zusammenfassung	S. 63
5.	Diskussion	
5.1	Durchführung eines Microarray-Experimentes	
5.1.1	Sondenherstellung	S. 64
5.1.2	Klone für Microarrays	S. 66
5.1.3	Spotting der Microarrays	S. 67
5.1.4	Hybridisierung	S. 68
5.1.5	Scannen	S. 69
5.1.6	Validierung von Microarray-Daten mit Real-Time PCR	S. 70
5.2.	Datenauswertung	
5.2.1	Quantifizierung der Mess-Signale	S. 72
5.2.2	Normalisierung der Daten	S. 74
5.2.3	Expressionsdatenbanken	S. 75
5.2.4	Ontology-Datenbanken	S. 76
5.2.5	Daten-Clustering	S. 76
5.2.6	Signifikanz-Test: SAM	S. 78
5.3	Coregulatoren	
5.3.1	Genomweite Unterschiede zwischen LNCaP- und GSF-Zellen	S. 80
5.3.2	AR-Coregulator-Profil-Vergleich	S. 81
5.3.3	Einfluß von Kulturbedingungen auf das Expressionsprofil	S. 83
5.3.4	Prostata und AR-Coregulatoren	S. 84
5.3.5	Coregulatoren in verschiedenen Gewebeproben	S. 85
5.3.6	Validierung von Expressionsprofilen mittels Real-Time-PCR	S. 86
5.4	Geschlechtsspezifische Genexpression in PBMC	
5.4.1	Probenmaterial	S. 87
5.4.2	RNA-Proben	S. 89
5.4.3	RNA-Amplifikation	S. 90
5.4.4	Systemtest Referenz-RNA und Amplifikation (Vergleich Mann-Frau)	S. 91

5.4.5	Vergleich Mann-Frau mit Whitney-Genliste	S. 93
5.4.6	Signifikanz-Analyse geschlechtsspezifischer Gene	S. 94
5.4.7	Abgleich der geschlechtsspezifischen Transkriptliste mit allen Patientengruppen und allen Normalkontrollen	S. 97
5.4.8	Vergleich 46,XY männlicher Phänotyp gegen 46,XY weiblicher Phänotyp	S. 101
5.4.9	Vergleich 46,XX weiblicher Phänotyp gegen 46,XX vermännlichter Phänotyp	S. 102
5.5	Einfluß von DHT auf PBMC-Expressionsprofil	S. 107
5.6	Ausblick Genexpression und Diagnostik	S. 111
6.	Literatur	S. 112
7.	Anhang	
7.1.	Lebenslauf	S. 127
7.2.	Danksagung	S. 130
7.3.	Erklärung	S. 131

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Aa	Amino Acid (Aminosäure)
5-alpha-Red.-II	5-alpha-Reduktase-II
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
ADC	Analog-to-digital-converter
AGS	Adrenogenitales Syndrom
AIS	Androgen insensitivity syndrome
AMH	Anti-Müller-Hormon
ANOVA	Analysis of Variances
AR	Androgen-Rezeptor
ARD	Androgen Rezeptor Datenbank
aRNA	amplifizierte RNA
ATCC	American type culture collection
17-β-HSD-III	17-β-Hydroxysteroid-Dehydroxygenase-III-Defekt
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Cytosin
CAH	Congenitale Adrenale Hyperplasie
CAIS	complete androgen insensitivity syndrome
cDNA	copied Desoxyribonucleicacid
DB	Dabcyl quencher
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGE	Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nucleotid-tri-phosphate
D/C-FCS	Dextran/ Charkoal-FCS
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dUTP	Desoxy-Uracil-tri-phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Estrogen-Rezeptor
EtOH	Ethanol
F	FAM (6-Carboxylfluorescein)
FACC	Fluorescence-Activated Cell Counter
FCS	Fötales Kälberserum
ftp	File Transfer Protocol
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GD	Gonadendysgenese
GEO	Gene-Expression-Omnibus
gpr	genepix result file
gps	genepix settings file
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GSF	Genital Skin Fibroblasts (Genitalhautfibroblasten der Vorhaut)
h	Stunde
H	Wasserstoff
hCG	humanes Choriongonadotropin
HRE	Hormone Responsive Element
hVHF	humane Vorhautfibroblasten
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IVD	in-vitro-Diagnostik
IVT	in-vitro-Transkription
K	Kilo (hier: Mengenangabe für 1000)

Abkürzungsverzeichnis

kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
LCH	Leydigzell-Hypoplasie
LH	lutinisierendes Hormon
LIMS	Laboratory Information Management System
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MA	Microarray
MAGE-ML	Microarray Gene Expression Markup Language
MGED	Microarray Gene Expression Data
MIAME	Minimal Information about a Microarray Experiment
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
mRNA	messengerRNA
NaAcetat	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NTPs	Nucleotid-tri-phosphat
ORF	Open Reading Frame
PAIS	partial androgen insensitivity syndrome
Panther	Protein Analysis Through Evolutionary Relationships
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PMT	photo multiplier tube
PR	Progesteron-Rezeptor
qPCR	quantitative PCR
R1881	Methyltrienolon
RFU	Relative Fluorescence Units
RNA	Ribonucleicacid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur
RT-Reaktion	Reverse Transkriptionsreaktion
RT-PCR	Real-Time PCR
SAM	significance analysis of microarrays
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SFGF	Stanford Functional Genomics Facility
sftp	Secure File Transfer Protocol
SMD	Stanford Microarray Database
SMF	Stanford Microarray Facility
SSC	Saline-Sodiumcitrat
SVS	Salzverlustsyndrom
T	Testosteron
T	Thymin (in Sequenz)
TE	Tris-EDTA
TIF	Tagged Image File Format
TRBA	Technische Regel Biologische Arbeitsstoffe
U	Unit
UKE	Universitätskrankenhaus Eppendorf (Hamburg)
UV	Ultraviolett

Abbildungsverzeichnis

Bild 2.1:	Ausschnitt aus Steroid-Biosyntheseweg	S. 2
Bild 2.2:	Schematische Darstellung der Wirkungsweise des Androgenrezeptors im Zellkern	S. 4
Bild 2.3:	Schema Microarray-Experiment	S. 14
Bild 4.1.1:	Cluster LNCaP- gegen GSF-Zellen; Androgenresponsivität	S. 31
Bild 4.1.2:	Cluster LNCaP + Prostata + GSF mit AR-spezif. Coregulatoren	S. 34
Bild 4.1.3:	Balkendiagramm von Genliste aus SAM-Analyse	S. 35
Bild 4.1.4:	Cluster Kulturbedingungen von GSF-Zellen mit AR-spezif. Coregulatoren	S. 37
Bild 4.1.5:	Cluster verschiedene Prostata-Gewebe mit AR-spezif. Coregulatoren	S. 38
Bild 4.1.6:	Cluster humane Gewebeproben mit AR-spezif. Coregulatoren	S. 40
Bild 4.1.7:	Validierung ausgewählter Transkripte mittels real-time-PCR	S. 41
Bild 4.2.1:	Gel-Bild total RNA und amplifizierte RNA	S. 44
Bild 4.2.2:	Cluster Normalkontrollen mit Whitney-Genliste	S. 46
Bild 4.2.3:	Cluster weibliche und männliche Normalkontrollen nach SAM-Analyse	S. 47
Bild 4.2.4:	Cluster Patienten und Normalkontrollen mit geschlechtsspezifischer Genliste	S. 53
Bild 4.2.5:	Cluster Patienten und Normalkontrollen mit geschlechtsspezifischer Genliste mit Wichtung der autosomalen Transkripte	S. 55
Bild 4.2.6:	Cluster weibliche Normalkontrollen und AGS-Patienten nach SAM-Analyse (AGS-spezif. Genliste)	S. 57
Bild 4.2.7:	Cluster Normalkontrollen und Patienten nach SAM-Analyse (AGS-spezif. Genliste)	S. 58
Bild 4.3.1:	Cluster DHT-Wirkung auf Expressionsprofil (genomweite Ebene)	S. 61

Tabellenverzeichnis

Tab. 4.2.1: Verzeichnis der Patienten und der Normalkontrollen

S. 49

1. Zusammenfassung

Das Ziel der an der Lübecker Kinderklinik ansässigen DFG-geförderten Klinischen Forschergruppe „Intersex – from Gene to Gender“ in Kooperation mit dem BMBF-„Netzwerk Intersex“ ist die umfangreiche und umfassende Untersuchung der betroffenen Intersex-Patienten auf verschiedenen Ebenen: medizinische und molekularbiologische Untersuchungen durch Humanmediziner und Biologen, sowie eine psychologisch-soziale Beurteilung der Diagnose und eine Beratung bzw. Betreuung der betroffenen Personen durch Psychologen und Soziologen. Das langfristige Ziel der Forschergruppe ist die Schaffung eines weiteren Bausteins in der Verknüpfung der fachspezifischen Einzelerkenntnisse zu einem komplexen Gesamtbild der Phänotypen, die unter dem Begriff „Intersex“ zusammengefasst werden.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit mußten in der Arbeitsgruppe umfangreiche Methoden neu etabliert werden, da zuvor noch keine entsprechenden Microarray-(MA)-Experimente und Analysen in der Forschergruppe am Standort Lübeck durchgeführt worden waren. Neben der MA-Technik und der damit verbundenen Anforderungen im Labor stellte die Datenauswertung und Analyse von MA´s die zentrale Etablierungsaufgabe dar.

Die Arbeit selbst befasst sich mit drei Teilprojekten:

In umfangreichen in-silico-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass AR-spezifische Coregulatoren die unterschiedliche Androgenresponsivität von LNCaP-Zellen und Genitalhautfibroblasten mit erklären können. Mit cDNA-MA´s sind differentielle Coregulator Expressionsprofile signifikant nachweisbar. Die Arbeit wurde auf dem Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) in Dresden 2004 und auf dem internationalen Symposium „Intersex – from Gene to Gender“ in Lübeck 2004 vorgestellt. Sie ist als Originalarbeit im Journal of Molecular Medicine im Druck.

Neben Gewebeproben und Zellkultur-Material werden Blutproben (PBMC) zunehmend als Basis für Expressionsanalysen verwendet. In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass im Blut neben den erwarteten X- und Y-spezifischen Markergenen auch autosomale geschlechtsspezifische Markergen-Gruppen identifiziert werden können. Aufgrund der dokumentierten Diagnosen verwendeter Patienten (AGS, SRD5A2-Defekt, P450SCC-Defekt, 17- β -HSD-III-Defekt, Gonadendysgenese) muss von einem pränatal androgenen Programm von Expressionsphänotypen ausgegangen werden. Das entsprechende Manuskript für eine Publikation ist in Vorbereitung.

Neben der deskriptiven Nutzung der MA-Technik wurden in einer funktionellen Analyse auf Genexpressionsebene mit MA´s erste Ergebnisse zum Einfluss von DHT auf die Expression von Blutzellen erzielt und somit eine funktionelle Charakterisierung des AR auf Transkriptionsebene vorbereitet.

2. Einleitung

Die humane Geschlechtsentwicklung wird funktionell und zeitlich in verschiedene Phasen gegliedert. Das genetische Geschlecht bezieht sich auf die Chromosomen und wird bei Befruchtung der Eizelle festgelegt. Hierauf basiert normalerweise die Zuordnung des 46,XY Chromosomensatzes zu einer männlichen Geschlechtsentwicklung bzw. des 46,XX Chromosomensatzes zu einer weiblichen Geschlechtsentwicklung. Die phänotypischen Geschlechtsmerkmale werden als phänotypisches Geschlecht zusammengefasst. Das gonadale Geschlecht wird durch die Identität der Gonaden definiert.

Während der frühen Embryogenese ist die Gonadenanlage trotz eindeutiger genetischer Zuordnung noch nicht differenziert. Der menschliche Grundbauplan ist zunächst weiblich ausgelegt, die differentielle Ausbildung der beiden genitalen Gänge (Wolf'scher bzw. Müller'scher Gang) wird hormonell determiniert. Bei normalen Hoden sezernieren die Sertolizellen das Anti-Müller-Hormon (AMH), welches durch Bindung am lokalen Mesenchym der Müller'schen Gänge deren weitere Entwicklung inhibiert. Die sexuelle Determination und Differenzierung bei genetisch männlichen Personen hängt von einem koordinierten, komplexen Zusammenspiel temporär verknüpfter genetischer und hormoneller Faktoren ab. Androgene werden in den Leydig-Zellen produziert. Die Bildung ist abhängig von placentarer Sekretion des Choriogonadotropin (hCG) bzw. anschließend durch die Sekretion des luteinisierenden Hormons (LH) der fötalen Glandula pituitaria in der Hypophyse.

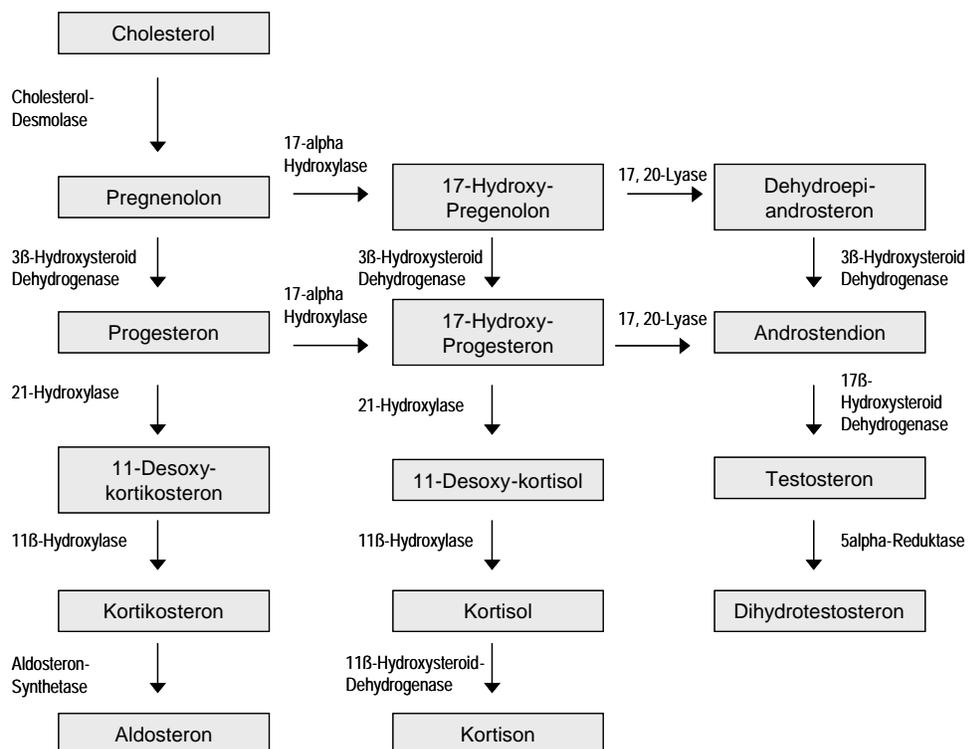


Bild 2.1: Schematische Darstellung der für die Geschlechtsdeterminierung wichtigen Steroid-Biosynthese-Wege

Eine optimale Androgenproduktion und somit eine korrekte Androgenwirkung hängt von einem intakten LH/ hCG-Rezeptor an der Membran der Leydig-Zellen ab. Hierbei erfolgt in den genitalen Zielzellen der Androgenwirkung die Bildung von Dihydrotestosteron (DHT) aus Testosteron (T) durch die 5-alpha-Reduktase-II (Bild 2.1). T und DHT werden vom Androgenrezeptor (AR) gebunden.

Der humane Androgenrezeptor selbst stellt eine Schlüsselrolle in der normalen männlichen Geschlechtsentwicklung dar und ist für die normale Bildung und funktionelle Erhaltung der männlichen Reproduktionsorgane und Geschlechtsmerkmale essentiell (Hiort und Holterhus 2000). Während der fetalen Entwicklung, der Pubertät und im Erwachsenenstadium vermittelt der AR eine große Bandbreite an verschiedenen spezifischen biologischen Effekten in unterschiedlichen Geweben. Hierzu gehören die Ausbildung primärer und sekundärer Geschlechtsorgane und -merkmale wie z.B. Penis-, Skrotumentwicklung, Bartwuchs, Stimmbruch, Größenwachstum, Aufbau von Muskelmasse entsprechend der männlichen Körperform, Akne oder die Ausprägung einer Glatze. Darüber hinaus beeinflusst die AR-Signalkaskade verschiedene Organsysteme und Gewebetypen. Hierzu gehören Knochen (Vanderschueren et al. 2004), Knochenmark (Claustres und Sultan 1988) oder Leber (Cohen et al. 1998). Zusätzlich zu diesen physiologischen Funktionen spielt der AR-vermittelte Androgen-Signalweg eine wichtige Rolle unter pathologischen Bedingungen wie benigner Prostata-Hyperplasie (BPH) (Andriole et al. 2004) und die Entwicklung und das Fortschreiten von Prostata-Krebs (Zhao et al. 2000; Culig et al. 2003). Das Verständnis des molekularen Hintergrundes von AR-vermittelten biologischen Effekten in allen ihren Formen und vor allem ihrer Gewebespezifität ist noch immer nicht komplett geklärt.

Zu der Gruppe der liganden-abhängigen nukleären Steroid-Hormon-Rezeptoren (Fuller et al. 1991; Beato und Klug 2000) gehören neben dem AR auch der Estrogen-Rezeptor (ER), der Progesteron-Rezeptor (PR), der Glucocorticoid-Rezeptor (GR) sowie der Mineralocorticoid-Rezeptor (MR). Diese Rezeptoren haben eine charakteristische modulare Struktur mit einer variablen N-terminalen Transkriptions-Aktivierungsdomäne (Jenster et al. 1995; Reid et al. 2003), einer konservierten doppelten Zinkfinger-Struktur (DNA-Bindungsdomäne) (Claessens et al. 2001) und einer carboxy-terminalen Region, welche die eigentliche Ligandenbindungsstelle enthält (Jenster et al. 1991; Jenster et al. 1992; Simental et al. 1991; Laudet & Gronemeyer 2002).

Das AR-Gen ist mit ca. 90 kb, die sich auf acht Exons verteilen, auf dem langen Arm des X-Chromosoms im Bereich Xq11-12 codiert (Brown et al. 1989). Das hieraus resultierende, etwa 110 kDa große AR-Protein besteht aus 910 bis 919 Aa (Lubahn et al. 1989). Als nukleärer DNA-bindender Transkriptionsfaktor nimmt der AR Einfluß auf die

Transkriptionsrate von Androgen-regulierten Ziel-Genen (Bild 2.2). T und DHT sind hierbei die wichtigsten physiologischen Liganden (Hsiao et al. 2000). Durch die Bindung von T oder DHT wandelt sich der AR in die aktivierte Konformation um. Nach der Dissoziation von Heat-Shock-Proteinen (Beato und Klug 2000) wird das Rezeptor-Molekül phosphoryliert (Blok et al. 1996; Wong et al. 2004) und in den Nukleus transportiert (Jenster et al. 1993). Im Zellkern erfolgt durch eine N/C-terminale Interaktion die Dimerisierung des AR (Ikonen et al. 1997; Ghali et al. 2003). Die Bindung an die Hormon-responsiven DNA-Elemente (HRE) innerhalb der Promotor-Region des Ziel-Gens (Shaffer et al. 2004), i.d.R. zwei palindromische Konsensussequenzen, führt zu einer Aktivierung oder Reprimierung der Zielgen-Transkription. Dies erfolgt durch Kontrolle der Rate der Transkriptionsinitiation, welche durch den RNA-Polymerase-II-Komplex katalysiert wird (Jänne et al. 2000).

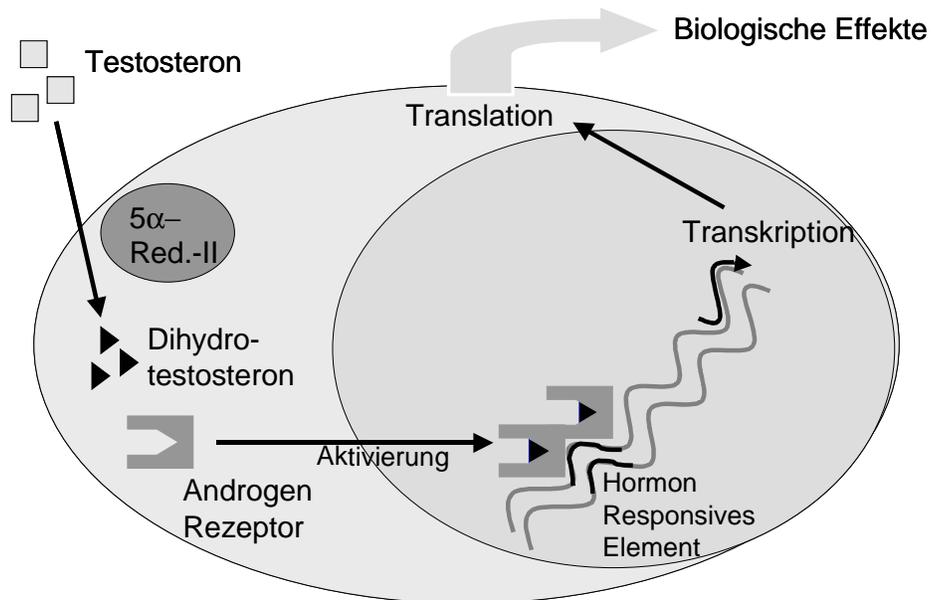


Bild 2.2: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des Androgenrezeptors in der Zelle bei Androgenwirkung

Abweichungen in der Geschlechtsentwicklung

Der Begriff „Intersex“ bezeichnet die Ausprägungsformen von externen Genitalien, die sich von der normalen Entwicklung für beide Geschlechter unterscheiden. Es ist eine Abweichung des phänotypischen Geschlechts vom gonadalen oder chromosomalen Geschlecht. Hierbei werden verschiedene Gruppen unterschieden: Männliche Individuen mit 46,XX Karyotyp (z.B. AGS) und Individuen mit Virilisierungsstörung bei 46,XY-Karyotyp. Unter einem echten

Hermaphroditismus versteht man, wenn sowohl männliche (Hoden) als auch weibliche (Ovarien) Gonadenanlagen vorhanden sind.

Neben den medizinischen Aspekten können die betroffenen Personen und auch ihr soziales Umfeld mit erheblichen psychosozialen Problemen konfrontiert sein (Hiort et al. 2003; Richter-Appelt et al. 2005; Thyen et al. 2005). Eine Geschlechtszuordnung und die Geschlechtsidentifikation können erheblich erschwert sein. Die kompetente Beratung und Betreuung zunächst der Eltern und später auch der Betroffenen selbst ist daher essentiell (Migeon et al. 2002 (II)). Die psychologische Betreuung kann sehr aufwendig und langwierig sein, da eine erhöhte Rate an Störungen der Geschlechtsidentität vorliegt (Cohen-Kettenis 2005; Meyer-Bahlburg 2005). Ein enges Zusammenspiel aller beteiligten Disziplinen ist somit wünschenswert und nötig, um eine optimale Betreuung der Betroffenen zu erzielen (Migeon et al. 2002 (I)). Dies ist eines der Ziele der Forschergruppe. Eine wesentliche Grundlage der Beratung ist die exakte endokrinologische und molekularbiologische Diagnose. Bislang sind viele Aspekte der individuellen Wirkung von Androgenen nur marginal verstanden.

Die molekularbiologischen Ursachen für die Ausprägung von Intersexualität können in die folgenden Gruppen eingeteilt werden:

Das Adrenogenitale Syndrom (AGS) bzw. die Congenitale Adrenale Hyperplasie (CAH) wird zumeist durch einen autosomal-rezessiv vererbten Enzymdefekt der 21-Hydroxylase (Cyp21) hervorgerufen. Die unzureichende Bildung von Kortisol in der Steroidbiosynthese der Nebennierenrinde erhöht die Ausschüttung von ACTH (adrenokortikotropes Hormon), welches letztendlich zu starker Überproduktion von adrenalen Androgenen führt (Hyperandrogenisierung). Dieser Effekt kann, abhängig vom Cyp21-Genotyp, bei weiblichen Feten, die chromosomal, gonadal und gonoduktal eigentlich weiblich sind, eine genitale Virilisierung bis hin zur vollständigen Maskulinisierung führen. Als Therapie muß eine lebenslange Substitution von Glukokortikoiden (Hughes 2002) und ggf. Mineralokortikoiden erfolgen, da ansonsten lebensbedrohliche Salzverlustkrisen die Folge wären. Dies verhindert zudem auch die erhöhte ACTH-Bildung (Beier et al. 2001). Dadurch kommt es bei als Mädchen aufwachsenden AGS-Personen zu einer erwünschten Reduktion der adrenalen Androgenbildung.

Verschiedene weitere Enzymdefekte der adrenalen und gonadalen Steroidhormonbiosynthese können zu Intersex führen. Bei dem 17- β -Hydroxy-Steroid-Dehydroxygenase-III-Defekt (17- β -HSD-III) ist die Umwandlung von Androstendion zu T betroffen (Geissler et al. 1994). Bei dem autosomal-rezessiv vererbten 5-alpha-Reduktase Typ 2-Defekt ist dagegen die Umwandlung von T zu DHT beeinträchtigt (Wilson et al. 1993). In der Forschergruppe wird die Transkription verschiedener Isoformen der beteiligten

Enzyme ausführlich mittels Real-Time-PCR untersucht (Hoppe et al. 2004; Hoppe et al. 2006).

Die Gonadendysgenese (GD) weist ein heterogenes Patientenbild auf. Circa 10-15% der Fälle können auf Fehler im SRY-Gen (sex-related gene on the Y-chromosome) zurückgeführt werden. SRY-Mutationen können zu GD und komplettem XY sex reversal (Swyer Syndrom) führen (Hawkins 1993; Uehara et al. 2002). Jedoch wurden auch Punktmutationen im WT1-, dem SOX9- und dem FSH-Rezeptor-Gen als Ursachen für eine gehemmte Testes-Entwicklung diagnostiziert (Harley et al. 2003). Aufgrund der gestörten Gonadenanlage und mangelnder Testosteronbildung ist der Phänotyp zum Zeitpunkt der Geburt trotz 46,XY-Karyotyp vielfach unauffällig weiblich. Je nach Lage und Ausmaß der genetischen Mutation liegt eine unterschiedliche Störung in der Gonaden-Differenzierung vor. Das Vorhandensein einer Störung wird erst in der Pubertät sichtbar, da aufgrund der fehlenden Östrogenbildung keine Ausprägung weiblicher sekundärer Geschlechtsmerkmale erfolgen kann (Ausbleiben der Brustentwicklung). Dies kann durch eine hormonelle Substitutionstherapie mit Östrogen-Gestagen-Sequenzkombination jedoch künstlich ausgelöst werden.

Eine fehlerhafte LH-Rezeptor-Signalkaskade (Kremer et al. 1995) führt hingegen zu der Leydigzell-Hypoplasie (LCH). Die fetalen Leydigzellen von LCH-Patienten sind nicht in der Lage, auf entsprechende Konzentrationen von placentalem Choriongonadotropin (hCG) zu reagieren. Dies führt zu einer nicht ausreichenden fetalen Androgenproduktion in 46,XY-Embryos und somit zu Virilisierungsdefiziten. In der Pubertät kann somit die Ausprägung von sekundären männlichen Geschlechtsmerkmalen aufgrund von Androgenmangel nicht oder nur teilweise erfolgen (Richter-Unruh et al. 2002). Bei als Mädchen aufwachsenden 46,XY-Individuen unterbleibt die normale Brustentwicklung aufgrund fehlender Östrogenproduktion.

Bei dem AIS (Androgen insensitivity syndrome), einem X-chromosomal rezessiv vererbten Defekt des AR, kann die Wirkung von Androgenen in den genitalen und den extragenitalen Zielgeweben nur sehr bedingt oder gar nicht erfolgen (Brinkmann et al. 1996; Nitsche und Hiort 2000). Aufgrund unterschiedlicher Ausprägungsformen, die durch Lage und Umfang der Mutation im AR bedingt sind, werden verschiedene Subgruppen definiert (Holterhus et al. 1999; Holterhus et al. 2005 (II); Holterhus et al. 2005 (III)).

Bei CAIS (complete androgen insensitivity syndrome), auch testikuläre Feminisierung genannt, unterbleibt die Virilisierung komplett. Die Vagina endet blind, durch Bildung von AMH im Hoden verkümmert das Müller'sche Gangsystem, Uterus und Eileiter fehlen somit. Trotz eines männlichen Genotyps entstehen normale weibliche externe

Geschlechtsmerkmale. Da das Testosteron durch Aromatisierung in Estradiol umgewandelt wird, wird eine normale Brustentwicklung beobachtet. Die androgene Wirkung des T ist durch den AR-Defekt blockiert. Dies ist auch an der geringen Körperbehaarung sichtbar. Diese Personen werden auch als „46,XY Frauen“ bezeichnet.

PAIS (partial androgen insensitivity syndrome) stellt eine männliche Untermaskulinisierung dar. Die Abstufungen erfolgen nach Sinnecker je nach Ausprägung der Genitalentwicklung in fünf Typen (Typ V: unauffällig weibliches Genitale; Typ I: phänotypisch männliche Genitaldifferenzierung) (Sinnecker et al. 1997). Die unterschiedlichen Phänotypen basieren auf Unterschieden der Testosteron-Biosynthese, dem Metabolismus von T zu DHT und funktionell durch unterschiedliche Mutationen im aktivierten AR. Individuelle Faktoren wie AR-Coregulatoren scheinen ebenfalls bedeutsam.

Bei der Gruppe von Patienten, welche die klinische Diagnose der Androgenresistenz aufwiesen, konnte eine Vielzahl von Mutationen im AR als Ursache für unterschiedliche Virilisierungsdefizite beschrieben und in einer internationalen Datenbank gesammelt werden (Gottlieb et al. 2004) (www.mcgill.ca/androgendb/).

Die in der Forschergruppe untersuchten Patientengruppen sind zum Teil sehr inhomogen und in viele kleine und seltene Untergruppen gestreut. Aufgrund des komplexen Netzwerks der Signalkaskaden können Mutationen an verschiedensten Stellen auftreten und somit zu den verschiedensten phänotypischen Ausprägungen führen. Aus diesem Grund werden verschiedene Mutationen des AR (u.a. CAG-Repeat und GGN-Repeat) bereits mittels Klonierung und Transfektionsuntersuchungen an Genitalhautfibroblasten einer genaueren funktionellen Analyse unterzogen (Werner et al. Manuskript in Vorbereitung).

Die Überprüfung des AR-Gens auf mögliche Mutationen stellt momentan die Basis für die Diagnose der Androgenresistenz und damit auch für die genetische Beratung betroffener Individuen und deren Familien dar. Für die zentralen klinischen Entscheidungen wie die Geschlechtszuordnung des Individuums oder die Frage nach einer Gonadektomie (Entfernung der Gonaden) steht die aktuelle Restfunktion des AR und somit die mögliche genitale Responsivität bei potentieller Androgenbehandlung im Mittelpunkt des klinischen Interesses (Sinnecker et al. 1997). Die Restfunktion des AR lässt sich aufgrund der Mutationen im AR-Gen häufig nicht ausreichend beurteilen, da sich die Phänotypen betroffener Patienten selbst bei gleicher Mutation erheblich unterscheiden können (Rodien et al. 1996; Evans et al. 1997; Holterhus et al. 2000). Dies gilt sowohl für das Ausmaß der embryonal bereits abgelaufenen Androgenwirkung („organizational“) als auch für die momentan bestehende Restfunktion des AR im Rahmen aktueller Androgenwirkungen („activational“), z.B. während der Pubertät.

Aufgrund von neueren Arbeiten (Shaffer et al. 2004) und auch aufgrund von Vorarbeiten in der eigenen Gruppe (Holterhus et al. 2002; Holterhus et al. 2003) muss davon ausgegangen werden, dass Virilisierungsstörungen auf unterschiedlichen pathophysiologischen Ebenen zu verschiedenen Expressionsphänotypen der Zielzellen führen können. Diese Ebenen umfassen die Abwesenheit aller bzw. einzelner Androgene, ein unterschiedliches Serumprofil der vorliegenden Androgene und eine oder mehrere Mutationen in einem oder mehreren Schlüsselenzymen der Sexualsteroid-Biosynthese. Dies bedeutet, der AR als Molekül ist nur einer von mehreren beteiligten Faktoren.

Auch gewebespezifische Androgenwirkungen sind bekannt. Sie sind vermutlich auf inhärente Unterschiede im biochemischen und molekularen Milieu jedes Gewebes zurückführbar. Diese Gewebespezifität basiert u.a. auf dem jeweiligen Metabolismus, welcher wiederum durch die unterschiedliche Expression und Wirkung von Steroid-metabolisierenden Enzymen wie der 5-alpha-Reduktase-Typ-II (Anderson 2003) gesteuert wird. Des Weiteren kann der AR-Signalweg auch durch andere gewebespezifische Signalwege in der gleichen Zelle bzw. dem gleichen Gewebe beeinflusst werden. So kann z.B. ein ligandenunabhängiger AR-Signalweg durch cross-talk mit dem Protein-Kinase-Aktivator (IGF1, EGF, KGF) (Culig et al. 1994) oder dem Interleukin 6-Signalweg (Yang et al. 2003) induziert werden. Der lokale Aktivierungsstatus dieser Signalwege könnte bei der Gewebe-Spezifität von Androgenwirkungen mitwirken.

Verschiedene Cotransfektionsuntersuchungen zeigten bereits das breite und komplexe Spektrum der zellulären Androgen-Signaltransduktion. Diese Signalkaskade ist eingebettet in ein feines, eng verzweigtes Netzwerk aus Coaktivatoren, Corepressoren, Chaperonen und Cochaperonen (Heinlein und Chang 2002; Jenster 1998; Shatkina et al. 2003).

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Frage, inwieweit man bei den unterschiedlichen Phänotypen auf genomweiter Expressionsebene spezifische Übereinstimmungen bei Markergenen finden kann. Kann ein ähnliches oder sogar gleiches Expressionsmuster trotz unterschiedlichem Genotyp entstehen? Eine genomweite Untersuchung nach weiteren Einflussfaktoren mittels Microarrays ermöglicht eine erweiterte Berücksichtigung der Komplexität der Zusammenhänge in der Zelle. Die bisherigen Einzelgen-Analysen (Real-Time-PCR, Northern-Blots, Transfektionen, Sequenzierungen) können diese eng vernetzten zellulären Abläufe nur bezogen auf einen einzelnen Pathway wiedergeben.

AR-Coregulatoren

Die Untersuchung einzelner AR-Coregulatoren hat bisher nur selten zu klinisch relevanten Erklärungsmodellen für die Implementierung eines spezifischen Androgen-Insensitivitäts-Syndrom-(AIS)-Phänotyps geführt (Adachi et al. 2000). Dies liegt auch daran, dass aufgrund des Designs dieser grundlagenwissenschaftlich angelegten Arbeiten (z.B. Reporter-Gen-Assays in immortalisierten, nicht humanen Zelllinien) ein Rückschluss auf die klinische Herkunft der Proben und somit auf den Erkrankungstyp des jeweils betroffenen Patienten weder vorgesehen noch möglich ist.

Das auf Cotransfektionsuntersuchungen und Mutationsanalyse aufbauende Modell des AR weist auf die Komplexität des Netzwerks der zellulären Androgensignaltransduktion hin. Diese Signalkaskade basiert auf einem engen Zusammenspiel des AR mit Coaktivatoren, Corepressoren, Chaperonen und Cochaperonen. Die Interaktion des AR mit coregulatorischen Proteinen ist wahrscheinlich ein sehr wichtiger Faktor in der Spezifität von Androgenwirkungen. Coregulatoren sind Proteine die mit Kernrezeptoren interagieren. Hieraus resultiert eine Transaktivierung (Coaktivator) oder Transaktivierungshemmung (Corepressor) von spezifischen Zielgenen (McKenna et al. 1999 (I); Heinlein und Chang 2002; Linja et al. 2004). Die basale Transkriptionsrate dieser Gene bleibt jedoch davon unberührt (McKenna et al. 1999 (II)). In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass die Transkriptionsförderung mittels des AR erheblich durch Coregulatoren beeinflusst wird (Moilanen et al. 1999). Unterschiede in der Expression von AR-spezifischen Coregulatoren konnten bereits mit Unterschieden im biologischen Verhalten von Prostatakarzinomen korreliert werden (Linja et al. 2004). Dies könnte u.a. die Entwicklung bzw. die Fortentwicklung von androgenunabhängigen Tumorzellen erklären (Linja et al. 2004).

Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass das individuelle zelluläre Repertoire an exprimierten AR-spezifischen Coregulator-Proteinen eine wichtige Rolle bei der spezifischen Antwort auf Steroidhormone spielt (Truss und Beato 1993; McEwan 2004).

DePrimo und Mitarbeiter haben 2002 ein breites und hoch reproduzierbares Transkriptionsmuster der humanen Prostata-Carcinoma-Zell-Linie LNCaP, basierend auf der zellulären Antwort auf Androgen-Behandlung, nachweisen können. Diese Untersuchungen wurden mit 24.000-Druckpunkt-cDNA-Microarrays (24K) durchgeführt (DePrimo et al. 2002). Im Gegensatz dazu konnten in parallel durchgeführten Experimenten unter den gleichen Bedingungen mit Genitalhautfibroblasten (GSF), die zuvor normal entwickelten Männern entnommen wurden, trotz nachgewiesener AR-Expression keinerlei Veränderungen im genetischen Profil nachgewiesen werden (Holterhus et al. 2003).

Zu dieser klaren Differenz in der zellulären Antwort auf Androgengabe zwischen GSF und LNCaP-Zellen könnte ein Unterschied im Coregulator-Milieu der Zellen als Ursache

beitragen. Für die Überprüfung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit eine in-silico-Analyse der Genexpressionsprofile durchgeführt. Hierbei dienten die in der McGill AR Datenbank (Gottlieb et al. 1998) gesammelten AR-Coregulator-Gene als Matrix für eine supervidierte Clusteranalyse mittels spezifischer Genliste. Die dort aufgeführten Coregulatoren wurden in der SOURCE-Datenbank (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/>) (Diehn et al. 2003) einer genauen Überprüfung unterzogen. Als Analysematerial dienten sowohl bereits unter anderen Aspekten ausgewertete und publizierte als auch neue, noch nicht publizierte Microarrays.

Genregulation in Patienten

In den letzten Jahren wurde von führenden Experten aufgezeigt, dass auch die bereits abgelaufenen, „organisierenden“ Langzeiteffekte der Androgene für Struktur und Funktion (z.B. Verhalten) von hoher Relevanz sind (Collaer und Hines 1995). Dies wurde insbesondere auch auf dem in Lübeck von der Forschergruppe ausgerichteten internationalen Symposium „Intersex – From Gene to Gender“ herausgestellt (Hines 2004; Drews 2004).

Die Androgenbindungsuntersuchung an Genitalhautfibroblasten stellte eine der ersten funktionellen Untersuchungen zur Abschätzung der Androgenresistenz bei betroffenen Patienten dar (Pinsky et al. 1977). Da bei diesen Analysen jedoch nur die Ligandenbindungseigenschaften des AR berücksichtigt werden können, besteht lediglich eine eingeschränkte funktionelle Aussagekraft für Patienten.

Die klinische Behandlung der Androgenresistenz benötigt jedoch Aussagen zur individuellen Androgenwirkung, da z.B. die Geschlechtszuweisung hiervon beeinflusst wird. Daher zielen die beiden Microarray-Projekte der Forschergruppe auf die individuelle Analyse und Kategorisierung der zellulären Resultate auf Genomebene im Androgenzielgewebe betroffener Patienten und Normalpersonen.

In einem parallel zu dieser Promotionsarbeit stattfindenden Projekt hat Frau Dr. Deppe gezeigt, dass mittels eines Zellkulturmodells, basierend auf genitalen Hautbiopsien betroffener Patienten, die phänotypische Wirkung von Androgenen in Form zellulär implementierter Expressionsprofile mit cDNA-Microarrays abgebildet werden kann (Manuskript in Vorbereitung). Biopsien im Genitalbereich sind jedoch sehr invasiv. Aus ethischen und rechtlichen Gründen kann eine solche Biopsie nur in Begleitung einer stattfindenden Operation, meistens der geschlechtsfestlegenden Operation, erfolgen. Die Zellen liegen somit meistens erst retrospektiv, d.h. nach erfolgter Entscheidung zu einer Geschlechtszugehörigkeit vor (Hiort et al. 2005). Diese Entscheidung basiert i.d.R. auf

medizinischen-operativen Gesichtspunkten. Die molekulare Eingruppierung anhand von Expressionsprofilen spielt bisher keine Rolle.

Im Gegensatz zu einer Biopsie, speziell im Genitalbereich, ist die Entnahme einer Blutprobe für den Patienten wesentlich weniger belastend. Das Ziel ist die mittelfristige Entwicklung eines pathophysiologisch gut untersuchten Modells der individuellen, aktuellen AR-Restfunktion und der embryonal abgelaufenen Androgenwirkung. Die Entnahme von Blut-Zellmaterial ist wenig invasiv und die Beurteilung des Probenmaterials kann bereits vor Durchführung einer geschlechtszuordnenden Operation zur Verfügung stehen.

In diesem Projekt wurde der Fokus auf die Nutzung von Blutproben gelegt, da Blut als androgenes Zielgewebe bereits mehrfach beschrieben wurde (Stoeger et al. 1988; Kanda et al. 1996; Polan et al. 1988; Angele et al. 1999; McCrohon et al. 2000). Da Vollblut aus einer Mischung verschiedenster Zelltypen und Bestandteile besteht, wurden für die Expressionsuntersuchungen die Blutleukozyten (PBMC = peripheral blood mononuclear cells) als relativ homogene Zellgruppe eingesetzt.

Im Laufe dieser Arbeit konnten Whitney und Mitarbeiter mit Hilfe von cDNA-Microarray Untersuchungen zeigen, dass sich die PBMC-Expressionsprofile von Männern 46,XY und Frauen 46,XX durch spezifische, hoch reproduzierbare basale Expressionsmuster unterscheiden lassen (Whitney et al. 2003). Die wesentlichen Unterschiede beruhen auf X- und Y-chromosomal exprimierten Genen. Dies gilt jedoch nicht für alle beschriebenen Gene. Weitere Unterschiede in der Expression könnten aufgrund persistierender aktueller Hormonwirkungen verursacht werden oder auf zurückliegende, „prägende“ Effekte von Sexualsteroiden während sensitiver Entwicklungsphasen, zurückzuführen sein.

Patienten mit genau bekannten Mutationen als Ursache für genetisch determinierte Erkrankungen wurden bisher nur selten auf der Ebene des gesamten bekannten Transkriptom untersucht. Die bisherigen Arbeiten wiesen jedoch auf die potentiell sehr hohe klinische Relevanz diagnostisch verwertbarer Genexpressionsmuster hin (Watts et al. 2002; Hedenfalk et al. 2002; Pavey et al. 2004; Kote-Jarai et al. 2004).

In der Literatur liegt der Schwerpunkt von Untersuchungen zum Androgenrezeptor auf der immunmodulatorischen Rolle von Androgenen im Blut. Diese können geschlechtsspezifische Neuerkrankungen und Verläufe verschiedener Erkrankungen beeinflussen. Hierzu gehören Autoimmunerkrankungen wie z.B. Lupus erythematoses oder chronisch rheumatoide Polyarthrit, das hereditäre Angioödem, die Atherosklerose, Politrauma oder Sepsis. Die Geschlechtsspezifität dieser Erkrankungen weist auf die hohe klinische Relevanz androgener Wirkungen in Blutzellen hin, welche weit über Fragen der Geschlechtsentwicklung alleine hinausgehen. In den zitierten Untersuchungen erfolgte teilweise eine funktionelle Charakterisierung der PBMC im Hinblick auf die androgen-

regulierte Expression einzelner, ausgewählter Gene (Miyagi et al. 1993; Morishita et al. 1999). So inhibiert Testosteron in PBMC die Bildung von IgG und IgM (Kanda et al. 1996). Die bisherigen Vorarbeiten in der Forschergruppe stimmen mit diesen Befunden überein (Hoppe et al. 2003; Hoppe et al. 2004; Hoppe et al. 2006). Hierbei konnte auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, dass in Blutzellen sowohl der AR als auch verschiedene Isoformen der sexualsteroid-metabolisierenden 17 β -Hydroxisteroid-Dehydrogenasen transkribiert werden. Zudem scheint eine geschlechtsspezifische AR-Expression vorzuliegen (Hoppe et al. 2003).

Ziel dieses Teilprojektes war die individuelle Analyse und Kategorisierung von Genexpressionsprofilen von betroffenen Intersex- und Normalpersonen auf Genomebene.

Einfluss von DHT auf PBMC-Expressionsprofil

Neben dem Vergleich von auf Blutproben basierenden geschlechtsspezifischen Expressionsmustern, war ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit der Einfluss von Steroidhormonen auf das Expressionsprofil von Blutzellen.

In PBMC konnten Kuhnle et al. mit [3 H] markierten Testosteron bzw. DHT Bindungsstellen für Androgene nachweisen (Kuhnle et al. 1994). Cutolo und Mitarbeiter konnten mit Antikörpern zeigen, dass Makrophagen den AR exprimieren (Cutolo et al. 1996).

In diesem Zusammenhang war für die vorliegende Arbeit die Wirkung von DHT auf die PBMC interessant. Die Inkubation einer PBMC-Kultur mit DHT müsste aufgrund des Vorhandenseins des AR zu einer Veränderung im Expressionsprofil führen. Als Kontroll-Stimulus wurde Lipopolysaccharid (LPS) eingesetzt. LPS als Stimulus führt bei PBMC zu erhöhter Il-6- und TNF-Sekretion (Breuninger et al. 1993; Delpedro et al. 1998). Eine Veränderung des Expressionsprofils der Blutzellen bei Steroidgabe könnte mittelfristig bei Patienten erste Hinweise auf die Wirkung von spezifischen Steroiden auf deren Hormon- und Stoffwechselhaushalt geben.

Microarray-Technologie

Die Microarray-Technik ist zusammen mit der ebenfalls semiquantitativen Real-Time-PCR (RT-PCR) in den nächsten Jahren eine der beiden Schlüsseltechnologien in der Molekularbiologie. Anstelle der bisherigen Einzelgen-Untersuchungen tritt zunehmend die Hochdurchsatz-Expressionsanalyse von hunderten oder tausenden von Genen parallel innerhalb eines Experimentes. Diese Technik ermöglicht Momentaufnahmen (screenshots) der molekulargenetischen Situation einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Hierbei werden die komplexen Strukturen in der molekularen Steuerung der einzelnen Gene und Gengruppen in der Zelle durch den Gesamtanblick berücksichtigt.

Funktionelle Genexpressions-Studien ermöglichen Einblicke in die Änderungen der Transkriptionsmuster, die durch Entwicklungsprozesse, physiologische Stimuli oder Krankheiten hervorgerufen werden. Sie erlauben zudem ein besseres Verständnis von funktionellen Signalwegen und die Steuerung von intrazellulären Prozessen.

In diesem Projekt wurden 43K-cDNA-Microarrays mit 43.000 Druckpunkten (32.968 Unigene Cluster) der Stanford Microarray Facility (SMF) verwendet.

Ein MA-Experiment stellt die klassische Hybridisierungs-Reaktion „Probe-Sonde“ in einem stark vergrößertem quantitativen Maßstab auf reduziertem Raum dar (Bild 2.3). Aus dem zu untersuchenden Probenmaterial wird die RNA isoliert und in einer Reversen Transkription zusammen mit Fluoreszenz-markierten Bausteinen (z.B. Cy3-dUTP, Cy5-dUTP, Alexa-dUTP) in eine cDNA umgeschrieben. In einer parallelen Reaktion wird eine Referenz-RNA entsprechend mit einem anderen Fluoreszenz-markierten Baustein ebenfalls in cDNA transkribiert. Diese beiden markierten Sonden werden zusammen auf den MA überführt. Die kompetitive Hybridisierungsreaktion erfolgt über einen bestimmten Zeitrahmen und bei einer spezifischen, vom Hybridisierungspuffer und der MA-Oberflächenchemie abhängigen Temperatur (Hegde et al. 2000). Nach der Hybridisierungsreaktion werden die Fluoreszenzen jedes Druckpunktes für jeden Farbstoff einzeln (Experiment und Referenz) mit einem Scanner gemessen. Bei dieser optischen Detektion wird die Fluoreszenzstärke für die Quantifizierung der Probenmenge verwendet.

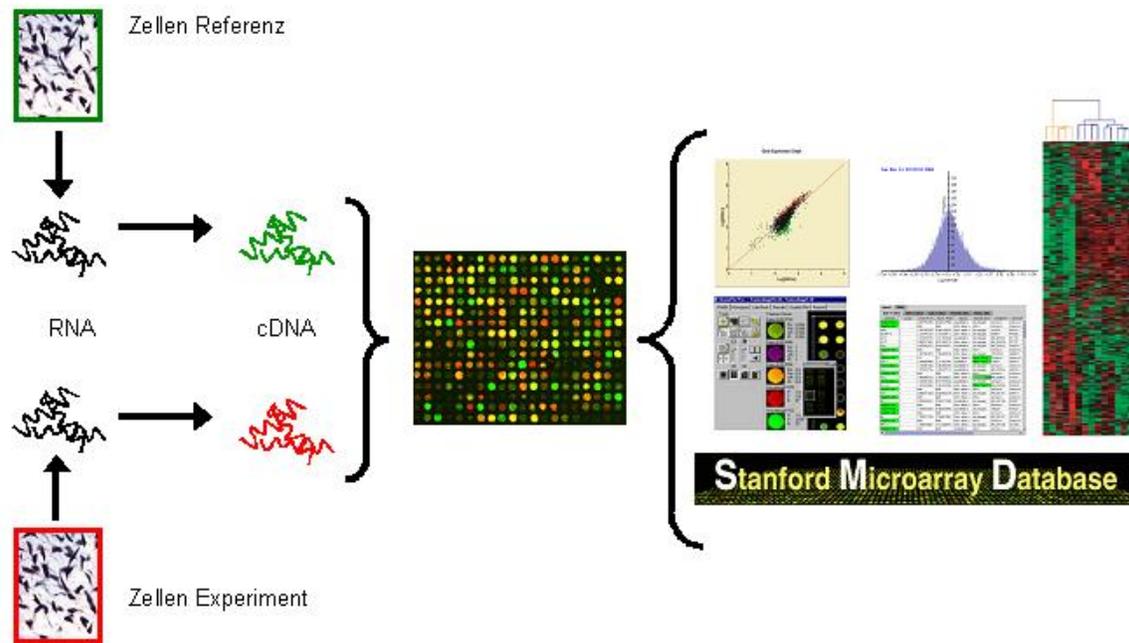


Bild 2.3: Schematische Darstellung des Ablaufs eines Microarray-Versuches von der RNA zu der Datenauswertung

Für die Vergleichbarkeit der Daten zwischen verschiedenen MA-Experimenten werden für jeden MA die beiden Messwerte für jeden Probenpunkt (Experiment/ Referenz) als Quotient (ratio) berechnet und somit relativiert. Die Referenz-Probe ist in jedem Experiment in gleicher Quantität und Qualität vorhanden (Typ-II-Experiment nach Eisen/ Brown (Eisen und Brown 1999)).

Eine Normalisierung der Messwerte ist nötig, um Artefakte in den Signalen zu reduzieren. Bestimmte Normalisierungsmethoden wie die Globale Normalisierung dividieren jeden Messwert durch den Mittelwert (mean) aller Messpunkte. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die meisten Gene keine signifikanten Veränderungen aufweisen (Quackenbush 2001).

Für die Datenanalyse ist eine enge Verknüpfung der Fachgebiete Medizin, Biologie und Bioinformatik nötig. Ein Genexpressionsprofil ist die Grundeinheit für die mathematische Analyse einer MA-Hybridisierung (Brodsky et al. 2004). Es gibt verschiedene Modelle und Algorithmen für Signifikanz-Tests, die speziell an die hohe Probenzahl der MA-Experimente adaptiert sind. Hierzu gehört SAM (significance analysis of microarrays) (Tusher et al. 2001). Für die Datenanalyse werden große zentrale online-Datenbanken wie z.B. der Gene-Expression-Omnibus (GEO) (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/) (Edgar et al. 2002), die Stanford Microarray Database (SMD) (<http://genome-www5.stanford.edu/>), die Yale University Microarray Database (<http://info.med.yale.edu/microarray/>), die Array-Express-Database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) (Brazma et al. 2003; Parkinson et al. 2005),

das Center for Cancer Research (<http://ncicarray.nci.nih.gov/>) oder der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Japanese Genome Net Service (www.genome.ad.jp/kegg/expression/) (Kanehisa et al. 2002) benötigt. Für die Auswertung der in der Forschergruppe verwendeten MA´s wurde die SMD (Gollub et al. 2003; Sherlock et al. 2001; Ball et al. 2005) verwendet. Sie ist mit zur Zeit etwa 50.000 MA´s von 34 Organismen eine der größten Datenbanken für MA´s weltweit.

Mittlerweile hat sich ein breites Spektrum an Einsatzgebieten für die Microarraytechnologie in der Medizin ergeben.

Hierzu gehören in der Carcinom-Forschung:

Prostata-Tumor (Henshall et al. 2003; Lapointe et al. 2004), Expressionsantwort humaner Prostatakrebszellen auf Androgene (DePrimo et al. 2002), folliculäre Lymphom-Biopsien (Bohen et al. 2003), Identifizierung von Mamma-Tumoren (Hedenfalk et al. 2001; Hedenfalk et al. 2003; Perou et al. 2000; Sorlie et al. 2001; Sorlie et al. 2003; Sotiriou et al. 2006; van't Veer et al. 2002), Mamma-Tumoren im Vergleich zu normalen Brust-Epithelial-Zellen (Perou et al. 1999), Estrogen-Rezeptor im Mamma-Tumoren (Creighton et al. 2006), melanome Krebstypen (Kim et al. 2002; Haqq et al. 2005), Darmkrebs (Alon et al. 1999), Ovarien-Krebs (Schaner et al. 2003), B-Zell-Lymphome (Alizadeh et al. 2000)

Krankheitsspezifische Expressionsprofile:

Alzheimer (Blalock et al. 2004), Duchenne Muskeldystrophie (Noguchi et al. 2003), Multiple Sklerose (Steinman und Zamvil 2003; Bompreszi et al. 2003; Stürzebecher et al. 2003), Pocken bei Makaken (Rubins et al. 2004), Rheumatoide Arthritis (Van der Pouw Kraan et al. 2003), Systemische Sklerose (Whitfield et al. 2003), Methode, um Krankheits-spezifische Gene zu erkennen (Li et al. 2004).

Allgemeine Zellfunktionen:

Detektion von RNA-Modifikationen (Hiley et al. 2005), Expression verschiedener humaner Gewebe (Shyamsundar et al. 2005), UV-Bestrahlung von Fibroblasten (Kote-Jarai et al. 2004), Strahlentherapie bei Lymphoblastoide-Zellkulturen (Rieger et al. 2004), microRNA in entwickelnden Säugergehirnen (Miska et al. 2004), genetische Steuerung des Haarwuchses mit time-course-Experimenten (Lin et al. 2004), lokalisationsspezifische Expressionsmuster von humanen Fibroblasten (Chang et al. 2002), humane Fibroblasten bei Serumgabe in Zellkultur (Iyer et al. 1999), DNA-Methylierung (Mund et al. 2005), Placenta (Sood et al. 2006).

Pharmakologie:

Drogen/ Arzneimittelentwicklung (Gmuender 2002), Toxikologie-Untersuchungen (de Longueville et al. 2003)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 46,XY Intersexualität aufgrund der molekularbiologisch und endokrinologisch sehr gut charakterisierbaren Gendefekte sowie der phänotypisch gut dokumentierten Unterschiede ein interessantes Ausgangsmodell für die Untersuchung androgen-vermittelter Expressionsprofile auf Genomebene und des Vergleichs zwischen verschiedenen Mutationen darstellt.

Neben der genetischen Eingruppierung der Patienten in bestimmte spezifische Gruppen könnten die hieraus gewonnen Erkenntnisse zukünftig zur Entwicklung eines spezifischen, thematisch eingegrenzten Themen-Microarrays „Androgenwirkung“ genutzt werden. Ein solcher LowDensity-Chip könnte anhand der ausgewählten, relevanten Gene möglicherweise die rasche Einordnung des vermuteten Defektes erlauben. Zudem ließe sich u.U. eine Aussage zu der Genotyp-Phänotyp-Korrelation machen.

Die Entwicklung verschiedener Diagnostik-MA's ist jedoch in nächster Zukunft nur langsam zu erwarten, da für die Zulassung von Microarrays als diagnostisches Werkzeug umfangreiche, kostenintensive Validierungsprozesse durchgeführt werden müssten. Zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Arbeit gibt es weltweit nur die Firma Agendia (www.agendia.com) in den Niederlanden, welche einen Brustkrebs-Diagnostik-Chip anbietet. Die Firma Roche stellte zudem Mitte 2005 in Zusammenarbeit mit Affymetrix das IVD- (invitro-Diagnostik)-zertifizierte Gene ChipSystem 3000Dx vor. Es enthält die bislang 33 wichtigsten Mutationen der beiden Gene CYP2D6 und CYP2C19 des P450-pathways.

FRAGESTELLUNG

Ziel dieser Arbeit ist es, die momentanen Analyse-Methoden für die Charakterisierung verschiedener Intersex-Ausprägungen durch Nutzung von Expressionsprofilen zu ergänzen.

1.)

Zielsetzung des ersten Projektteils war die in-silico Analyse von bereits mit anderen Methoden funktionell charakterisierten AR-spezifischen Cofaktoren der Androgensignalübertragung auf ausgewählten Fibroblasten-Microarrays. GSF-Zellen und LNCaP-Zellen exprimieren beide den Androgenrezeptor, jedoch zeigen nur die LNCaP-Zellen ein androgenresponsives Transkriptionsmuster. Hieraus ergibt sich die Frage, ob systematische Unterschiede in der gewebetypischen Expression von AR Coregulatoren beim Vergleich von GSF- und LNCaP-Zellen vorliegen könnten, die diese funktionellen Unterschiede erklären könnten.

2.)

Androgene führen embryonal zu einer geschlechtsdimorphen Gewebedifferenzierung. Lässt sich diese Wirkung anhand basaler Genexpressionsprofile von weiblichen Patienten mit XY-Karyotyp im Vergleich zu normalen männlichen Kontrollen am Beispiel mononucleärer Blutzellen nachweisen? Können im Expressionsmuster der PBMC mit dem Phänotyp (Virilisierung) und mit dem Karyotyp korrelierende Muster mittels MA-Analyse voneinander differenziert werden?

3.)

Eine weitere Fragestellung diente der funktionellen Charakterisierung der Androgenwirkung in PBMC zur Entwicklung eines in-vitro Modells der Androgenwirkung. Hierzu wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Dihydrotestosteron auf das Expressionsprofil von PBMC im Zellkulturmodell untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Chemikalien, Geräte und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten von den Firmen Amersham/ GE Healthcare (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), Biochrom (Berlin), Merck/ VWR (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen), Stratagene (Amsterdam, NL) sowie TIB MolBiol (Berlin) und entsprachen dem Reinheitsgrad „zur Analyse“. Benötigte Enzyme und ihre entsprechenden Puffer wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe) oder Roche (Mannheim) bezogen.

Alle Lösungen, die für die Arbeiten mit RNA vorgesehen waren, wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt oder mit DEPC-behandeltem H₂O angesetzt. Durch die Behandlung mit DEPC werden RNasen irreversibel inaktiviert. Den Lösungen wurden 0,1% (v/v) DEPC beigemischt, über Nacht unter dem Abzug gerührt und anschließend autoklaviert (Sambrook et al. 2001). Hierbei zerfällt DEPC in CO₂ und Ethanol. Glasgefäße, die für RNA-Arbeiten vorgesehen waren, wurden durch vierstündiges Erhitzen auf 180°C RNase-frei gemacht. Durch Autoklavieren werden Ribonukleasen nur kurzzeitig denaturiert, da die Enzyme sich anschließend wieder in ihrer normalen Struktur zusammenlagern und weiterhin aktiv sind.

Aufreinigungsschritte wurden mit Filtern von Schleicher & Schuell (Dassel) bzw. Aufreinigungssäulen von Qiagen (Hilden) und Millipore (Schwalbach) durchgeführt.

Zentrifugationsschritte im 15 ml-Falcon (Greiner, Frickenhausen bzw. Sarstedt, Nümbrecht) bzw. in Monovetten-Maßstab (Sarstedt) wurden mit einer Zentrifuge 5804R der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem Rotor A-4-44 durchgeführt, für die Verwendung von MA's wurde ein A-2-DWP-Rotor eingesetzt. Zentrifugationen mit 1,5 ml- bzw. 2,0 ml-Reaktionsgefäße wurden mit einer Eppendorf-Zentrifuge 5417R mit dem Rotor F-45-30-11 bzw. A-8-11 durchgeführt. Zudem wurden Geräte der Firmen Axon/ Molecular Devices (Union City, CA, USA), Beckmann-Coulter (Krefeld), Corbett-Research (Sydney, AUS), Heraeus Instruments/ Thermo (Langenselbold) verwendet.

Für die Durchführungen von Microarray-Experimenten wurde ein entsprechender Teil des Labors als Dunkelraum eingerichtet und vom restlichen Arbeitsbereich räumlich abgetrennt. Bei den Array-Hybridisierungen wurden Lifterslips von Erie (Portsmouth, NH, USA) eingesetzt.

3.1.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer hatten die folgenden Sequenzen:

Eberwine-Primer (oligo-dT(15)-T7) (TIB MolBiol), HPLC-gereinigt:

(5'-AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC-3')

TVN-Primer (TIB MolBiol), HPLC-gereinigt:

(5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV N-3')

Random-Hexamer-Primer (Roche):

pd(N)₆

Primer für ausgewählte Gene für RT-PCR (F: FAM; DB: Dabcyl quencher; TIB Molbiol):

CAV1-forward:	CGA TGA CGT GGT CAA GAT TGA CT
CAV1-reverse:	AGT ATT TCG TCA CAG TGA AGG TGG
CAV1-labeled:	F-ATG TGA TTG CAG AAC CAG AAG GGA CAC A-DB
FHL2-forward:	GCA GTG CGT TCA GTG CAA
FHL2-reverse:	CAG CAC ACT TCT TGG CAT ACA AG
FHL2-labeled:	F-AAG CAG TTC AGG CAG TAG GCA AAG TCA T-DB
NCOA2-forward:	ACA GAT CAG CAT GAC
NCOA2-reverse:	AGC AGT GTC AGC AAT ATT TCC GT
NCOA2-labeled:	F-TCC TGC TTA ATC ATA TCC ATTCCA GGC AGC T-DB
FKBP4-forward:	GCA CTG TGT ACT TCA AGG AAG GTA
FKBP4-reverse:	CTT TCT GTG CTT CCT CAT TGG A
FKBP4-labeled:	F-ACT CAT ATT CCA GCC AAG ACA CGA TCT TCT-DB
TBP-forward:	CAC GAA CCA CGG CAC TGA TT
TBP-reverse:	TTT TCT TGC TGC CAG TCT GGA C
TBP-labeled:	F-TGT GCA CAG GAG CCA AGA GTG AAG A-DB

3.1.3 cDNA-Microarrays

Die in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Microarrays wurden von der Microarray-Facility der Stanford-University, California, USA bezogen. Die MA's beinhalten 43.000 Sequenzvalidierte PCR-Amplifikate humaner cDNAs, die 32.968 Unigene Cluster repräsentieren. Die chemische Oberflächenbeschichtung bestand aus Poly-L-Lysin bzw. Aldehyd bei den Corning ULTRA GAP-Objekträgern.

3.2 Herkunft der verwendeten Zellen

3.2.1 Genitalhautfibroblasten und LNCaP Zellen

Die Versuchskonzepte sind durch das Ethik-Komitee der Medizinischen Universität zu Lübeck zugelassen worden. Patienten und Personen, deren Biopsien für die Versuche dienten, wurden ausführlich aufgeklärt.

Das verwendete humane Zellmaterial (hVHF-Primärkulturen) stammte von Vorhautbeschneidungen oder medizinisch induzierten Korrekturoperationen. Humane Prostatakarzinomzellen aus linken supraclaviculären Lymphknoten-Metastasen (LNCaP-Zellen) wurden von der American type culture collection (ATCC) bezogen. Die Zellkulturen wurden entsprechend der ethischen Verpflichtungen kultiviert und gehandhabt.

3.2.2 Humane PBMCs

Sämtliche Versuche mit Blutzellen sind durch das Ethik-Komitee der Medizinischen Universität zu Lübeck genehmigt. Patienten und Personen, deren Blut als anonymisierte Normalkontrolle diente, wurden ausführlich aufgeklärt und haben eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet, die jederzeit widerrufen werden kann. Für die Versuche wurden humane Leukozyten aus peripherem Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) verwendet. Bei der Bearbeitung der Blutproben und der Entsorgung der Blutüberstände wurden die Sicherheitsstandards der Stufe 2 gemäß TRBA100 (Kapitel 6.1.2.1, unbekanntes humanes Probenmaterial) eingehalten.

3.3 Kulturbedingungen, Nährmedien und Hormone

3.3.1 hVHF und LNCaP-Zellen

Für die Kultivierung der hVHF wurde phenolrotfreies Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) F12-Medium (Gibco) mit 12.9% Fötalem Kälberserum (FCS) (Gibco) und 1x Penicillin-Streptomycin (PenStrep) (Gibco) eingesetzt. Diese Zellen wurden im Labor von Jim Brooks in der Abteilung für Urologie an der Universität Stanford von Prof. Paul-Martin Holterhus kultiviert. Sie wuchsen in 150 cm² Petrischalen bei 37°C und 5% CO₂ bis zum Erreichen des confluenten Stadiums (G₀-Arrest). Der Mediumwechsel erfolgte alle 48 h.

Bei den Hormon-Inkubationsversuchen wurden bei dem Mediumswechsel jeweils entweder EtOH in einer finalen Konzentration von 1:10.000 oder die entsprechende Konzentration DHT in EtOH gelöst (1:10.000) eingesetzt. In den Versuchsreihen mit unterschiedlichen Medien wurde anstelle des normalen FCS das Dextran/ Charkoal-gefilterte FCS (D/C FCS) (Gibco) eingesetzt. Die Zellen wurden trypsiniert und mit einer Dichte von 3.000 Zellen/ cm²

ausgesät. 24 h später wurde das Medium gewechselt, die Zellen dreimal mit D/ S-FCS-haltigem Medium gewaschen und weitere 24 h in Abwesenheit von Androgenen kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit entsprechenden Konzentrationen an DHT (100 nM und 1000 nM) bzw. Methyltrienolon (0.001, 0.01, 0.1, 1 und 10 nM R1881).

Die Kultivierung von LNCaP-Zellen erfolgte mit leichten Modifikationen, aber identischem Hormoninkubationszeitraum

3.3.2 PBMC

Die PBMCs wurden für die Hormoninkubationsexperimente für 24 h in phenolrotfreiem RPMI1680 (Sigma) mit 10% Kohle-gefiltertem FCS Gold (PAA, Cölbe) und 1x PenStrep (Sigma) kultiviert. Das hierbei als Stimulus eingesetzte Hormon Dihydrotestosteron (DHT) (Sigma) war in 100% EtOH gelöst. Verwendet wurden die Konzentrationen 0,005 nM, 0,05 nM, 0,5 nM, 5 nM und 50 nM DHT. Als Kontrollstimulus dienten zum einen 30 ng/ ml Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma), zum anderen entsprechende EtOH-Verdünnungen. Die Inkubation der PBMCs erfolgte über Nacht in 15 ml-Falconröhrchen in einem Rotator (Stuart Rotator SB3), der in einem CO₂-Brutschrank (Heraeus Instruments BB6220) (37°C; 5% CO₂) stand.

3.4 RNA-Isolierung

3.4.1 hVHF

3.4.1.1 Probennahme hVHF

Nach dem letzten Mediumswechsel wurden die Zellen für 96 h nicht mit neuem Medium versetzt, anschließend erfolgte der Zellaufschluß.

3.4.1.2 RNA-Isolierung hVHF

Die RNA-Isolierung erfolgt mit dem mRNA-Fast-Track-Kit (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben mit leichten Modifikationen.

3.4.2 PBMC

3.4.2.1 Probennahme PBMC

Die Blutentnahme bei den Probanden erfolgte möglichst standardisiert gegen 13:00 mit einer Schwankungsbreite von 1-2 h. Das Blut wurde mit 0,8 mm S-Monovetten-Kanülen (Sarstedt) sowie 9 ml-Kalium-EDTA-S-Monovetten (Sarstedt) durch einen Arzt abgenommen und bis zu der Isolation der PBMC auf Eis gelagert.

3.4.2.2 PBMC-Isolierung

Von dem abgenommenen Blut wurde zunächst ein kleines Blutbild angefertigt. Dies erfolgte durch einen automatischen Zellzähler (Beckmann-Coulter).

Das Plasma wurde durch Zentrifugation (2000 rpm/ 720 g; 10 min; 4°C) abgetrennt und entfernt. Das Serum wurde mit je 3 ml PBS verdünnt und in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen (Greiner) auf 5 ml Ficoll (Biochrom) aufgeschichtet. Nach einer erneuten Zentrifugation (2300 rpm/ 950 g; 20 min; 4°C) wurde der Überstand verworfen, die zelluläre Interphase in ein neues Röhrchen überführt und mit 6 ml PBS gewaschen (1600 rpm/ 460 g; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen mit ca. 1 ml PBS resuspendiert, in ein 2,0 ml-Reaktionsgefäß überführt und der Überstand verworfen (1800 rpm/ 350 g; 10 min; 4°C).

PBS-Puffer (pH 7,2)

(Fertigpuffer aus der Krankenhaus-Apotheke der Universität zu Lübeck):

0,07 M NaCl

0,57 mM K_2HPO_4

1,34 mM KCl

3,23 mM $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$

3.4.2.3 RNA-Isolierung PBMC

Nach der Isolierung der PBMCs aus EDTA-Vollblut erfolgte die Zell-Lyse durch Zugabe von je 1,4 ml TRIZOL (Invitrogen) pro 2,0 ml-Reaktionsgefäß. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT (vortexen) erfolgte die Zugabe von je 0,3 ml Chloroform (Merck). Die Proben wurden 15 s durchmischt und für 2-3 min bei RT inkubiert.

Die Phasenauffrennung erfolgte durch eine Zentrifugation (10.000 g; 25 min; RT) in einem Ausschwingrotor A-8-11 (Eppendorf). Die RNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues 2,0 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Vol 3 M NaAcetat (pH 5,0) und 2,5 Vol 95% EtOH gefällt und gewaschen. Die Resuspension der RNA erfolgte in 100 µl Wasser (Gibco). Die Probe wurde nach einer Aufreinigung mittels RNeasy-Mini-Säule (Qiagen) anschließend bei -80°C gelagert.

3.4.3 RNA-Kontrolle

Die isolierte RNA wurde mit einem Bio-Photometer (Eppendorf) auf Reinheit und Konzentration überprüft.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA-Proben wurde ein denaturierendes Formaldehydgel verwendet. Die Aldehyd-Gruppen bilden mit Adenin, Guanin und Cytosin Schiff'sche Basen. Die Entstehung von Sekundärstrukturen der RNA wird hierdurch

verhindert, da die Aminogruppen keine Wasserstoffbrückenbindungen mehr ausbilden können (Lottspeich und Zorbas 1998).

Für die Elektrophorese (80 V; 1 h) wurden die RNA-Proben mit der vier- bis fünffachen Menge Formaldehyd-Ladepuffer versetzt. Nach der Denaturierung bei 65°C für 15 min im Thermoblock wurden die Proben gleich auf Eis gestellt und anschließend auf das Gel aufgebracht. Durch das im Ladepuffer enthaltene Ethidiumbromid konnte die RNA im Gel auf einem UV-Tisch direkt sichtbar gemacht werden.

10x MOPS-Puffer:

200 mM MOPS	(Merck)
10 mM EDTA	(Merck)
80 mM Na-Acetat x 3 H ₂ O	(AppliChem)
H ₂ O _{DEPC}	
pH 7,0	

1x MOPS-Laufpuffer:

10x MOPS-Puffer
H ₂ O _{DEPC}

Formaldehyd-Agarose-Gel:

1,5% (w/v) Agarose	(Sigma)
1x MOPS	
1,8% (v/v) Formaldehyd	(Merck)

1x RNA-Formaldehyd-Ladepuffer:

50% deionisiertes Formamid	(Merck)
20 mM MOPS-Puffer	
6 % Formaldehyd	(Merck)
H ₂ O _{DEPC}	
14% Glycerin	(Merck)
0,05% Bromphenolblau	
(Lagerung bei -20°C)	
Ethidiumbromid (1 µg/ µl) (je 0,5 µg pro Probe)	

3.4.4 Referenz-RNA

Als Referenz-RNA wurde die humane Common-Reference-RNA von Stratagene verwendet.

3.4.5 RNA-Amplifikation

Für die Amplifikation der RNA wurde das von der Gruppe um Eberwine (Van Gelder et al. 1990) publizierte Verfahren der linearen Amplifikation von RNA mittels T7-RNA-Polymerase als Grundlage genommen, modifiziert und den vorhandenen Möglichkeiten angepasst.

Die cDNA-Erststrangsynthese erfolgt in 0,5 ml-PCR-Gefäßen (Eppendorf). Das entsprechende Volumen für 3 µg Gesamt-RNA wurde mit 1 µg Eberwine-Primer (TiB MolBiol) versetzt und auf einen Gesamtansatz von 8 µl mit Wasser (Gibco) aufgefüllt.

Für die Denaturierung der RNA wurden die Proben in einem Mastercycler Gradient (Eppendorf) für 3 min bei 70°C erhitzt, für 3 min auf Eis gestellt und anschließend mit dem Erststrangsynthese-Mix versetzt. Nach erfolgter Erststrangsynthese für 90 min bei 42°C wurde die Zweitstrangsynthese nach Zugabe von entsprechenden Reagenzien für 120 min bei 15°C durchgeführt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7,5 µl 1 M NaOH mit 2 mM EDTA (Merck) abgestoppt, die Hydrolyse der RNA erfolgte durch Inkubation für 10 min bei 65°C.

Die doppelsträngige cDNA wurde mit 150 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1; Roth) vermischt und in ein 1,5 ml-Phase-Lock-Gel-Tube (Eppendorf) überführt. Nach einer Zentrifugation (16.000 g; 5 min; RT) wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die cDNA mit 7,5 M NH₄Acetat (AppliChem) und 100% EtOH für 30 min bei -80°C gefällt. Nach dem Waschen mit 70% EtOH wurde die Probe in 29 µl Wasser (Gibco) resuspendiert.

Die in-vitro-Transcription erfolgte für 5 h bei 37°C in einem Thermomixer comfort (Eppendorf). Die entstandene aRNA wurde einer Aufreinigung mit dem RNeasy-Mini-System (Qiagen) unterzogen. Anschließend erfolgte eine photometrische Mengenbestimmung.

cDNA-Erststrangsynthesemix:

4 µl 5x Erststrangpuffer	(Invitrogen)
2 µl 0,1 M DTT	(Invitrogen)
1 µl RNasin (40 U/ µl)	(Promega)
2 µl 10 mM dNTP-Mix	(Roth)
2 µl SuperScript TM -II (200 U/ µl)	(Invitrogen)

cDNA-Zweitstrangsynthesemix:

102 µl Wasser	(Gibco)
15 µl 10x PCR-Puffer	(Roche)
3 µl 10 mM dNTP-Mix	(Roth)
2 µl RNase H (1 U/ µl)	(Roche)
8 µl DNA-Polymerase-I (5 U/ µl)	(Roche)

in-vitro-Transkription:

4 µl 10x Transkriptionspuffer	(Roche)
4 µl 10 mM NTP Mix	(Roche)
3 µl T7-Polymerase (20 U/ µl)	(Roche)
29 µl H ₂ O (Gibco) mit enthaltener cDNA	

3.5 Vorbehandlung der Microarrays

3.5.1 Postprocessing der Microarrays

Das Originalprotokoll wurde von der Brown-Arbeitsgruppe in Stanford (<http://brownlab.stanford.edu/protocols.html>) übernommen, modifiziert und den Laborgegebenheiten angepasst.

Zunächst wurde das Feld der gedruckten cDNA-Proben auf dem MA von der Objektträgerrückseite mit einem Diamantschreiber an den Enden jeweils markiert. Zum Rehydrieren wurden die MA's mit dem Probenfeld nach unten auf eine Feuchtigkeitskammer (humid chamber, Sigma) gelegt, die mit 100 ml 1x SSC befüllt war. Die MA's wurden von oben mit einer 60 Watt-Glühbirne (Abstand ca. 40 cm) bestrahlt. Durch die Erwärmung erfolgte ein Rehydrieren der Druckpunkte bis diese leicht zu glänzen anfangen (ca. 12 min). Die MA's wurden anschließend auf einem in-situ-Adapter im Mastercycler Gradient (Eppendorf) für 3 s bei 75°C getrocknet (snap-dry). Die cDNA wurde mit einem UV-Crosslinker (Stratagene) mit 65 mJ auf der Glasoberfläche fixiert.

Die weiteren Schritte erfolgten nur mit den Poly-L-Lysin-Arrays.

Für sämtliche weitere Schritte wurden nur Glasgefäße verwendet, die lediglich für diesen Prozeß eingesetzt werden, da eine chemische Beschichtung der Oberfläche erfolgt.

Für das Post-Processing wurden 6 g Bernsteinsäure-Anhydrid (Sigma) in 325 ml 1-N-Methyl-2-pyrrolidinon (Sigma) gelöst und anschließend sofort 15 ml 1 M Natriumborat (pH 8,0) hinzugegeben. Diese Lösung wurde in eine rechteckige Glas-Färbe-Kammer überführt, in die dann der Träger mit den MA's gestellt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 15-20 min auf einer Wippe (Heidolph Duomax 1030) wurde der Träger mit den MA's in ein großes Becherglas (2 l, breite Form) mit 95°C heißem Wasser überführt und schüttelnd für 2 min inkubiert.

Nach mehrmaligem Tauchen der MA's in 95% EtOH wurden diese in einem sog. CombiSlide Adapter (Eppendorf) durch Zentrifugation (500 rpm/ 41 g; 5 min; RT) getrocknet. Bis zur Verwendung der MA's wurden diese in einem Exsikkator mit Trocknungsgel gelagert.

3.5.2 Blockierung von MA-Oberflächen

Für die Reduzierung des Hintergrundes bei der eigentlichen Hybridisierungsreaktion wurden die MA's zunächst mit einer BSA-Lösung geblockt (Hegde et al. 2000). Dieser Vorgang darf maximal 1-2 h vor der Hybridisierung durchgeführt werden. Das Blocken wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner) bei 42°C für 45-60 min in einem Wasserbad durchgeführt. Nach dem Spülen mit Aqua dest. und mit Isopropanol (Objektträger mehrmals eintauchen), wurde der MA in einer Zentrifuge (700 rpm/ 80 g; 10 min; RT) getrocknet.

BSA-Blocking-Lösung (Hedge et al. 2000)

5x SSC (aus 20x SSC)

0,1% SDS (AppliChem)

1% BSA (Serva)

Aqua dest.

(sterilfiltriert mit 0,2 µM-Filter (Schleicher & Schuell))

20x SSC

3 M NaCl

0,3 M tri-Natriumcitrat * 2 H₂O

pH 7,0 mit HCl

3.6 MA-Hybridisierung

Für die Hybridisierungsreaktion wurden die 3 µg der aRNA-Probe und 50 µg der Referenz-RNA zunächst mit je 1/10 Vol 3 M NaAcetat (pH 5,0; Merck) und dem 2,5x Vol 95% EtOH bei -80°C gefällt und dann in 11,0 µl (aRNA) bzw. 13,0 µl (Referenz-RNA) H₂O resuspendiert.

Nach Denaturierung der RNA für 5 min bei 65°C erfolgte die Zugabe von 3,0 µl TVN-Primer (1,5 µg/ µl; TiB MolBiol) bei der Referenz-RNA bzw. 5,0 µl Random-Hexamer-Primer (1,5 µg/ µl) (Roche) bei der aRNA. Nach Inkubation von 10 min bei 70°C wurden die Proben für 3 min auf Eis gestellt und mit den Reagenzien für die reverse Transkription versetzt.

Die reverse Transkription erfolgte in zwei Schritten für je 1 h bei 42°C in einem Thermomixer 5436 (Eppendorf), nach der ersten Phase wurde je 200 U SuperScript™ II (Invitrogen) pro Probe hinzugefügt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15,0 µl 0,1 N NaOH (final 30 mM) gestoppt und die RNA durch Hydrolyse für 30 min bei 67°C chemisch zerlegt. Durch Zugabe von 15,0 µl 0,1 M HCl wurde der pH-Wert neutralisiert.

Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit YM-30-Microcon-Säulchen (Millipore). Hierzu wurde die Probe mit der Referenz und 380 µl TE-Puffer vermischt und im Microcon-Säulchen

zentrifugiert (12.000 g; 12 min; RT). Der gesamte Ansatz wurde dann mit 450 μ l TE (12.000 g; 14 min; RT) und mit 450 μ l TE und 30 μ g Human-Cot-1-DNA (Invitrogen) (12.000 g; 14 min + 1 min; RT) gewaschen. Die Eluate wurden bis zum Scannen der Arrays dunkel aufbewahrt.

Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß invertiert und zentrifugiert (12.000 g; 1 min; RT). Das probenhaltige Eluat (8-15 μ l) wurde auf ein Gesamtvolumen von 42 μ l mit Wasser (Gibco) aufgefüllt. Nach Zugabe des Hybridisierungsansatzes (18 μ l) erfolgte eine Denaturierung der Probe für 2 min bei 100°C und die Überführung des Hybridisierungsansatzes (60 μ l) auf das umgekehrt liegende, auf 65°C vorgewärmte Lifterslip-Deckglas (Erie). Der ebenfalls angewärmte MA wurde auf das Deckglas gelegt. Alternativ ist die Nutzung der Kapillarkräfte möglich. Hierbei werden MA und Lifterslip übereinander gelegt und dann die Hybridisierungslösung per Pipette in den Zwischenraum eingeführt (Sandwich-Technik). Nach Befüllen der beiden Reservoirs in der Hybridisierungskammer (Stanford University) mit je 20 μ l 3x SSC wurde der MA über Nacht (14-18 h) bei 65°C im Wasserbad (ISOTEMP 202S, Fisher Scientific) hybridisiert.

Nach der Hybridisierungsreaktion wurde der MA wie folgt gewaschen.

Er wurde in ein Becherglas mit 1x SSC/ 0,5% SDS (ca. 50-55°C) getaucht, bis sich das Deckglas löst. Nach ca. 30 s erfolgte die Überführung des MA's in die Kammer 2 (1x SSC/ 0,5% SDS; ca. 50-55°C). Nach jeweils 2 min erfolgte die Überführung mit dem Träger in Kammer 3 (0,2x SSC; RT), dann ohne Träger in Kammer 4 (0,2x SSC; RT), mit Träger in Kammer 5 (0,1x SSC; RT) und Kammer 6 (0,1x SSC; RT).

Vor dem Scannen des MA's wurde dieser mittels Zentrifugation (10 min; 41 g/ 500 rpm; RT) getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt.

* 50x dNTPs

(25 μ l jeweils von dATP, dGTP, dCTP (je 100 mM); dTTP 75 mM)

* Mastermix für RT + Markierung:

6,0 μ l 5x Erststrangpuffer	(Invitrogen)
3,0 μ l 0,1 M DTT	(Invitrogen)
0,6 μ l 50x dNTPs	(Roth)
0,5 μ l RNasin (40 U/ μ l)	(Promega)
2,0 μ l SuperScript™ II (200 U/ μ l)	(Invitrogen)
3,0 μ l 1 mM Cy3-dUTP bzw. Cy5-dUTP	(Amersham)

* Hybridisierungsansatz:

3,0 µl Poly-A	(10 µg/ µl)	(Invitrogen)
3,0 µl tRNA	(10 µg/ µl)	(Invitrogen)
10,2 µl 20x SSC		(Invitrogen)
1,8 µl 10% SDS		(AppliChem)

* Waschlösungen in Becherglas bzw. Glascontainern:

1x SSC/ 0,5% SDS	(Becherglas)	50-55°C
1x SSC/ 0,5% SDS	(Kammer 2), 1. Träger drin	50-55°C
0,2x SSC	(Kammer 3)	RT
0,2x SSC	(Kammer 4), 2. Träger drin	RT
0,1x SSC	(Kammer 5)	RT
0,1x SSC	(Kammer 6)	RT

3.7 Scannen der MA-Hybridisierung

Zum Scannen des MAs wurde ein GenePix Axon 4000B-Scanner und die Software GenePix 4.1 (Axon) verwendet. Der MA wurde über Kopf in den Trägerschlitten des Scanners eingeführt.

Zunächst erfolgte ein Vor-Scan mit geringer Auflösung (20 bzw. 40 µm) und einer mittleren Intensität (gain). Das für die Datenauswertung benötigte Bild des MA's wurde mit hoher Auflösung (10 µm) und einer von der Stärke der Hybridisierungssignale abhängigen Intensität aufgenommen (Cy3 680 bis 780 und Cy5 700 bis 850 Einheiten des photo multiplier tubes (PMT)). Die Archivierung der Messdaten erfolgte für beide Messkanäle jeweils mit einem 16 Bit-Graustufenbild, gespeichert als .tif-Datei.

3.8 Datenauswertung

Zunächst wurde im GenePix-Programm die Lage der einzelnen Druckpunkte festgelegt. Hierzu wurden beide Graustufenbilder einer Aufnahme zusammen geöffnet und die Zahl der Pin-Arrays (48) insgesamt, deren Verteilung (4 pro Reihe, 12 Reihen), die Zahl der Druckpunkte pro Pin-Array (900) und deren zweidimensionale Verteilung (30x30) definiert. Der mittlere Durchmesser der Druckpunkte betrug 100 µm, der Abstand zwischen den Punkten betrug 145 µm in jede Richtung. Das aus diesen Angaben resultierende Gitternetz (grid) sowie die Lage und Größe der einzelnen Druckpunkte wurde anschließend manuell überprüft bzw. angepasst und als GenePix-setting-Datei (.gps) gespeichert. Die Quantifizierung der Fluoreszenz-Werte und die Berechnung der statistischen Nebenwerte

erfolgte mit der Analyse-Funktion der GenePix-Software. Diese Werte wurden als GenePix-Result-Datei (.gpr) gespeichert. Für die Normalisierung der Messdaten und für die weitere Datenauswertung wurden pro MA diese vier Dateien (.tif-Datei von Cy3; .tif-Datei von Cy5; .gps-Datei und .gpr-Datei) mittels einer sftp-Verbindung auf den Zentralrechner der Stanford-Microarray-Database (<http://genome-www5.stanford.edu/>) überspielt.

Die weitere Datenauswertung erfolgte über eine normale, passwortgeschützte http-Verbindung zur Datenbank. Nach primärer Datenanalyse wurden die Datensätze zurück auf lokale Computer geladen und mit folgenden Auswerteprogrammen analysiert: Cluster; TreeView; ScanAlyze; SAM-Macro; MS-Excel.

Die Verknüpfungen der einzelnen Datensätze sowie die Filterbedingungen für die Datenauswertung zu den einzelnen Analysen sind im Diskussionsteil beschrieben, da diese Angaben für die Auswertung und Diskussion der Analysen essentiell sind.

3.9 Semiquantitative RT-PCR

Die Validierung mittels Real-Time-PCR wurde bei der Firma Bioglobe (Hamburg) durchgeführt. Die Reverse Transkription erfolgte unter Verwendung des RETROscript Kits (Ambion, Huntington, GB) gemäß dem Protokoll mit geringfügigen Modifikationen.

Pro Ansatz wurden 2 µg total-RNA, 0,5 µM dNTPs, 5 µM random-Decamere und 200 U der MMLV-RT-Polymerase eingesetzt. Nach Hitzedenaturierung (3 min, 85°C) erfolgte die Reverse Transkription für 1 h bei 44°C und anschließend eine Inaktivierung für 10 min bei 92°C. Die entsprechende Menge cDNA aus circa 12 ng total-RNA diente als Template für die Amplifikation. Der Gesamtansatz betrug 25 µl (0,4 µM Primer, 0,17 µM der spezifischen Probe und TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems)).

Die initiale Denaturierung wurde für 10 min bei 95°C durchgeführt, anschließend erfolgten einminütige Intervalle bei 60°C mit einem RotorGene RG-3000 Cyclyer (Corbett-Research). Die verschiedenen Transkriptionslevel wurden auf Basis der $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet (Livak und Schmittgen 2001). Das TATA-binding Protein (TBP) wurde als Housekeeping Gen für die Normalisierung verwendet.

4. Ergebnisse

Für die Anwendung der Microarray-Analytik ist die umfangreiche und sehr sorgfältige Etablierung von Labormethoden äußerst wichtig und zeitaufwendig. Um die Handhabbarkeit der zu erwartenden, enormen Datenmengen sicher zu stellen, wurden zunächst die biomathematischen Auswertungsmethoden aufgebaut. Da von Zellkulturen (GSF- und LNCaP-Zellen) bereits MA-Daten vorlagen (Prof. Holterhus, Projektarbeit Universität Stanford), wurden diese Datensätze verwendet, um die Cofaktoren des AR zu untersuchen. Hierbei sollte gleichzeitig die Frage geklärt werden, ob für die weiteren Fragestellungen der vorliegenden Arbeit Microarrays von Zellen oder ggf. Analysen von Blutproben zu bevorzugen sind.

4.1 AR-spezifische Cofaktoren

Die Interaktion des AR mit Coregulator-Proteinen ist ein sehr wichtiger Regulationsmechanismus in der spezifischen Wirkungen von Androgenen. Zur Untersuchung dieses Phänomens wurden in einer in-silico-Analyse die Expressionsprofile verschiedener Zell-Linien genomweit und auf Coregulator-Ebene miteinander verglichen. Gegenstand der Untersuchungen waren LNCaP- und GSF-Zellen, sowie deren Kulturbedingungen. Anschließend wurden die ermittelten Ergebnisse durch einen Abgleich mit MA Ergebnissen aus anderen Geweben sowie durch qPCR-Analysen relevanter Gene weiter verifiziert.

4.1.1 Genomweiter Vergleich von Androgenwirkung in LNCaP- und GSF-Zellen

Zur Darstellung der deutlichen Unterschiede im Expressionsprofil zwischen LNCaP- und GSF-Zellen unter Androgeneinwirkung dienten die Daten von 17 MA's. Diese Gruppe bestand aus zehn MA-Datensets der mit DHT bzw. Methyltrienolone (R1881, synthetisches Androgen) behandelten LNCaP-Zellen sowie aus sieben MA-Datensets von GSF-Zellen, die mit 100 bzw. 1000 nM DHT behandelt worden waren.

In einer nicht supervidierten Analyse erfolgte ein genomweiter Abgleich der Expressionsprofile und eine Filterung der Transkripte auf die Daten, deren mittlere (mean) Signalintensität über Hintergrund im Referenz-Kanal diesen um mindestens das 1,5-fache übertrifft. Eine weitere Daten-Reduzierung erfolgte durch die Auswahl nur derjenigen Transkripte, deren Daten auf 80% der MA's auswertbar waren und deren Expression sich in mindestens drei der 17 MA's um mindestens das $\log_2(1,6)$ -fache (etwa Faktor 3) über- oder unterhalb des allgemeinen Mittelwertes befanden. Bild 4.1.1 zeigt deutlich die reproduzierbar konzentrationsabhängige genomweite Transkriptionsantwort in LNCaP-Zellen auf R1881- und DHT. Dieses Antwortmuster erfolgte unabhängig von der Hybridisierungsstrategie (Typ 1

oder Typ 2 Experiment), was die Reproduzierbarkeit der Daten durch unabhängig voneinander durchgeführte Experimente noch zusätzlich verdeutlicht.

Ein Drittel der geclusterten 382 Transkripte zeigte eine klare Heraufregulation in LNCaP-Zellen (rot markiert) während der andere Teil der Transkripte deutlich herunterreguliert ist (grün markiert). Bekannte androgen-regulierte Gene wie das KLK3, das Tumor Protein D52 (TPD52), das HERPUD1, das ANKH, die Serin Threonine Kinase 39 oder das TMEPAI werden in der Clusteranalyse aufgeführt und sind somit Teil des Androgen-Response-Programmes. Sie zeigten in allen LNCaP-Experimenten unabhängig voneinander eine konsistente und konzentrationsabhängige Heraufregulation.

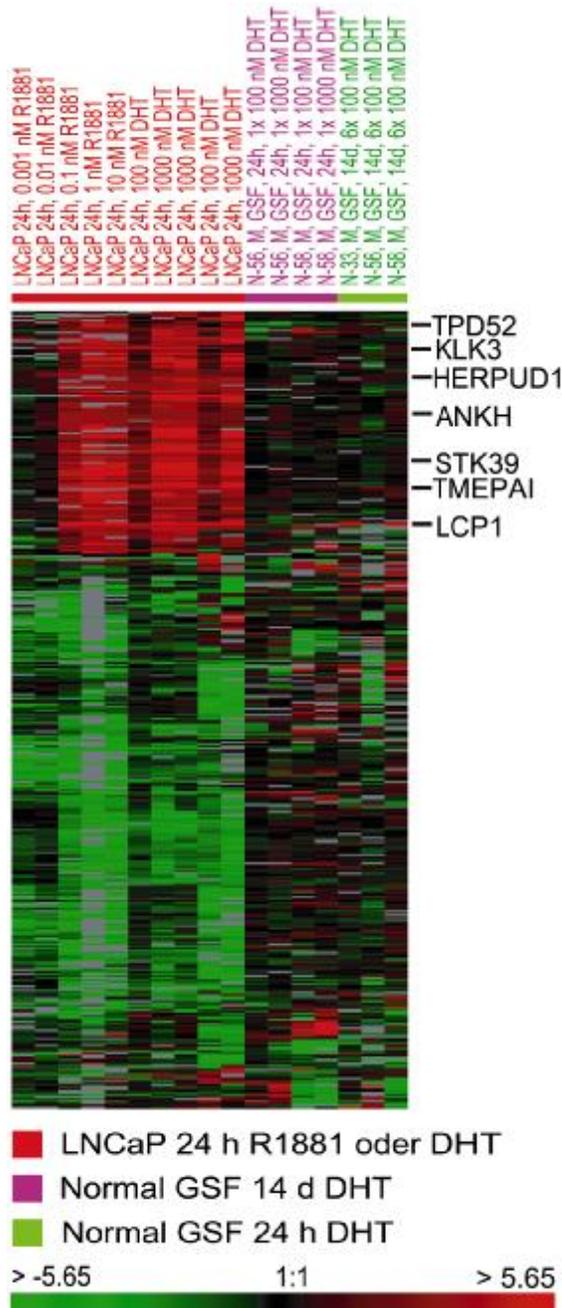


Bild 4.1.1: Genomweite nicht supervidierte hierarchische Cluster-Analyse von Androgen-behandelten LNCaP-Zellen und Genitalhautfibroblasten (GSF)

Gezeigt sind 382 Transkripte, deren mittlere (mean) Signalintensität über Hintergrund im Referenz-Kanal diesen um mindestens das 1,5-fache übertraf und deren Signal in mindestens 3 von 17 Experimenten mindestens das $\log_2(1,6)$ -fache des Mittelwertes darstellte. LNCaP Zellen wurden mit EtOH, R1881 oder DHT inkubiert. GSF Zellen wurden mit EtOH oder DHT inkubiert. Nur Gene mit mindestens 80% auswertbarer Signale über alle Experimente wurden in die Analyse einbezogen. Die unterschiedliche Farbegebung reflektiert die Herauf- oder Herabregulation der Genexpression nach Androgenbehandlung.

Rote Markierung: heraufregulierte Transkripte, grüne Markierung: herunterregulierte Transkripte.

Die \log_2 -Quotienten der GSF-spezifischen, androgen-induzierten Expressionsantwort gegenüber der nicht-induzierten Expressionsantwort sind größtenteils Null oder sie weisen kein konsistentes Muster auf. Dies bedeutet, dass sich die Expression in GSF nur in sehr geringem Umfang bei Androgeninkubation ändert. Zudem ist diese Expressionsantwort in den verschiedenen Zell-Linien und Wiederholungsexperimenten nicht konsistent (Bild 4.1.1). Es konnten ähnliche Ergebnisse bei Verwendung geringerer Androgenkonzentrationen für GSF-Stimulation und der Verwendung von R1818 anstelle von DHT festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Insbesondere der Vergleich von LNCaP- und GSF-Zellen in der kombinierten Cluster-Analyse zeigte keinerlei Androgen-Response-Profile, die zwischen beiden Zelltypen überlappten. Obwohl LNCaP- und GSF-Zellen beide den AR exprimieren, zeigten sie in Gewebekultur deutlich sichtbare Unterschiede in ihrer genomweiten Antwort auf Androgenstimulation. Dies macht sie zu einem interessanten und vielversprechenden Zellkultur-Modell, um die diesem Unterschied zugrunde liegenden Mechanismen der gewebe-spezifischen Androgenwirkung auf der Ebene der Coregulatoren zu untersuchen.

4.1.2 AR-spezifische Coregulator-Expressionsprofile in GSF- und LNCaP-Zellen

Basis dieser Untersuchung war die Hypothese, dass die differentielle Expressionsantwort von LNCaP- und GSF-Zellen gegenüber Androgenen auf verschieden exprimierten AR-spezifischen Coregulatoren beruhen kann. Dies kann das Resultat von übermäßig exprimierten Coaktivatoren, einem Mangel an Corepressoren oder einer Kombination aus beiden Phänomenen sein.

Die Nutzung von genomweiten Expressionsdaten auf MA-Ebene ermöglichte eine Charakterisierung der Coregulator-Expressionsprofile in beiden Zell-Gruppen. Hierzu wurden die in der McGill AR Datenbank gesammelten AR-Coregulator-Gene in der SOURCE-Datenbank (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/>) einer genauen Überprüfung der entsprechenden Literaturdaten sowie der jeweiligen Nomenklatur unterzogen. Es war so möglich, eine spezifische Genliste mit 282 Transkripten, die 61 Coregulator-Gene repräsentieren, zu erstellen und diese als Vorlage für eine supervidierte Clusteranalyse zu verwenden. Als Analysematerial dienten sowohl Daten aus der Arbeitsgruppe (Holterhus et al. 2003) als auch neue, noch nicht publizierte 43k-MA's.

Für den Vergleich der Basis-Expressionsdaten von AR-Coregulator-Transkripten in LNCaP- und GSF-Zellen wurden nur die Experimente aus der Stanford Microarray Database (SMD) verwendet, bei denen die jeweilige Proben-RNA gegen die gleiche Referenz-RNA hybridisiert worden war. Für die Analyse wurden Daten von 26 MA-Experimenten verwendet.

Diese bestanden aus 20 GSF-Zellen, einer Prostata-Fibroblasten Zell-Probe (N-AKPZF, Wiederholungsexperiment) und vier unabhängige Experimenten mit LNCaP-Zellen. Eine Filterung der Transkript-Profile auf diejenigen, deren Signal mindestens das 1,5-fache der mittleren (mean) Signalintensität über Hintergrund im Referenz-Kanal überschritt, reduzierte das Datenset auf 96 Transkripte. Eine weitere Reduzierung auf 71 Transkripte erfolgte durch die Auswahl nur derjenigen Transkripte, deren Daten auf 80% der MA's auswertbar waren. Eine supervidierte, hierarchische Cluster-Analyse der Expressionsdaten dieser 71 Transkripte trennte alle GSF-Experimente (sowie die beiden Prostata-Zell-Linien) klar von allen LNCaP-Experimenten. Diese deutliche Trennung erfolgte unabhängig von Einflüssen der Kulturbedingungen. Dies zeigte einen eindeutigen und reproduzierbaren Unterschied im Expressionsprofil der AR-spezifischen Coregulatoren zwischen den Zell-Linien über alle 26 MA-Experimente (Bild 4.1.2).

Gene von Coregulatoren, die durch mehr als einen cDNA Klon (Transkript) auf dem MA vertreten waren, standen stellvertretend für eine unabhängige Hybridisierungsreaktion. Diese Gene clusterten i.d.R. sehr nahe beieinander (z.B., NCOA3 (TRAM1)), was die Reproduzierbarkeit der Daten noch weiter verdeutlicht.

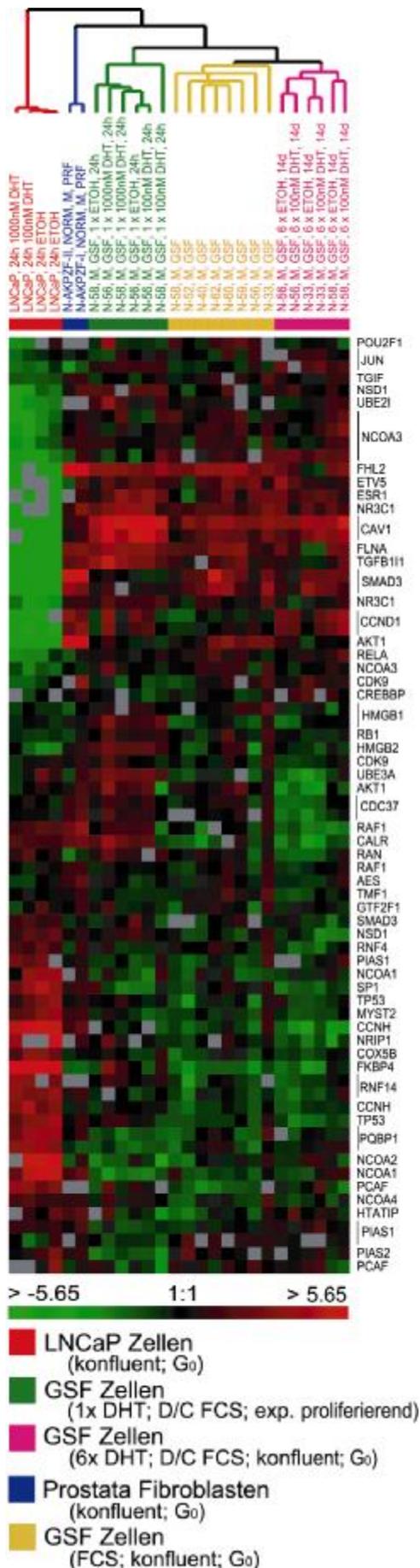


Bild 4.1.2: Supervidierte hierarchische Cluster-Analyse der AR-spezifischen Coregulator-Expressionsprofile von 26 MA-Experimenten (4 LNCaP-Zellkulturen; 2 Prostata-Fibroblastenkulturen, 20 Genitalhautfibroblasten-(GSF)-Zellkulturen) Datenfilterung für 282 Coregulator-Transkripte (61 Gene): Verwendung nur derjenigen Werte, bei denen die mittlere (mean) Signalintensität über Hintergrund im Referenz-Kanal diesen um mindestens das 1,5-fache übertrifft (97 Transkripte) und nur die Transkripte, deren Messdaten auf 80% aller MA's auswertbar waren (71 Transkripte). Rote Markierung: heraufregulierte Transkripte, grüne Markierung: herunterregulierte Transkripte. Die messbare Spannweite der Expressionsprofile reicht von $-5,6$ bis $+5,6$ im \log_2 -Maßstab.

Mit dem Significance-Analysis-for-Microarrays-Algorithmus (SAM) wurden die Unterschiede in der Expression von AR-spezifischen Coregulator-Transkripten zwischen LNCaP- und GSF-Zellen auf Signifikanz hin überprüft. Bei einer Falsch-Positiv-Rate von 0% konnten 48 AR-Coregulator Transkripte von 33 Coregulator-Genen nachgewiesen werden, deren Expression zwischen beiden Zell-Gruppen signifikant unterschiedlich war (Bild 4.1.3).

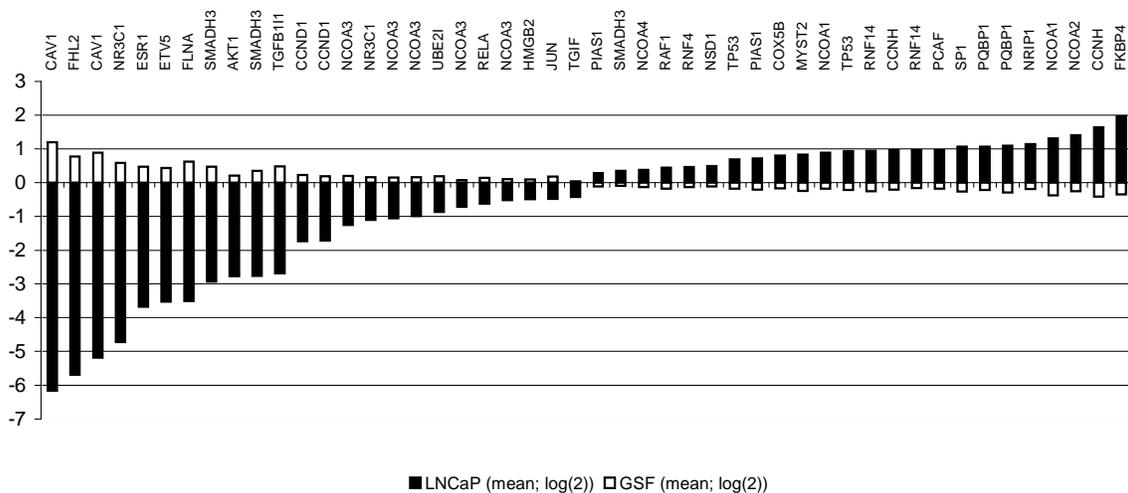


Bild 4.1.3: Graphische Darstellung der AR-spezifischen Coregulator-Transkripte, deren Expression sich zwischen LNCaP- und GSF-Zellen signifikant unterschied. Die SAM-Analyse wurde für die Identifizierung von 48 Transkripten (33 Coregulator Gene) verwendet. Im Vergleich zu GSF-Zellen waren in LNCaP-Zellen 15 Gene (22 Transkripte) signifikant herunterreguliert und 17 Gene (23 Transkripte) waren entsprechend heraufreguliert. Das Gen SMAD3, welches durch multiple Transkripte repräsentiert war (3), zeigten ein diskordantes Transkript-Level. Die messbare Spannweite der Expressionsprofile reicht von $-5,6$ bis $+5,6$ im \log_2 -Maßstab (Y-Achse).

In LNCaP-Zellen war eine Gruppe von 15 dieser Gene (22 Transkripte) herunterreguliert und eine Gruppe von 17 Genen (23 Transkripte) war heraufreguliert, während das Expressionsmuster in den GSF-Zellen genau entgegengesetzt war. Erneut wiesen die meisten Gene, die durch mehr als ein Transkript vertreten waren, ein konsistentes Expressionsmuster über alle Experimente in den Cluster-Analysen auf (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu der genomweiten Analyse in 4.1.1 konnte bei den Coregulatoren keine Androgen-konzentrationsabhängige Änderung des Expressionsprofils in diesen Zell-Linien eindeutig nachgewiesen werden.

4.1.3 Einfluss der Kulturbedingungen auf AR-spezifische Coregulatoren in GSF-Zellen

Aufgrund der heterogenen Gen-Expressionsmuster bei einigen der AR-spezifischen Coregulatoren erfolgte eine systematische Untersuchung, ob die Zellkulturbedingungen der GSF-Zellen die Expressionprofile der Coregulatoren beeinflussen.

In diesen Experimenten wurden RNA-Proben von GSF-Zellen untersucht,

die a) sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und nur mit Kohle gefiltertem FCS (= 6 MA´s) kultiviert wurden,

die b) sich nicht in der Proliferation infolge von Konfluenz befanden und die ebenfalls mit Kohle-gefiltertem FCS kultiviert wurden (= 6 MA´s) oder

die c) sich nicht in der Proliferation infolge von Konfluenz befanden und mit unbehandeltem FCS (= 8 MA´s) kultiviert wurden.

Ein supervidiertes hierarchisches Clustering der Proben auf Basis der Coregulator-Genliste trennte die Proben exakt nach ihren Zellkulturbedingungen auf (Bild 4.1.4). Der größte Unterschied konnte zwischen proliferierenden und nicht proliferierenden (konfluenten) Zellen festgestellt werden. Eine Beeinflussung durch Androgene war erneut nicht nachweisbar.

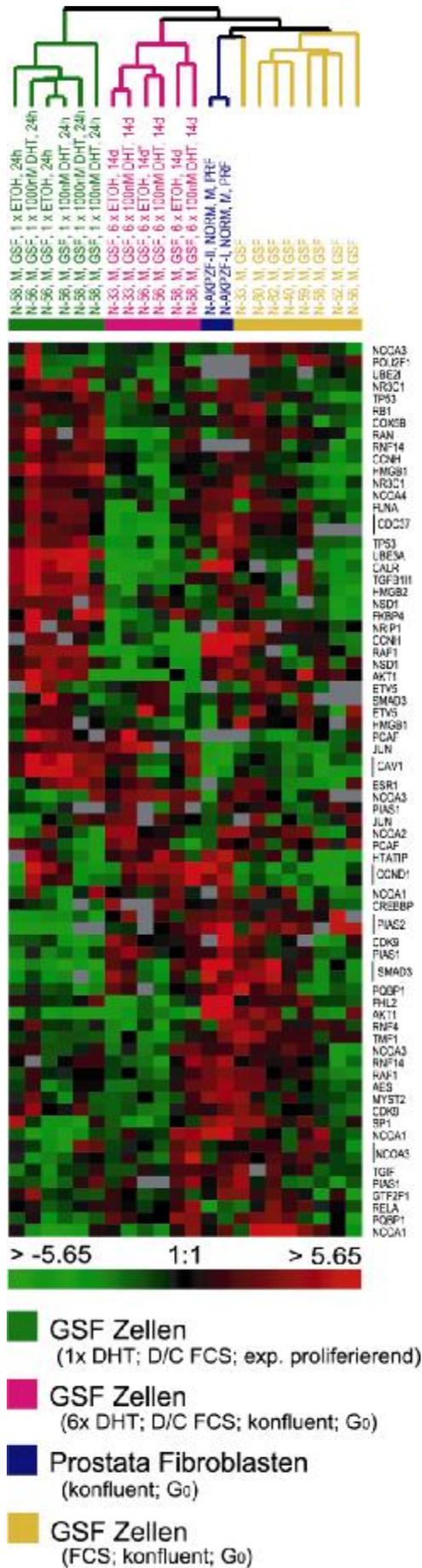


Bild 4.1.4: Supervidierte hierarchische Cluster-Analyse von AR-Coregulator-Transkripten in GSF-Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen. Aufgezeigt werden 74 AR-Coregulator-Transkripte, deren mittlere (mean) Signalintensität über Hintergrund im Referenz-Kanal diesen um mindestens das 1,5-fache übertrifft sowie mindestens 80% interpretierbare Daten über alle 22 MA-Experimente. Der Farbcode des Dendrogrammes und der Probenname deutet jeweils auf die Herkunft und die Kulturbedingungen der Proben hin. Die messbare Spannweite der Expressionsprofile reicht von $-5,6$ bis $+5,6$ im \log_2 -Maßstab.

4.1.4 AR-Coregulator Transkript Profile in verschiedenen Prostata-Geweben

Für eine weitere Validierung der Relevanz der verwendeten AR-spezifischen Coregulatoren wurden die vorliegenden Daten zu den unter 4.1.2 beschriebenen 282 Transkripten mit einem kürzlich publizierten Datenset von 112 MA's kombiniert (Bild 4.1.5). Dieses neue Datenset basierte auf verschiedenen normalen Prostata-Geweben (41x), Prostata-Karzinomproben (62x) und Lymphknoten-Metastase-Geweben von Prostatakarzinomen (9x) (Lapointe et al. 2004).

Ausgewählt wurden Transkripte deren mittlere (mean) Signalintensität über Hintergrund im Referenz-Kanal diesen um mindestens das 1,5-fache übertrifft und interpretierbare Daten in 80% der MA-Experimente aufwiesen.

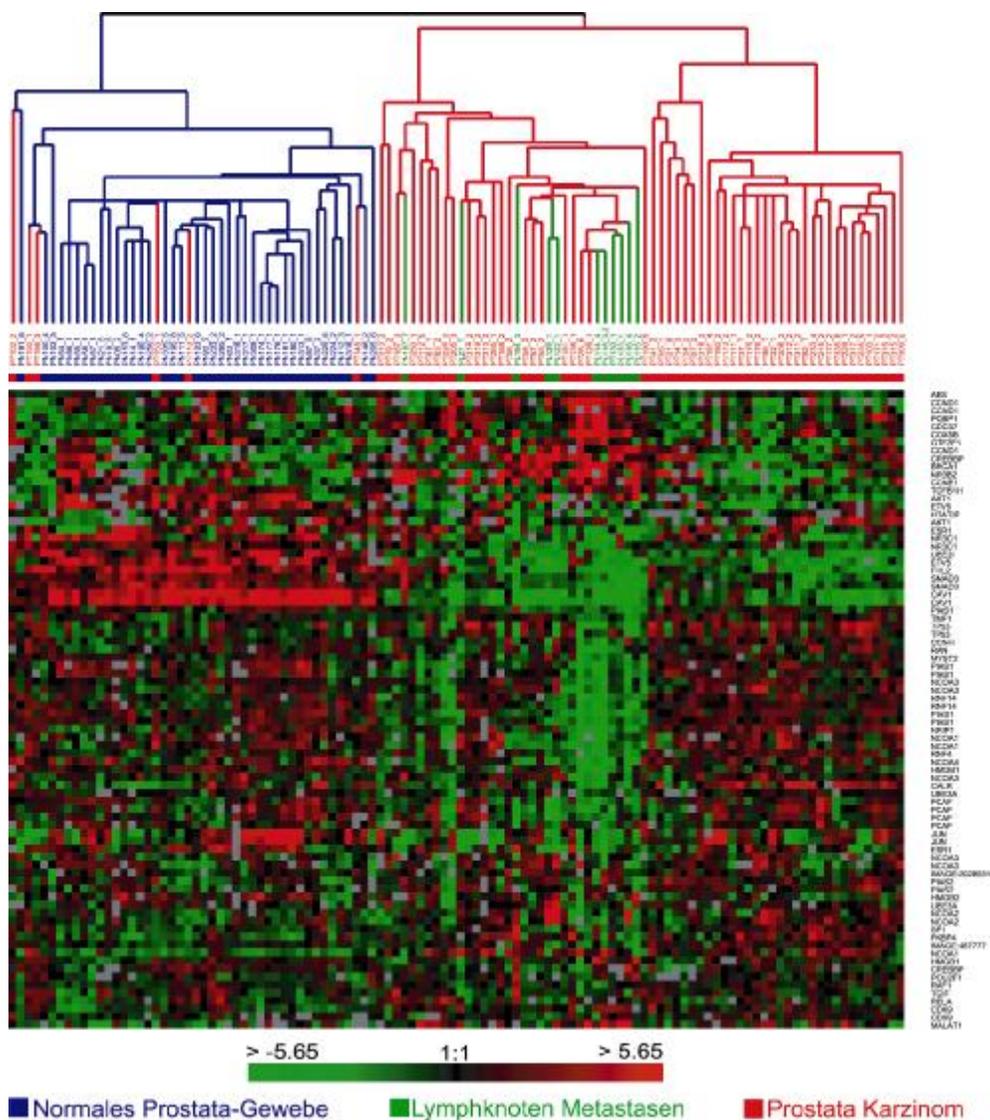


Bild 4.1.5: Expression von 80 AR-spezifischen Coregulator-Transkripten in 112 Prostata-Proben: Prostata-Gewebe, Prostata-Tumorgewebe und Lymphknoten-Metastase-Gewebe. Für die Datenanalyse wurden eigene Ergebnisse von 282 AR-Coregulator Transkripten mit einem MA-

Datenset, welches kürzlich von Lapointe et al. (2004) mit 41 normalen Prostata-Gewebe-Proben, 62 primären Prostata-Tumor-Gewebe und neun Lymphknoten-Metastase-Geweben veröffentlicht wurde, verknüpft. Nach Datenfilterung für Gene, deren mittlere (mean) Signalintensität über Hintergrund im Referenz-Kanal diesen um mindestens das 1,5-fache übertrifft und mindestens 80% interpretierbare Daten über alle Proben umfasst, blieben 80 Transkripte. Die Expression von AR-spezifischen Coregulatoren unterscheidet sich erheblich zwischen normalem und karzinogenem Prostata-Gewebe.

Eine supervidierte hierarchische Cluster-Analyse der daraus resultierenden 80 AR-Coregulator Transkripte unterteilte die Proben in zwei große Untergruppen (Bild 4.1.5). Die eine Untergruppe enthielt alle normalen Prostata-Gewebeproben mit einigen wenigen Prostata-Tumor-Gewebeproben. Die andere Untergruppe beinhaltete nur Tumor-Gewebeproben. Diese Gruppe unterteilte sich nochmals in Prostata-Tumor-Gewebeproben und Lymphknoten-Metastase-Gewebeproben, vermengt mit einigen wenigen Prostata-Tumor-Gewebeproben. Offenbar ändert sich beim Prostatakarzinom beim Übergang vom Normalgewebe zum Tumor das Expressionsprofil von AR-Coregulatoren.

Bei Übergang in die Lymphknotenmetastase ändert sich das Expressionsprofil erneut.

4.1.5 Vergleichende Analyse von AR-spezifischen Coregulator-Profilen in 35 verschiedenen humanen Geweben

Da der AR nahezu ubiquitär in verschiedenen humanen Geweben exprimiert wird, sollte überprüft werden, ob die gewebespezifische Expressionssignatur von AR-Coregulatoren in einem unabhängigen Daten-Set mit möglichst vielen unterschiedlichen humanen Gewebeproben verifiziert werden konnte.

Hierzu wurde ein kürzlich publizierter Daten-Set von Shyamasundar und Mitarbeitern, der auf einer ähnlichen cDNA-MA-Plattform basiert (26.000 Gene) verwendet (Shyamasundar et al. 2005). Dieser Daten-Set bestand aus 115 MA-Experimenten, welche insgesamt 35 verschiedene humane Gewebetypen repräsentieren.

Unter Verwendung der Liste mit 282 AR-Coregulatoren (4.1.2) wurden alle Transkripte für die Analyse verwendet, deren mittlere (mean) Signalstärke im Referenz-Kanal den Hintergrund um das mindestens 1,5-fache überstieg und die in mindestens 80% aller Versuche auswertbare Daten aufwiesen. Eine supervidierte hierarchische Clusteranalyse der hieraus resultierenden 60 AR-Coregulator Transkripte führte zu einer Sortierung der Experimente anhand ihrer Gewebespezifität (Bild 4.1.6) Zudem bildeten Gewebe, die aus ontogenetisch verwandten Organsystemen stammen, zusammenhängende Untergruppen. Dies erfolgte z.B. beim lymphatischen System mit Gewebeproben aus Milz, Thymus, Lymph-

Knoten, Mandeln und dem Blut. Lymphatisches Gewebe wies u.a. ein hohes Expressionsniveau von tp53 (tumor protein p53) und NCOA3 (Nuclear receptor coactivator 3) auf (Bild 4.1.6). Ein ähnliches Phänomen trat im Bereich der Gewebe aus den Reproduktionsorganen (Ovar, Uterus, Gebärmutter, Eileiter) auf. Hier konnten sogar einige der Prostata- und Samenbläschen-Proben nahe beieinander clustern. Diese Gewebe wiesen einen relativ hohen CAV1 (caveolin 1) Expressionslevel auf (Bild 4.1.6).

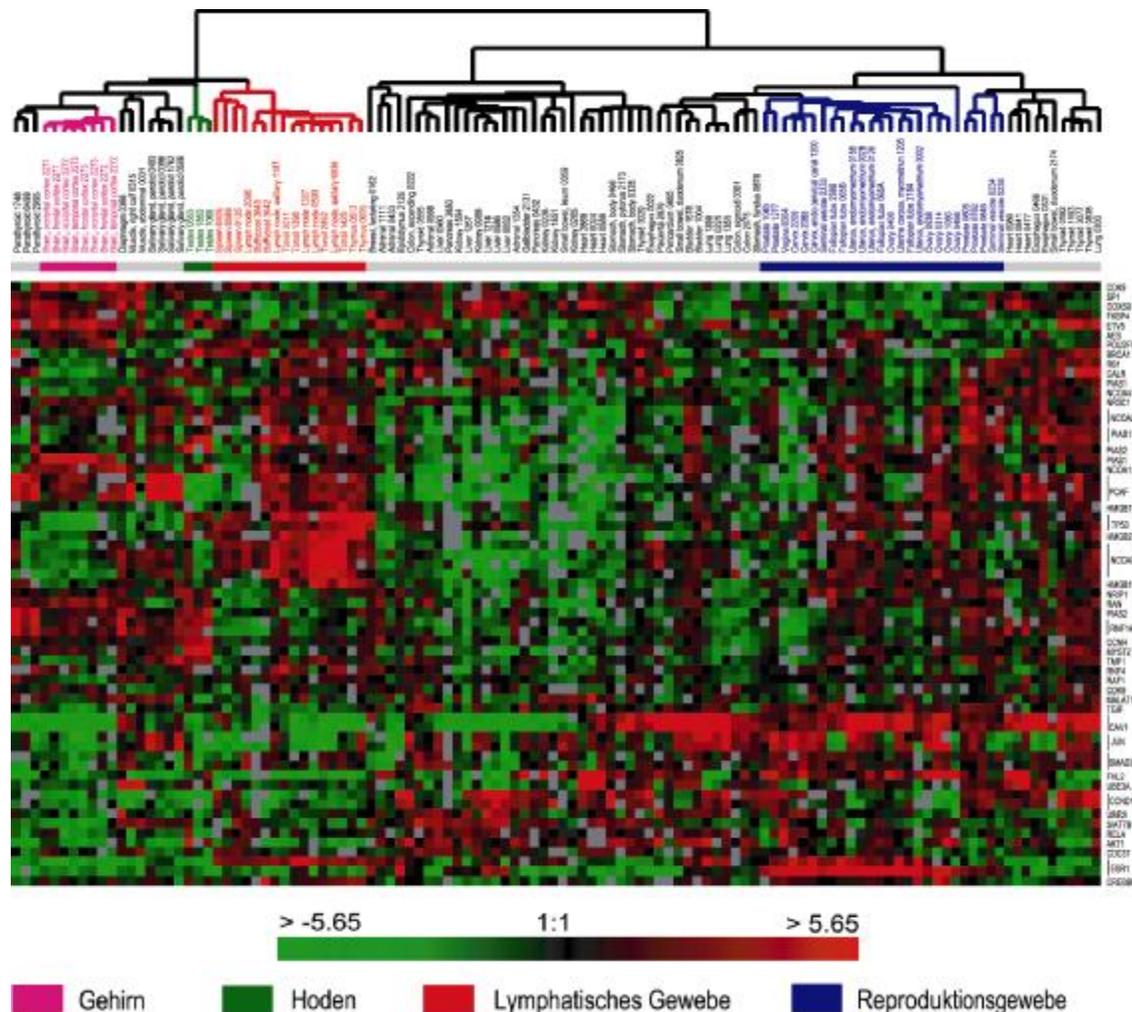


Bild 4.1.6: Variation von AR Coregulator-Transkripten in 115 humanen Gewebeproben.

Expressionsdaten von 282 AR Coregulator-Transkripten wurden aus einem kürzlich publizierten Datenset (Shyamasundar et al. 2005) von 115 verschiedenen humanen Gewebeproben (35 verschiedene humane Gewebe) extrahiert. Nach Filterung der Daten auf mindestens 50% mittlerer (mean) Signal-Intensität über Hintergrund für beide Kanäle und mindestens 80% interpretierbarer Daten über alle Experimente, wurden 56 Transkripte analysiert. Das Dendrogramm am oberen Rand des Bildes stellt die Ähnlichkeit der 35 verschiedenen humanen Gewebe gemäß ihrem AR Coregulator-Expressionsmuster dar. Lymphatisches Gewebe, Reproduktionsorgane, Gehirngewebe

und drei Hodenbiopsien sind farblich hervorgehoben. Der Farbcode für die Gewebe ist unterhalb der Graphik dargestellt. Die Expressionsrate reicht von $-5,6$ bis $+5,6$ im \log_2 -Maßstab.

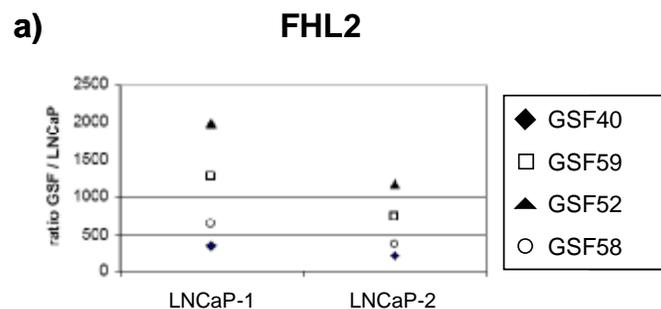
Demgegenüber ist Hoden-Gewebe durch ein eindeutiges AR-Coregulator Expressionsmuster charakterisiert, d.h. relativ niedrige Expression von PCAF (p300/CBP-associated factor) in allen drei unterschiedlichen PCAF-Klonen und in allen drei verschiedenen Hoden-Biopsien.

Alle acht Gehirn-Gewebe-Proben clusterten eng zusammen, was auf die Existenz von gehirnspezifischen Signaturen von AR-spezifischen Coregulator-Profilen deutet. Die Expression von CAV1 (zwei verschiedene Expressions-Klone) bewegt sich bei diesen Proben auf niedrigem Niveau.

Die Ergebnisse stützen das Konzept der gewebespezifischen Modulation der AR-Funktion auf Grundlage einer zellspezifischen Expression von AR-Coregulatoren.

4.1.6 Validierung von MA-Ergebnissen mittels semiquantitativer Real-Time PCR

Von der Gruppe der Gene, die signifikante Unterschiede in ihrem Expressionsprofil zwischen LNCaP- und GSF-Zellen aufwiesen, wurden CAV1, FHL2, NCOA2 und FKBP4 für eine Validierung mittels semi-quantitativer Real-Time-PCR (RT-PCR) ausgewählt. Fünf Zell-Linien (2x LNCaP, GSF 40, GSF 52, GSF 58 und GSF 59) wurden unter den gleichen Zellkultur-Bedingungen wie für die Array-Daten neu kultiviert (= biologisches Replikat). Dies ergab sechs unabhängige, neue RNA-Proben.



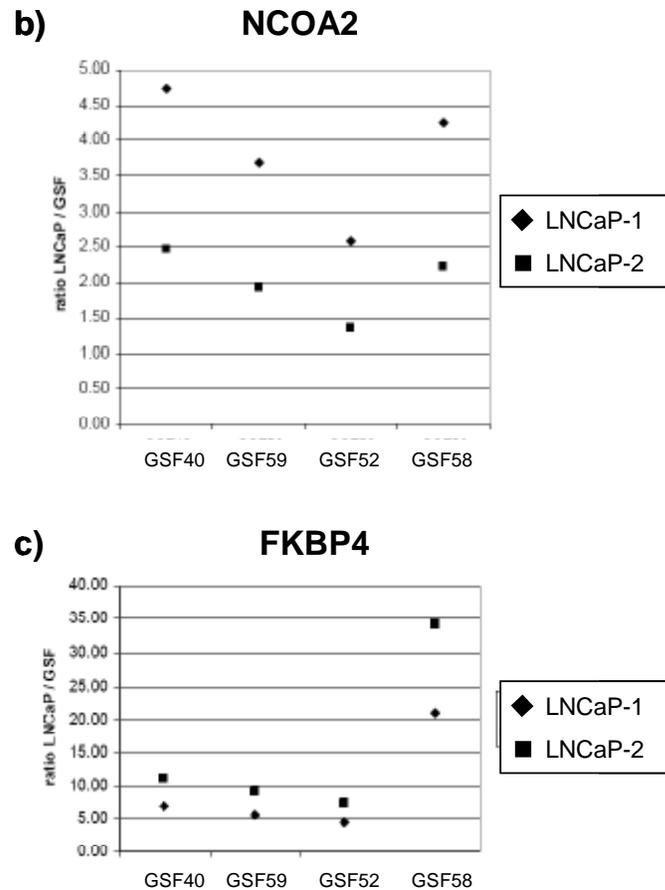


Bild 4.1.7: Für die Validierung der auf MA-Analysen beruhenden Expressionsprofile wurden 4 Gene (CAV1, FHL2, NCOA2 und FKBP4), deren Profil einen signifikanten Unterschied zwischen LNCaP- und GSF-Zellen aufwies (Bild 4.1.3), mittels semi-quantitativer RT-PCR überprüft. Normalisiert wurde über das house-keeping Gen TATA-binding Protein (TBP). Die Unterschiede zwischen den Expressionsprofilen basieren auf der $\Delta\Delta$ CT-Methode. CAV1 war in LNCaP-Zellen nicht detektierbar, in GSF-Zellen war es exprimiert.

- a) Heraufregulation von FHL2 in GSF-Zellen im Vergleich zu LNCaP-Zellen
- b) Heraufregulation von NCOA2 in LNCaP-Zellen im Vergleich zu GSF-Zellen
- c) Heraufregulation von FKBP4 in LNCaP-Zellen im Vergleich zu GSF-Zellen

Die Quantifizierung der vier ausgewählten Transkripte mittels semi-quantitativer RT-PCR ($\Delta\Delta$ CT-Methode) bestätigte deutlich die Ergebnisse aus den MA-Analysen. Die beiden Gene CAV-1 und FHL2 waren in den beiden unabhängigen LNCaP-Zell-Linien extrem herunterreguliert. Da CAV1 in acht RT-PCR Experimenten, basierend auf LNCaP-Material, nicht detektierbar war, konnte bei diesem Gen kein „Fold Difference“ zwischen LNCaP- und GSF-Zellen gebildet werden. In GSF-Zellen konnte die Expression von CAV1 nachgewiesen werden. Das FHL2-Transkript in den vier verschiedenen GSF-Kulturen wies eine relative

Heraufregulation von 213,29-fach bis zu 1987,4-fach im Vergleich zu den LNCaP-Zellen auf (Bild 4.1.7.a).

Die Expressionsunterschiede von NCOA2 und FKBP4 zwischen LNCaP- und GSF-Zellen fielen geringer aus. Die Heraufregulation von NCOA2 in LNCaP- im Vergleich zu GSF-Zellen ergab einen Wert von 1,35-fach bis 4,74-fach (Bild 4.1.7b). Bei FKBP4 ergab sich entsprechend ein Wert von 4,55-fach bis 34,06-fach, abhängig von den LNCaP- und den GSF-Zellen (Bild 4.1.7c). Die Heraufregulation der beiden Gene in LNCaP-Zellen im Vergleich zu GSF-Zellen entsprach den Ergebnissen aus der MA-Analyse.

FAZIT

Das Expressionsprofil der AR-Coregulatoren einer Zelle ist abhängig vom Gewebetyp und der Zell-Lokalisation innerhalb des menschlichen Körpers. Die auf den Microarrays basierenden Expressionsdaten waren über RT-PCR reproduzierbar, zudem wies ein Abgleich vieler Gene mit relevanten Literaturdaten große Übereinstimmungen auf.

Es ließ sich zeigen, dass auch bei konstanten Zellkulturbedingungen die zur Verfügung stehenden GSF-Zellen nicht androgenresponsiv sind. Funktionelle Untersuchungen der Androgenrezeptorfunktion sind somit mittels des klassischen GSF-Zellkultur-Modells nicht möglich.

Für weitere Analysen erfolgte die Etablierung und anschließende Nutzung des minimal invasiven Modellsystems "Blut". Die verhältnismäßig leichte Probenentnahme und die Nutzung relativ geringer Probenmengen (wenige ml) sind gerade bei Kindern als Patientengruppe wichtig.

4.2. Geschlechtsspezifische Expressionsmuster in PBMC

In dem zweiten Teilprojekt der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob sich eine geschlechtsspezifische Genexpression in Blutzellen, also in nicht offensichtlich geschlechtsspezifisch differenziertem Gewebe/ Zellen nachweisen lässt. Zudem wurde untersucht, ob Variationen in der Geschlechtsentwicklung, die in der medizinischen Diagnostik zuvor aufgrund phänotypischer Untersuchungen, Hormon-Assays oder Mutationsanalysen festgestellt worden waren, durch das Expressionsprofil der Blutzellen bestätigt werden konnten.

Hierzu wurden zunächst Monozyten bzw. die sich daraus differenzierenden Makrophagen als Modellsystem anvisiert. Für die Aufreinigung der Monozyten aus Vollblutproben wurden verschiedene Protokolle durchgeführt und teilweise miteinander kombiniert. Die bei einer Kombination aus Ficoll-Gradient und mehreren PBS-Waschschritten isolierten Monozyten wurden mit CD-14-PE gekoppelten Antikörpern in einem Fluorescence-activated-cell-counter (FACC) untersucht. Die FACC-Analysen wurden freundlicherweise von Frau Karen Witting in der Hämatologie der Kinderklinik Lübeck durchgeführt. Die durch dieses Verfahren erzielte maximale Ausbeute betrug 13% CD-14-positive Zellen.

Die geringe Anreicherung an Monozyten führte zu einem Wechsel des Modellsystems zu PBMCs. Die PBMCs wurden mit einem Ficoll-Gradienten aus Vollblut isoliert und die RNA mittels Trizol und RNeasy-Säulen isoliert und gereinigt. Die Qualität und die Quantität der RNA wurde photometrisch und Gel-elektrophoretisch (Bild 4.2.1.a) überprüft.

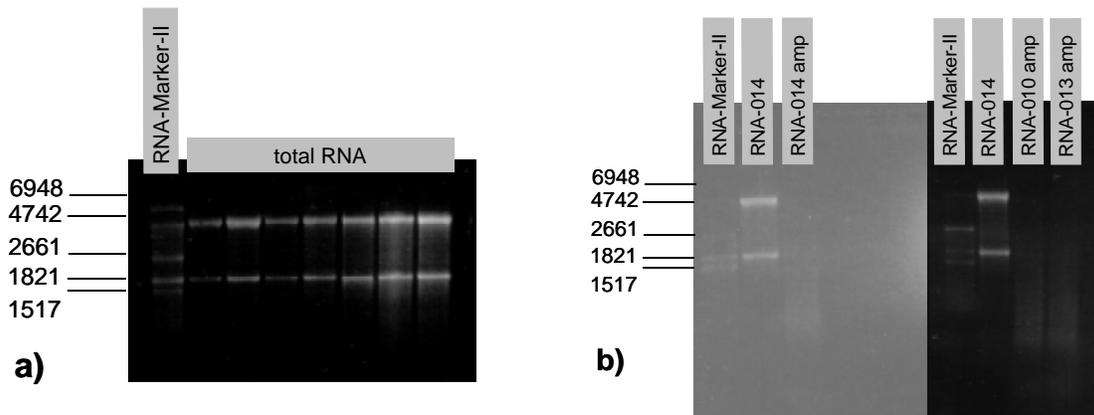


Bild 4.2.1: a) Darstellung der Qualitäts- und Quantitätsüberprüfung der aus PBMC isolierten RNA-Proben (je 1 μ g) auf einem 1,5% denaturierenden Agarose-Gel (siehe 3.4.3); Verwendung von 1 μ g des RNA-Markers-II (Roche); b) Darstellung des Vergleiches zwischen einer aus PBMC isolierten RNA-Probe (Total RNA; 1 μ g) mit der entsprechenden linear amplifizierten RNA-Probe auf einem 1,5% denaturierenden Agarose-Gel; Verwendung von 1 μ g des RNA-Markers-II (Roche)

Die für die Durchführung von MA-Experimenten nötigen RNA-Mengen wurden durch eine lineare Amplifikation erzielt. Zu Beginn der Experimente wurde dieses Amplifikationsprodukt, welches im Vergleich zur Gesamt-RNA keine ribosomale RNA mehr enthielt, auf einem Agarose-Gel visuell überprüft (Bild 4.2.1.b).

Um die Gesamtheit der für die Microarray-Analytik von Blutproben benötigten Labormethoden auf Funktionalität hin zu überprüfen wurden in einem Vorversuch mit fünf MA-Experimenten sämtliche Komponenten getestet. Hierbei diente amplifizierte PBMC-RNA aus Vollblut einer weiblichen Person als Referenz-RNA.

Eine supervidierte Clusteranalyse mit der von Whitney et al. (2003) publizierten Genliste mit zwischen männlichen und weiblichen Personen signifikant unterschiedlichen Genen ergab eine eindeutige Separation der drei weiblichen Proben von den zwei männlichen Proben (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigte die Existenz einer geschlechtsspezifischen Genexpression in PBMC und somit die Befunde von Whitney et al..

Des weiteren zeigte sich die Eignung von PBMCs für die molekularbiologische Untersuchung des Phänomens Intersex.

Für das Hauptprojekt erfolgte sodann die Umstellung der Referenz-RNA auf humane Common Reference RNA (Stratagene), die auch vom Kooperationspartner an der Stanford Universität verwendet wird. Für dieses Projekt wurden insgesamt 45 MA's hybridisiert, ausgewertet und in die SMD eingeladen.

4.2.1. Signifikanz-Analyse geschlechtsspezifischer Gene

Zunächst wurden die beiden Gruppen der Normalkontrollen, die sich aus 10 weiblichen und 9 männlichen Personen zusammensetzten, miteinander verglichen. Für eine Validierung der Expressionsprofile wurde hierfür in einer supervidierten hierarchischen Cluster-Analyse die Liste mit signifikant geschlechtsspezifischen Genen von Whitney und Mitarbeitern als Vorlage eingesetzt (Bild 4.2.2). Für die Analyse wurden nur die Messwerte verwendet, deren Signal im Experiment- oder im Referenz-Kanal eine mindestens 1,5-fache Überschreitung vom Mittelwert (mean) der Signalintensität über Hintergrund aufwiesen (58 Transkripte), sowie deren Messdaten auf 80% aller MA's um Faktor 1,5 vom Mittelwert der Signale abwichen (43 Transkripte). Es erfolgte eine eindeutige Unterteilung der Gesamtgruppe in männliche und weibliche Personen.

Die Gene, deren Expressionsprofil die deutlichsten Expressionsunterschiede aufwiesen, sind in dieser Transkript-Liste auf den Geschlechtschromosomen X bzw. Y lokalisiert, d.h. gonosomale Transkripte. Bei den autosomalen Genen sind die Expressionsunterschiede zwischen beiden Geschlechtern geringer ausgeprägt.

Die Gruppierung der Experimente anhand der geschlechtlichen Zuordnung entspricht den Erwartungen, die Ausprägung der Unterschiede auf transkriptioneller Ebene ist jedoch mit den von Whitney identifizierten Genen nur für die gonosomalen Transkripte deutlich.

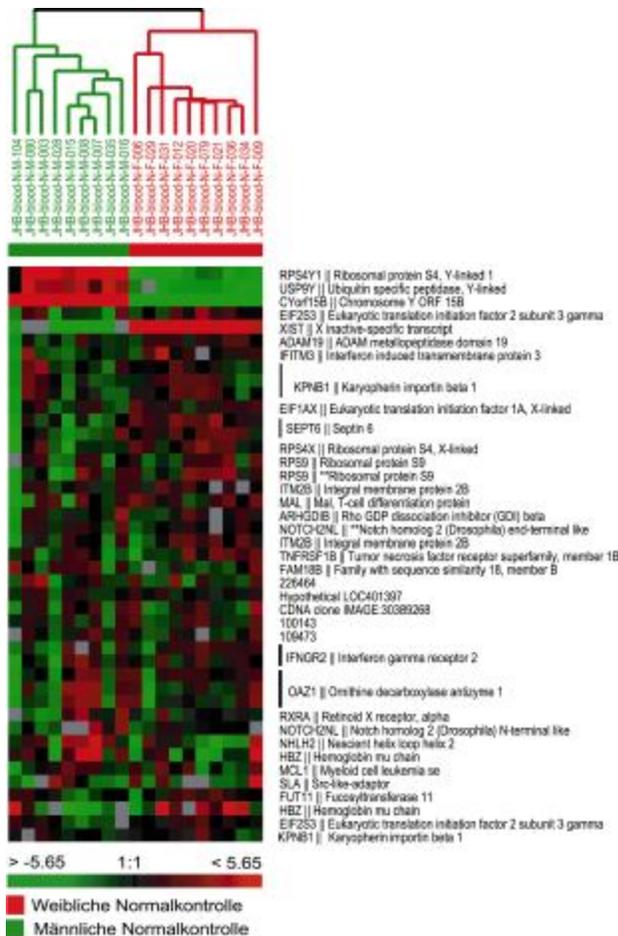


Bild 4.2.2: Supervidierte Clusteranalyse mit 43 Transkripten, die von Whitney et al. als signifikant geschlechtsspezifisch deklariert wurden. Expressionsunterschiede zwischen 9 männlichen und 10 weiblichen amplifizierten PBMC-RNA-Proben. Als Referenz-RNA wurde humane Common Reference RNA (Stratagene) verwendet. Die zunehmende Rot-Intensität bedeutet eine zunehmende Heraufregulierung der Genexpression, die zunehmende Grün-Intensität bedeutet eine zunehmende Herabregulierung der Genexpression. Grau bedeutet, dass kein Signal messbar ist. Die Clusteranalyse wurde mit der SMD sowie den Programmen SAM, Cluster und TreeView durchgeführt.

Da die MA-Analysen von Whitney et al. den Untersuchungsansatz mit PBMC-Expressionsprofilen an sich, sowie die verschiedenen individuellen Aspekte betrachtet, wurde die Geschlechtsüberprüfung und Zuordnung der dortigen Proben zum weiblichen bzw. männlichen Geschlecht als System-Kontrolle, aber nicht als Hauptanalysepunkt verwendet. Der Fokus der Arbeit lag nicht auf der Geschlechtsspezifität, Intersex-Aspekte wurden überhaupt nicht betrachtet. Die Analysen erfolgten nur auf 18K-MA's, in der vorliegenden Arbeit standen 43K-MA's zur Verfügung. Somit war die Whitney-Liste nicht repräsentativ und die Erstellung einer eigenen geschlechtsspezifischen Genliste essentiell. Hierzu wurde zunächst ein Set von 37 MA-Experimenten (Normalkontrollen und Intersex-Personen) in SMD mit bestimmten Datenfiltern nach relevanten Gen-Unterschieden durchsucht (Durchführung genomweiter Genabfrage). Die hieraus resultierende Genliste wurde einem

SAM-Test unterzogen. Dies führte zu einer automatischen Kalkulation der fehlenden Messwerte auf Grund der Messwerte in den anderen 36 Experimenten. Für den relevanten Signifikanz-Test wurden anschließend nur die MA's der weiblichen (10x) und männlichen (9x) Normalkontrollen verwendet, um die Gene zu detektieren, die sich zwischen männlichen und weiblichen Individuen signifikant unterscheiden.

Bei einer Falsch-Positiv-Rate von 0,1 (ca. 10%) ergab sich eine Gruppe von 97 Transkripten. Hiervon waren in weiblichen Normalkontrollen im Vergleich zu den männlichen Normalkontrollen 80 Transkripte herunterreguliert und 17 Transkripte heraufreguliert. Das Ergebnis ist in Bild 4.2.3 als Clusteranalyse graphisch dargestellt. Aufgrund der verwendeten Transkriptliste entsteht in dieser nun supervidierten Cluster-Analyse eine eindeutige Auftrennung zwischen den beiden Geschlechtern. Ein weiterer Filterschritt während des Clusterings (80% gute Daten) hat die Zahl der Transkripte auf 72 reduziert. Für weitere Analysen wurde die vollständige SAM-basierte Transkriptliste mit 97 signifikanten Transkripten verwendet.

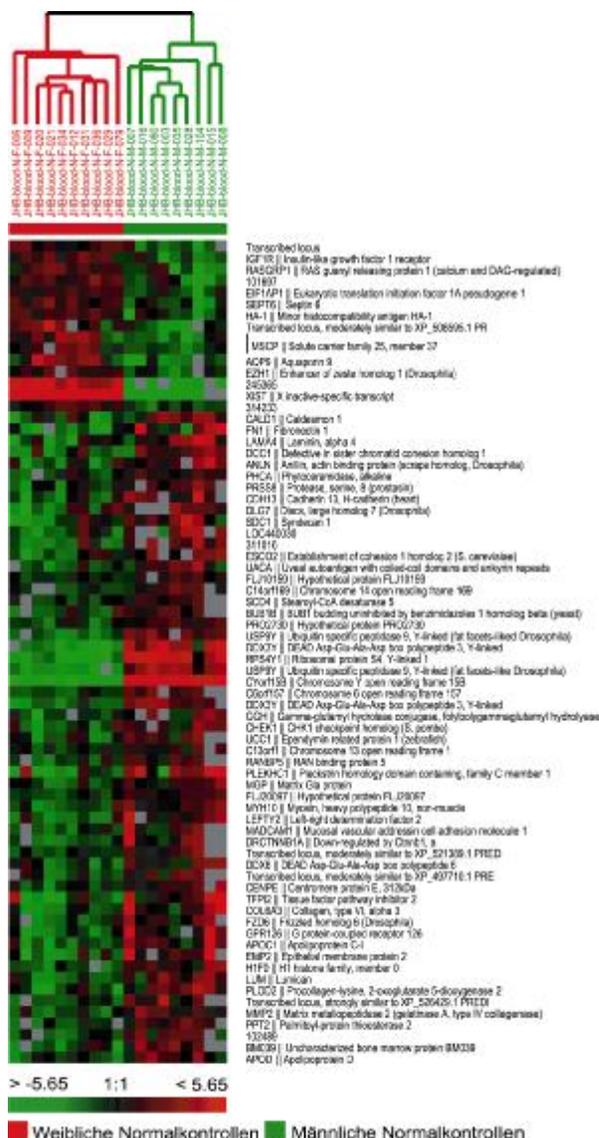


Bild 4.2.3: Vergleich der Genexpression von 10 normalen weiblichen 46,XX mit 9 normalen männlichen 46,XY Personen aus linear amplifizierter PBMC-RNA. Die SAM-generierte supervidierte Clusteranalyse enthält 72 Transkripte. Die zunehmende Rot-Intensität bedeutet eine zunehmende Heraufregulierung der Genexpression, die zunehmende Grün-Intensität bedeutet eine zunehmende Herabregulierung der Genexpression. Grau zeigt an, dass kein Signal messbar ist. Die Clusteranalyse wurde mit der SMD sowie den Programmen SAM, Cluster und TreeView durchgeführt.

Ähnlich wie in der Genliste von Whitney et al. weisen die Y-chromosomalen Gene wie DDX3Y (DEAD Asp-Glu-Ala-Asp box polypeptide 3 Y-linked), RPS4Y1 (ribosomal protein S4 Y-linked 1) und USP9Y (Ubiquitin specific peptidase 9 Y-linked (fat facets-like, Drosophila)) die deutlichsten Expressionsunterschiede zwischen weiblichen und männlichen Probanden auf. Das XIST (X(inactive) specific transcript) ist erwartungsgemäss bei den weiblichen Probanden im Vergleich zur männlichen Gruppe exprimiert. (Die Filterstrategie erlaubte die Identifizierung von Genen, die nur in der Referenz exprimiert sind.)

Neben diesen eindeutig geschlechtsabhängigen gonosomalen Genen ergibt sich jedoch eine größere Gruppe an autosomalen Genen, die signifikant geschlechtsspezifisch sind.

Eine kleine Gruppe von Genen ist in den weiblichen Probanden signifikant heraufreguliert, hierzu gehören Gene wie SEPT6 (Septin 6), EIF1AP1 (Eukaryotic translation initiation factor 1A pseudogene 1), IGF1R (Insulin-like growth factor 1 receptor), RASGRP1 (RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)), HA-1 (Minor histocompatibility antigen HA-1), MSCP (Solute carrier family 25, member 37) oder AQP9 (Aquaporin 9).

Die Zahl der Gene, die in dieser Analyse bei den männlichen Probanden als signifikant heraufreguliert bestimmt worden sind, war um den Faktor 3.5 größer.

Hierzu gehören Gene wie LEFTY2 (Left-right determination factor 2), RANBP5 (RAN binding protein 5), SCD4 (Stearoyl-CoA desaturase 5), BUB1B (BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)), PPT2 (Palmitoyl-protein thioesterase 2), APOD (Apolipoprotein D) oder FZD6 (Frizzled homolog 6 (Drosophila)).

4.2.2 Anwendung der geschlechtsspezifischen Transkriptliste bei Intersex-Personen

Die in 4.2.1 selbst erstellte Liste der signifikant geschlechtsspezifischen Transkripte wurde im weiteren verwendet, um die vorhandenen Intersex-Patienten zu gruppieren. Unter dem Begriff „Intersex“ werden die Ausprägungsformen von externen Genitalien, die sich von der normalen Entwicklung für beide Geschlechter unterscheiden, zusammengefasst. Es stellt eine Abweichung des phänotypischen Geschlechts vom gonadalen oder chromosomalen Geschlecht dar. Während molekulargenetische Untersuchungen auf Einzelgenebene die Diagnose bestätigen, war die Frage, ob der Grad der mangelnden Androgenwirkung entsprechend dem genitalen Phänotyp sich im Genexpressionsprofil widerspiegelt.

Bei der Korrelation dieser Liste geschlechtsspezifischer Transkripte mit allen männlichen und weiblichen Normalkontrollen sowie der verschiedenen Intersex-Personen durch Clusteranalysen ergab sich die in Bild 4.2.4 dargestellte Verteilung.

Die medizinischen Diagnosen der Patienten sind in Tabelle 4.2.1 dargestellt.

Patientenkennung	Genotyp	Phänotyp	Altersklasse	Prader	Diagnose/ Mutation	ARD
JHB-RNA-P-004	46,XY	keine Müller'schen Strukturen, im Alter von 2 Jahren gonadektomiert, Presomen-Therapie	20-24	3-4	homozygote Mutation in SRD5A2; in Exon 2: Cystidin:Thymidin in Codon 111, prädiktiv Substitution von Arginin durch ein Terminationscodon (TGA)	974
JHB-RNA-P-017	46,XY	diskrete Virilisierung in der Pubertät, Gonadektomie mit 14 Jahren	10-14	2	GD; 17-β-HSD-III; nach Exon 3: Substitution von A zu T in Position 325+4 -> 4.Base des Intron 3 => fehlerhafte Splice-Donorstelle des Exon 3 => Funktionsverlust der 17-β-HSD-III	1373
JHB-RNA-P-018	46,XY	komplett weiblicher Phänotyp, normale Müller'sche Strukturen	10-14		GD; SRY-Sequenz fehlerfrei	1296
JHB-RNA-P-019	46,XY	rechte Gonadenanlage hodenähnlich, linke Gonadenanlage ovarähnlich	15-19		GD; AR- und 5-alpha-Red-Gensequenz fehlerfrei	1383
JHB-RNA-P-027	46,XY	komplett weiblich, Hoden palpierbar, keine Müller'schen Strukturen, fast weibliche Genitale, plötzliche Virilisierung in Pubertät, Gonadektomie mit 12 J	15-19	2	17-β-HSD-III AIS; da AR- und 5-alpha-Red-Gensequenz fehlerfrei; bei HCG-Stimulation nur Anstieg von T-Vorstufe Androstendion, T-Level gleichbleibend; daher 17-β-HSD-III-Defekt	623

JHB-RNA-P-032	46,XY	weibliches Genitale, Hodenanlage	äußeres	0-4		5-alpha-Red-Mangel; SRD5A2-Sequenz amplifizierbar; jedoch weist Sequenz 2 heterozygote Bereiche auf: - Exon 2: (CGA-TGA) an Position 108 statt Arginin nun Terminationscodon - Exon 3: Insertion eines zusätzlichen Adenosins in Codon 165 (Frameshift Mutation)	1376
JHB-RNA-P-033	46,XY	keine Gonaden, Müller'sche Strukturen	keine	5-9		P450SCC; homozygote Mutation in CYP11A1-Gen, single nucleotid deletion eines Adenins im Codon 279 (Frameshift Mutation); führt zu Terminationscodon an Position 288	1367
JHB-RNA-P-088		überwiegend Phänotyp	männlicher	0-4		GD	
JHB-RNA-P-089	46,XY	weiblich, Müller'sche Strukturen	normale	15-19		GD; keine Angaben über Mutationen bzw. Kontrollsequenzierun gen	1447
JHB-RNA-P-090				0-4		Subtelomerdeletion	
JHB-RNA-P-103	46,XX	weiblich		5-9	4	AGS	
JHB-RNA-P-105	46,XX	weiblich		10-14	4	AGS	
JHB-RNA-P-110	46,XY			0-4	3	LCH partial	
JHB-RNA-P-112	46,XX	weiblich		10-14	1	AGS	
JHB-RNA-P-113	46,XY	männlich		10-14		AGS	
JHB-RNA-P-114		klein, postpartal	tiefe Stimme,	15-19	4	21-Hydroxylase mit Salzverlustsyndrom	

JHB-RNA-P-115	46,XY	komplett weiblich, blinde Vagina, gonadektomiert	10-14	2	kein T-Anstieg nach hCG; AR- und 5-alpha-Red-Gensequenz fehlerfrei; Androgenbiosynthese störung, Ursache noch nicht gefunden	881
JHB-RNA-P-116	46,XX	weiblich	10-14	?	AGS	
weibliche Normalkontrollen						
JHB-RNA-N-F-006	46,XX		25-29			
JHB-RNA-N-F-009	46,XX		30-34			
JHB-RNA-N-F-012	46,XX		25-29			
JHB-RNA-N-F-020	46,XX		35-39			
JHB-RNA-N-F-021	46,XX		30-34			
JHB-RNA-N-F-029	46,XX		5-10			
JHB-RNA-N-F-031	46,XX		30-34			
JHB-RNA-N-F-034	46,XX		20-24			
JHB-RNA-N-F-036	46,XX		20-24			
JHB-RNA-N-F-079	46,XX		20-24			
männliche Normalkontrollen						
JHB-RNA-N-M-003	46,XY		40-44			
JHB-RNA-N-M-007	46,XY		40-44			
JHB-RNA-N-M-008	46,XY		25-29			
JHB-RNA-N-M-015	46,XY		40-44			
JHB-RNA-N-M-016	46,XY		40-44			
JHB-RNA-N-M-028	46,XY		5-10			
JHB-RNA-N-M-035	46,XY		25-29			
JHB-RNA-N-M-080	46,XY		30-34			
JHB-RNA-N-M-104	46,XY		40-44			

Tabelle 4.2.1: Zusammenfassung der medizinischen Diagnosen der Patienten bzw. Altersangaben zu den Normalkontrollen, deren Blutproben als Ausgangsmaterial für die Genexpressionsstudien verwendet wurden; Prader-Stadium nach Prader 1954.

Basierend auf den Y-chromosomal-spezifischen Genen USP9Y, RPS4Y1, DDX3Y, EIF1AY sowie dem X-chromosomal-spezifischen XIST ergab sich biostatistisch durch Clustering eine

Auftrennung in zwei Hauptgruppen. Auf der linken Seite clusterten die weiblichen Normalkontrollen 46,XX mit den weiblichen AGS-Personen 46,XX. In dieser großen Subgruppe der 46,XX-Personen bildeten die AGS-Personen mit weiblichen Phänotyp, die jedoch einen vermännlichten Genitalbereich aufweisen, eine deutlich abgetrennte Untergruppe. Eine AGS-Person (P114) clusterte in die Gruppe der weiblichen Normalkontrollen. Diese bildeten eine homogene Gruppe. Phänotypisch komplett weibliche Patienten weisen also trotz ihres 46,XY Karyotyps Genexpressionsmuster auf, die weiblichen Normalkontrollen gleichen. Daher haben Faktoren, die in der Embryonal-/ Fetalentwicklung die Bildung des Genitale beeinflusst haben (z.B. Androgene) möglicherweise die Ausbildung basaler Genexpressionsmuster die zwischen phänotypisch weiblichen und männlichen Individuen mit beeinflusst.

Auf der rechten Hauptseite clusterten die männlichen Normalkontrollen mit den verschiedenen intersexuellen Zwischenformen, die alle einen 46,XY-Karyotyp, jedoch einen unterschiedlichen Grad der Virilisierung aufwiesen.

Die Intersex-Personen im 46,XY-Block bildeten kein zusammenhängendes Muster als Intersex-Block. Die beiden SRD5A2-Patienten (P004 und P032) clusterten in zwei verschiedenen Subgruppen. Die Personen mit Gonadendysgenese (GD) mit weiblichen Phänotyp (P017, P018, P019, P089) bildeten eine eigene, homogene Subgruppe, die GD-Person mit männlichem Phänotyp (P088) gruppierte sich an diese Gruppe, wies jedoch geringe Unterschiede auf. Die AGS-Person mit männlichem Phänotyp (P113) gruppierte sich an den Block der männlichen Normalkontrollen.

Die P450SCC-Person (P033) und die 17 β -HSDIII-Person (P027) lagerten sich an die GD-Gruppe. Die Person mit partiellem LCH (P110) gruppierte sich in die männlichen Normalkontrollen.

Bei den weiblichen Normalkontrollen 46,XX und den GD-Personen mit weiblichen Phänotyp 46,XY gab es eine kleinere Gruppe von ähnlich heraufregulierten Transkripten wie EIF1AP1, IGF1R, RASGRP1, HA-1, MSCP oder AQP9. Das gonosomal codierte SEPT6 war bei den weiblichen Normalkontrollen 46,XX deutlich heraufreguliert, bei den GD-Personen mit weiblichen Phänotyp 46,XY jedoch nur leicht exprimiert.

Zudem fand sich ein großer Block ähnlich herunterregulierten Transkripten wie APOD, LEFTY2, RANBP5, SCD4, BUB1B, PPT2 oder CHEK1.

Entsprechend revers bildeten sich diese beiden Genexpressionsmuster bei den männlichen Normalkontrollen sowie den AGS-Personen mit 46,XX-Karyotyp aber einem vermännlichten Phänotyp.

Bild 4.2.4: Vergleich der Genexpression aus linear amplifizierter PBMC-RNA von normalen weiblichen und männlichen Individuen mit der Expression von intersexuellen Individuen mit unterschiedlichen Phänotypen. Supervidierte Clusteranalyse mit SAM-generierten 97 Transkripten. Die zunehmende Rot-Intensität bedeutet eine zunehmende Heraufregulierung der Genexpression, die zunehmende Grün-Intensität bedeutet eine zunehmende Herabregulierung der Genexpression. Grau bedeutet, dass kein Signal messbar ist. Die Clusteranalyse wurde mit der SMD sowie den Programmen SAM, Cluster und TreeView durchgeführt.



4.2.3 Vergleich 46,XY männlicher Phänotyp gegen 46,XY weiblicher Phänotyp: autosomaler Einfluss auf die Geschlechtsentwicklung

Für die Analyse der autosomalen Gene und ihren Einfluss auf den Phänotyp wurde die geschlechtsspezifische Genliste als Vorlage verwendet. Um den Einfluss der gonosomalen Gene in dieser Liste (XIST, DDX3Y, USP9Y, RPS4Y1, CYorf15B, ZFX, IMAGE:288683, IMAGE:301740) auf die Bildung des Expressionsclusters zu minimieren, wurden der GeneWeight der 12 Transkripte dieser Gene vor dem Clustering auf Null gesetzt. Dies führte dazu, dass die Expression dieser Gene im Cluster zwar dargestellt wird, aber keinen direkten Einfluss auf die Bildung des Clusters hat (Bild 4.2.5).

In der graphischen Darstellung der Transkriptliste als supervidiertes Cluster ergibt sich eine eindeutige Auftrennung bezüglich der Phänotypen. Diese Zuordnung erfolgt unabhängig vom chromosomalen Geschlecht. In der ersten Hauptgruppe befinden sich alle weiblichen Normalkontrollen und die Patienten mit GD, 17- β -HSD, eine Person mit SRD5A2 mit weiblicher Prader-Zuordnung (P032), P450SCC sowie eine Person mit AGS (P114).

In der anderen Hauptgruppe befinden sich die männlichen Normalkontrollen, die LCH-Patienten und die AGS-Patienten mit vorwiegend männlichem Prader-Stadium sowie eine Person mit SRD5A2 mit einem eher männlichen Prader-Stadium (P004).



Bild 4.2.5: Vergleich der Genexpression aus linear amplifizierter PBM-C-RNA von normalen weiblichen und männlichen Individuen mit der Expression von intersexuellen Individuen mit unterschiedlichen Phänotypen. Supervidierte Clusteranalyse mit SAM-generierten 97 Transkripten. Gonosomale Gene erhielten vor dem Clustern einen GeneWeight von 0. Die zunehmende Rot-Intensität bedeutet eine zunehmende Heraufregulierung der Genexpression, die zunehmende Grün-Intensität bedeutet eine zunehmende Herabregulierung der Genexpression. Grau bedeutet, dass kein Signal messbar ist. Die Clusteranalyse wurde mit der SMD sowie den Programmen SAM, Cluster und TreeView durchgeführt.

4.2.4 Vergleich 46,XX weiblicher Phänotyp (Normalkontrolle) gegen 46,XX mit vermännlichtem Phänotyp (AGS)

Die Gruppe der Patienten mit Androgenitalem Syndrom eignet sich für eine weitere Analyse. Bei den 46,XX-Individuen dieser Gruppe tritt aufgrund eines Enzymdefektes (21-Hydroxylase-Mangel) häufig eine Vermännlichung des weiblichen äußeren Genitale auf. Bei einem Vergleich der weiblichen Normalkontrollen (10x) mit Personen (5x) mit Adrenogenitalem Syndrom (46,XX, vermännlichter Phänotyp) wurde zunächst eine genomweite Analyse durchgeführt. Eine Filterung der Transkript-Profile auf diejenigen Daten, deren Signal mindestens das 1,5-fache der mittleren (mean) Signalintensität über Hintergrund im Referenz-Kanal oder im Experiment-Kanal überschritt, reduzierte das Datenset auf 33.477 Transkripte. Eine weitere Reduzierung auf 6.043 Transkripte erfolgte durch die Auswahl nur derjenigen Transkripte, deren Daten auf 80% der MA's auswertbar waren. Der anschließende SAM-Test ergab 1679 signifikant unterschiedliche Gene. Der mittlere Fehler lag hierbei bei 1. Das dazugehörige Kontroll-Cluster-Bild mit einer weiteren Datenfilterung weist eine eindeutige Abgrenzung der AGS-Personen gegenüber der Gruppe der weiblichen Normalkontrollen bei 183 Transkripten auf (Bild 4.2.6).

So waren z.B. Gene wie das SSX1 (Synovial sarcoma, X breakpoint 1), das LAMA4 (Laminin alpha 4), das SHBG (Sex hormone-binding globulin), das GAG2 (G antigen 1) sowie Signalmolekül codierende Gene wie das TJP1 (Tight junction protein 1 zona occludens 1) oder das DDR2 (Discoidin domain receptor family, member 2) und Transkriptionsfaktoren wie das HEY1 (Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1) in den AGS-Personen deutlich heraufreguliert.

Zu der Gruppe der in AGS-Personen herunterregulierten Gene gehörten Zellsignalmoleküle wie CFC1, RAP1B oder CD69 sowie Transkriptionsfaktoren wie KLF4, KLF6, EGR2, JUNB, IRF8, ELF1, GATA2, POU2F2.

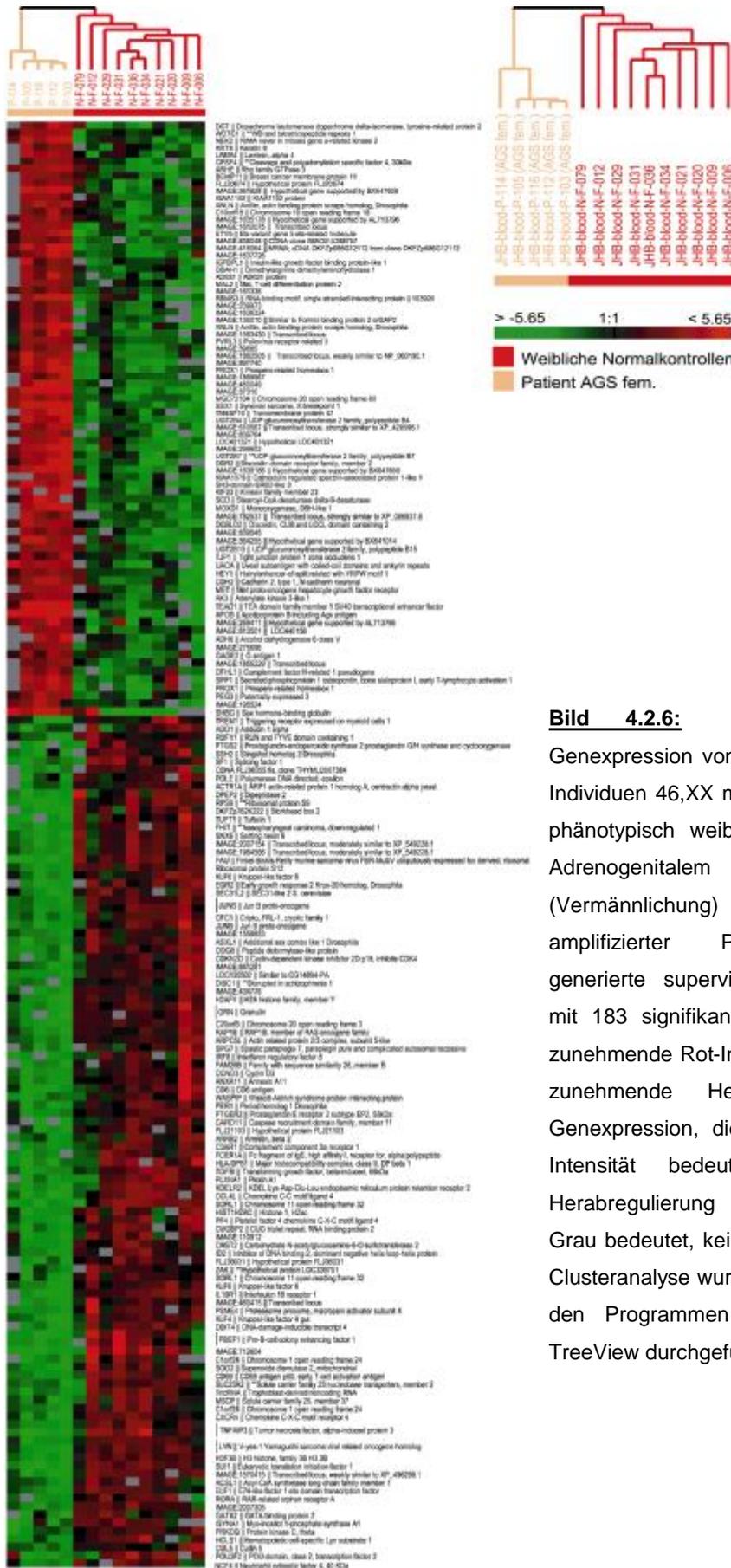


Bild 4.2.6: Vergleich der Genexpression von normalen weiblichen Individuen 46,XX mit der Expression von phänotypisch weiblichen Individuen mit Adrenogenitalem Syndrom (AGS) (Vermännlichung) aus linear amplifizierter PBMC-RNA. SAM-generierte supervidierte Clusteranalyse mit 183 signifikanten Transkripten. Die zunehmende Rot-Intensität bedeutet eine zunehmende Heraufregulierung der Genexpression, die zunehmende Grün-Intensität bedeutet eine zunehmende Herabregulierung der Genexpression. Grau bedeutet, kein Signal messbar. Die Clusteranalyse wurde mit der SMD sowie den Programmen SAM, Cluster und TreeView durchgeführt.

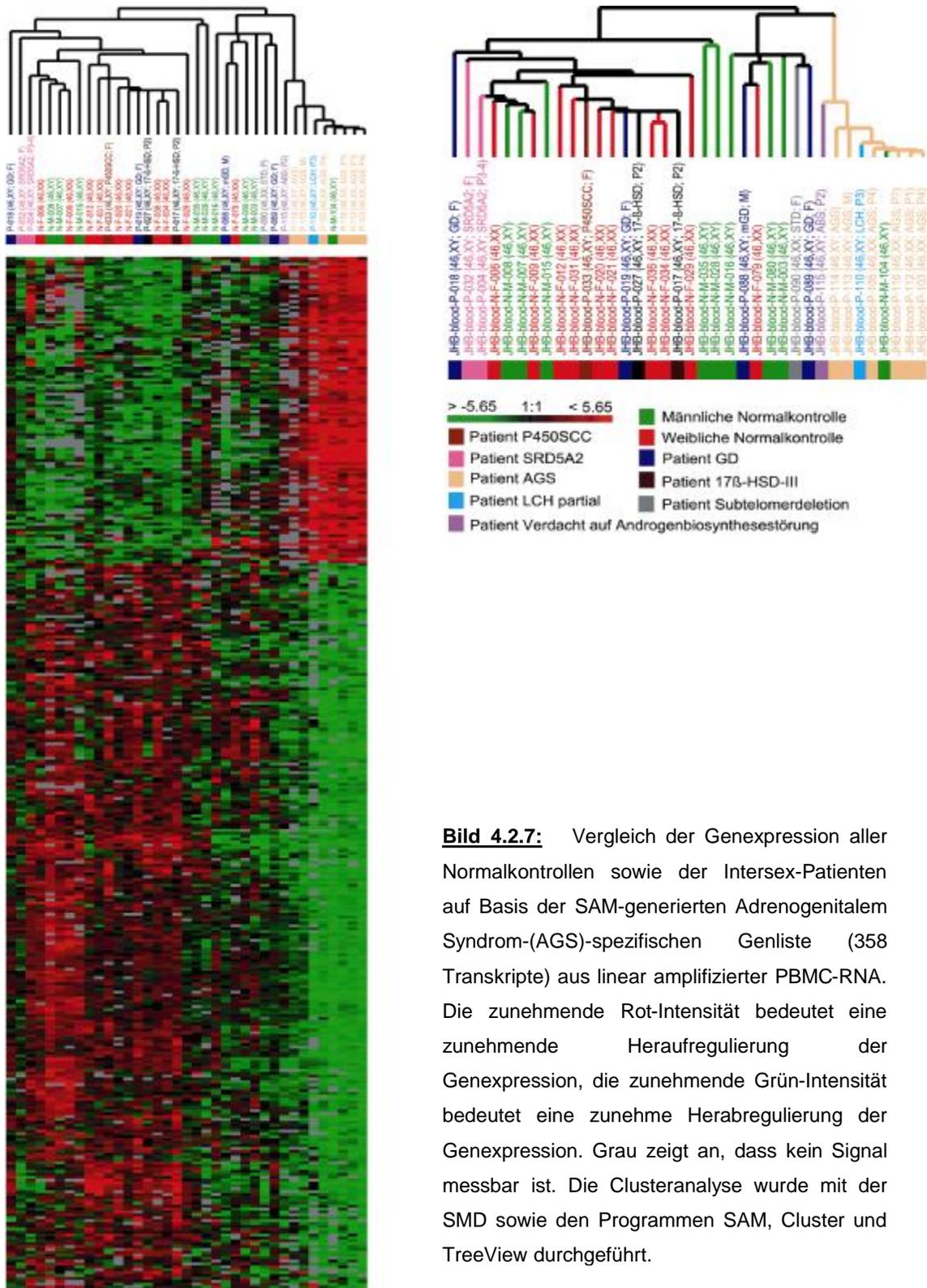


Bild 4.2.7: Vergleich der Genexpression aller Normalkontrollen sowie der Intersex-Patienten auf Basis der SAM-generierten Adrenogenitalem Syndrom-(AGS)-spezifischen Genliste (358 Transkripte) aus linear amplifizierter PBMC-RNA. Die zunehmende Rot-Intensität bedeutet eine zunehmende Heraufregulierung der Genexpression, die zunehmende Grün-Intensität bedeutet eine zunehmende Herabregulierung der Genexpression. Grau zeigt an, dass kein Signal messbar ist. Die Clusteranalyse wurde mit der SMD sowie den Programmen SAM, Cluster und TreeView durchgeführt.

Bei einer Nutzung dieser signifikanten Genliste (Vergleich 46,XX-Personen) für eine Analyse aller Normalkontrollen, der sechs Personen mit Adrenogenitalem Syndrom sowie der anderen Intersex-Patienten ergab sich bei 358 Transkripten eine eindeutige Abtrennung der AGS-Personen von der Gruppe der Normalkontrollen und der übrigen Intersex-Patienten (Bild 4.2.7). Die P113 (männlicher Phänotyp) und P114 wiesen einen leichten Unterschied zu den übrigen vier AGS-Personen auf. Die LCH-Patientin (P110) wird den AGS-Block zugeordnet. P115 mit einem vermuteten Androgenbiosythesedefekt wird ebenfalls der Peripherie des AGS-Blockes zugeordnet.

Bei den Normalkontrollen ergab sich keine Auftrennung der Individuen aufgrund der Geschlechtszugehörigkeit, auch die übrigen Intersex-Personen weisen kein eindeutiges Gruppenmuster auf. Die Normalkontrolle N-M-104 clusterte innerhalb der AGS-Gruppe und unterschied sich vom Profil der untersuchten Gene deutlich von den anderen männlichen Personen der Normalkontrollen.

Zu den interessanten, in AGS-Personen signifikant exprimierten Genen gehören u.a. erneut das SSX1 (Synovial sarcoma, X breakpoint 1), das LAMA4 (Laminin alpha 4), das SHBG (Sex hormone-binding globulin) oder das GAGE2 (G antigen 1).

Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass geschlechtsdimorph unterschiedlich exprimierte Gene entweder mit dem 46,XX oder dem 46,XY Chromosomensatz assoziiert waren oder teilweise davon unabhängig den genitalen Phänotyp widerspiegeln.

Somit können die basalen Unterschiede zwischen den Normalkontrollen und den Intersex-Patienten zum einen auf chromosomale Unterschiede, aber auch auf andere, den Phänotyp ausprägende Faktoren zurückgeführt werden. Da der Grad der genitalen Virilisierung von der An- oder Abwesenheit von Androgenen abhängt, muss es sich bei diesen Faktoren um Androgenwirkungen handeln.

Es konnten somit relevante basale Expressionsdaten zur Beschreibung des Phänomens Intersex (GD, AGS) durch die vorangegangenen MA-Analysen aufgezeigt werden.

Neben der mehr deskriptiven Nutzung der MA-Technik können auch funktionelle Analysen auf Genexpressionsebene mit MA's durchgeführt werden. Hierzu gehören z.B. sogenannte time-course-Experimente.

4.3 Einfluss von Dihydrotestosteron auf PBMC-Expressionsprofil

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob bestimmte Response-Profile mit dem Virilisierungsprofil assoziiert sind und diese somit widerspiegeln.

Die Untersuchung des Einfluss von Androgenen auf die Genexpression in GSF-Zellen ist im klassischen Zellkultur-Modell nicht möglich, da diese nicht Androgen-responsiv sind (Vergleich 4.1).

Ausgangspunkt dieser Untersuchung ist die in der Literatur beschriebene AR-Expression in Blutzellen sowie deren beschriebene Androgen-Responsivität. Die Untersuchung der Konsequenzen von Androgenwirkung auf das Expressionsprofil von Blutzellen war somit interessant. In ersten Versuchsreihen wurden zunächst PBMCs von männlichen Normalkontrollen 46,XY eingesetzt.

Ziel dieses Teilprojektes war die Fragestellung, ob die Einwirkung von verschiedenen DHT-Konzentrationen auf PBMC unter Zellkulturbedingungen innerhalb von 24 h im Expressionsprofil nachweisbar sein würden. Das hierbei als Stimulus eingesetzte Hormon Dihydrotestosteron (DHT) war in 100% EtOH gelöst, die Kontroll-Experimente wurden parallel nur mit der entsprechenden Menge EtOH durchgeführt.

Zur Berechnung der Induktion bzw. Repression der Genexpression aufgrund der Hormoninkubation wurden aus den beiden unabhängigen EtOH-Kontrollen zunächst der Mittelwert der R/G-Ratios jedes Gens gebildet. Dieser Wert diente dann als Teiler für die fünf verschiedenen Hormoninkubationswerte.

Für diese Analyse wurde anstelle der sonst üblichen Darstellung der Messwerte als „R/ G log base 2 Normalized Ratio“ der „R/ G Normalized Mean“ verwendet. Die Quotienten wurden vor dem Clustervorgang erneut logarithmisiert, damit eine gleiche Gewichtung von Herauf- und Herabregulation während der Clusteranalyse gewährleistet ist. Im Clustering erfolgte keine mittlere Zentrierung der Arrays, da direkt die Herauf- oder Herabregulation der Genexpression dargestellt werden sollte.

In Bild 4.3.1 sind die Experimente mit fünf verschiedenen DHT-Konzentrationen dargestellt. Der vorliegende Datensatz wurde mit den Filtern „80% auswertbare Daten“ sowie „mindestens 4 Signale über 1.5“ auf 282 Transkripte reduziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass PBMCs auf Expressionsebene somit androgenresponsiv sind.



Bild 4.3.1: Vergleich der Genexpression von PBMCs eines normalen männlichen 46,XY Individuums bei DHT-Inkubation für 24 h. Verwendet wurden unterschiedliche Konzentrationen von DHT (50 nM; 5 nM; 0,5 nM; 0,05 mM; 0,005 nM und 0,0005 mM) und EtOH (1:10.000) als Kontrollstimuli. Für die Analyse wurden die absoluten DHT-Messwerte durch den Mittelwert der beiden EtOH-Leerkontrollen geteilt. Anschließend erfolgte eine Logarithmisierung der Messwerte.

Die zunehmende Rot-Intensität bedeutet eine zunehmende Heraufregulierung der Genexpression, die zunehmende Grün-Intensität bedeutet eine zunehmende Herabregulierung der Genexpression durch die Gabe von DHT. Grau zeigt an, dass kein Signal messbar ist. Die Clusteranalyse wurde mit der SMD sowie den Programmen SAM, Cluster und TreeView durchgeführt.

In weiteren sog. „Data-mining“-Analysen wurden die Expressionsdaten der DHT-inkubierten Zellen mit denen der mit dem Kontroll-Stimulus LPS inkubierten Zellen verglichen. Diese Daten wurden nicht als Cluster-Abbildungen dargestellt.

Der für diesen funktionellen Analyse-Ansatz ursprünglich geplante Vergleich von zwei unabhängigen Versuchsreihen an Hormoninkubationsexperimenten konnte aufgrund von erheblichen Unterschieden zwischen den zunächst verwendeten Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern und den später eingesetzten Ultra-GAPS-Objektträgern von Corning (Acton, MA, USA) nicht durchgeführt werden.

In diesem, auf funktionellen Untersuchungen basierenden, Analyse-Ansatz sollen in der Arbeitsgruppe von Prof. Holterhus langfristig neben Normalkontrollen auch Hormoninkubationsexperimente am PBMC-Zellkulturmodell bei verschiedenen Intersex-Personen durchgeführt werden.

Dieses Vorgehen ermöglicht die Identifikation von Biomarkern der Androgenwirkung, die zur Diagnosestellung „Androgeninsensitivität“ (AIS) herangezogen werden könnten (z.B. bei Abwesenheit einer Mutation trotz eindeutiger klinischer Kriterien). Dies könnte zu weiteren Bausteinen in der Entwicklung eines in-vitro Androgenrezeptor-Assays führen. Des Weiteren sind diese Art von Analysen Ansatzpunkte für mögliche Hormon-Therapien, da so die Wirkung bestimmter Hormonkonzentrationen auf die Expression bestimmter Schlüsselenzyme gemessen werden könnte.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Während dieser Arbeit wurden alle nötigen Arbeitsmethoden zur Durchführung vom Microarray-Experimenten im Labor etabliert, zudem erfolgte die Etablierung verschiedener Auswerteprogramme und –methoden sowie der Aufbau einer MA-Datenbank mit über 70 Microarrays, die fast drei Millionen einzelne Messwerte umfasst.

Im Teilprojekt AR-Coregulatoren wurden auf genetischer Ebene funktionell relevante Cofaktoren in GSF- und LNCaP-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass GSF-Zellen für funktionelle Analysen der AR-Signaltransduktion ungeeignet sind, da diese nicht androgenresponsiv sind. Die Ergebnisse zeigen, dass in GSF-Zellen relevante Corepressoren der Androgenwirkung höher exprimiert sind und relevante Coaktivatoren niedriger exprimiert sind als in androgen responsiven LNCaP-Zellen.

In den Analysen mit PBMC konnten signifikant unterschiedliche Expressionsprofile für verschiedene Intersex-Formen wie AGS, GD, P450SCC u.a. in Blutzellen im Vergleich zu männlichen und weiblichen Normalkontrollen und somit in nicht gonadalem Zellmaterial aufgezeigt werden. Es konnten zudem signifikante Gengruppen dargestellt werden, die zur Unterscheidung von Normalkontrollen und Intersex-Personen beitragen.

In einer funktionellen Analyse wurde die Wirkung von DHT auf das Expressionsprofil der PBMCs untersucht. Es konnten erstmals auf Genomebene umfassend herauf- und herunterregulierte Gene in PBMC identifiziert werden.

5. Diskussion

Vor Beginn der MA-Untersuchungen in der Forschergruppe waren umfangreiche Methoden neu zu etablieren, da zuvor noch keine entsprechenden MA-Experimente und Analysen in der Forschergruppe durchgeführt worden waren. Die Datenauswertung wurde anhand bereits vorliegender MA-Datensets von GSF- und LNCaP-Zellen etabliert und diese unter verschiedenen Fragestellungen analysiert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die für verschiedene Intersex-Ausprägungen (AGS, GD, SRD5A2, P450SCC, 17 β -HSDIII) relevanten Markergen-Gruppen in Blutproben zu ermitteln und zudem durch Hormonstimulierungsversuche potentielle Biomarker der Androgenwirkung zu identifizieren.

Die bei den Etablierungsarbeiten erarbeiteten Strategien werden im Folgenden dokumentiert und mit Hilfe von Literatur diskutiert. Zunächst werden die generellen Faktoren bei der Durchführung eines Microarray-Experimentes betrachtet. Anschließend erfolgt die Diskussion der Versuchsergebnisse.

5.1 Durchführung eines Microarray-Experimentes

5.1.1 Sondenherstellung

In einem MA-Experiment wird die mRNA einer bestimmten zellulären Probe für eine Hybridisierungsreaktion gegen bereits bekannte genetische Teilsequenzen verwendet.

Bei der Bezeichnung der markierten Probe bzw. der immobilisierten Probe auf dem MA gibt es eine unterschiedliche Nomenklatur. In einem der ersten MA-Artikel (Schna et al. 1995) werden die gedruckten, immobilisierten Proben als „target“ und das markierte Material als „probe“ bezeichnet. Mittlerweile hat sich die Bezeichnung genau umgekehrt: Das Material in einem Druckpunkt wird als „probe“ und die markierten Moleküle als „target“ bezeichnet. Da die deutsche Übersetzung von „target“ nicht optimal ist, wurde in dieser Arbeit der allgemeine Begriff „Probe“ für beide Molekülsorten verwendet. Der entsprechende Kontext ermöglicht eine eindeutige Zuordnung.

Als Referenz-Probe wurden pro Experiment 50 μ g Gesamt-RNA (Human Common Reference RNA) verwendet und mit Cy3 markiert. Bei den Cy5-markierten experimentellen Proben wurden unterschiedliche Ansätze angewendet. Bei dem Zellkultur-Material wurden 50 μ g Gesamt-RNA verwendet, bei Blutproben wurden 3 μ g amplifizierte RNA eingesetzt.

Die Mengen wurden anhand der photometrischen Konzentrationsbestimmung berechnet. Aufgrund der Relativierung durch Quotientenbildung (Experiment/ Referenz) ist die Menge an einzusetzender RNA variabel, es unterscheidet sich nur die absolute Signalstärke (Ojaniemi et al. 2003). Um möglichst konstante Bedingungen einzuhalten und die Zahl der

Variablen im Experiment gering zu halten, sollte jedoch möglichst immer die gleiche Menge RNA eingesetzt werden.

Die optimale Bestimmung der RNA-Konzentration sowie der RNA-Qualität kann mit einem BioAnalyzer der Fa. Agilent (Santa Clara, Ca, USA) durchgeführt werden. Diese Gerät stand bei dieser Arbeit jedoch nicht zur Verfügung. Für die Qualitäts- und Quantitätsüberprüfung wurden Gel-Elektrophorese und photometrische Messung verwendet.

Für die reverse Transkription sollte immer dasselbe RT-Enzym verwendet werden, da Ausbeute und Länge der cDNA-Moleküle vom verwendeten Enzym abhängen. In einem Vergleich von acht verschiedenen Enzymen konnten Stahlberg et al. nachweisen, dass die Effizienz im Mittel zwischen 25 und 83% variieren kann und dass die Ausbeute genabhängige Variationen (bis Faktor 100) aufweist (Stahlberg et al. 2004).

Der direkte Einbau von Cy-Fluoreszenz-Molekülen während der RT-Reaktion ist im Vergleich zu der indirekten Markierungsmethode (zunächst Aminoallyl-dUTP-Bausteine, anschließend Kopplung von N-Hydroxysuccinimid-aktivierten Cy-Farbstoffe an die Allylgruppen) weniger effizient. In der Literatur (Farjo et al. 2002; Yu et al. 2002) ist beschrieben, dass bei der direkten Kopplung der Einbau der Farbstoffe unregelmäßig erfolgt, da die durch die angekoppelten Farbstoffe stark vergrößerten Bausteine die Effizienz der Reversen Transkriptase negativ beeinträchtigen. Durch einen Überschuss an Farbstoff-gekoppelten Nukleotiden kann diesem Effekt teilweise entgegengewirkt werden.

Um die in Lübeck generierten Array-Daten mit den Daten der in Stanford von Herrn Prof. Holterhus hergestellten Arrays besser vergleichen zu können, wurde jedoch für beide MA-Projekte die direkte Markierung von den dortigen Arbeitsgruppen Brown und Brooks übernommen.

Ein alternatives Markierungsmodell ist die Verwendung von Biotin-gekoppelten Nukleotiden und anschließender Detektion des Hybridisierungssignals mittels Anti-Biotin-Antikörpern, die mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt sind.

Für die Abschätzung der Fluoreszenz-Aktivität der markierten Sonden kann die Absorption der Proben im Photometer gemessen werden (OD 260, 450, 520, 550, 650). Dies hat den Nachteil, dass das gesamte Sondenvolumen für die Messung verwendet werden muss. Es erhöht die Gefahr der Kontamination und fördert ein Ausbleichen der Farbstoffe (Lage et al. 2002). Diese Überprüfungsmethode wurde während der Diplom-Arbeit am Biozentrum Hamburg getestet, die Messwerte hatten nur eine geringe Aussagekraft.

Alternativ kann die Fluoreszenz über Mikroabsorptions-Spektroskopie (Nagai und Chapman 2002) gemessen werden. Eine weitere Überprüfungsmethode der Markierung wurde von Lage und Mitarbeitern bzw. Carvalho und Mitarbeitern publiziert (Lage et al. 2002; Carvalho et al. 2003). Ein Mikro-Gel aus Acrylamid auf einem Objektträger wird mit den markierten Sonden beladen und im MA-Scanner eingelesen.

Anstelle der Ozon-sensiblen Cy-Farbstoffe (Fare et al. 2003) können alternativ auch andere Farbstoffe für die Markierung eingesetzt werden. Hierzu gehören auch die Alexa-Farbstoffe (Invitrogen/ Molecular Probes, Eugene, Or, USA), welche laut einem Test von Wildsmith (Wildsmith et al. 2001) im Vergleich zu Cy3 ein fast dreifach stärkeres Signal in der Detektion aufweisen.

Neben der klassischen Zwei-Farb-Markierung wurden bereits Systeme entwickelt, um drei bzw. vier verschiedene Proben parallel in einem MA-Experiment zu messen (Forster et al. 2004; Hessner et al. 2003; Staal et al. 2005). Es gibt jedoch auch Tendenzen, zu der Ein-Farb-Markierung zurückzukehren, um die ungleichen Einbauraten der verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffe zu umgehen (DualChip[®]-System, Eppendorf; GeneChip[®]-System, Affymetrix).

Neben der suboptimalen, da lichtempfindlichen und teuren, Fluoreszenz-Markierung wird zunehmend an der Etablierung von Gold- bzw. Silberdetektion gearbeitet (Qiagen und Eppendorf). Die Nutzung von Chemolumineszenz wird zur Zeit nur von den Firmen ABI und Superarray angeboten. Die erhebliche Kostenersparnis bringt jedoch deutlich geringere Sensitivität im Nachweissystem mit sich.

5.1.2 Klone für Microarrays

Die in dieser Arbeit verwendeten cDNA-MA's der Stanford Functional Genomics Facility (SFGF) basieren auf IMAGE-Klonen des IMAGE-Consortiums (Livermore, Ca, USA). Vor der Nutzung der Klone für die Herstellung von Proben für die MA's werden die Sequenzen überprüft, um fehlerhafte Klone und somit fehlerhafte Sequenzen auf dem MA zu vermeiden. Nach einer Studie von Halgren et al. (Halgren et al. 2001) waren nur 62% von 1189 bestellten Maus-IMAGE-Klonen korrekt und nicht kontaminiert. Die anderen 38% wiesen falsche Sequenzen auf, waren unleserlich oder enthielten mehr als eine Sequenz.

Das IMAGE-Consortium gibt die Fehlerquote offiziell mit 10% an.

Auch bei der Herstellung des Microarrays können Kreuz-Kontaminationen erfolgen. Wenn hierbei ein Übertrag von cDNA aus Genen mit hoher Expressionsrate zu Genen mit niedriger Expressionsrate erfolgt, führt dies zu einer Verfälschung der Daten der schwachen Expression (Richmond und Sommerville 2000).

Bedingt durch die Miniaturisierung sind Falschsequenzen auf dem Objektträger nur schwer oder gar nicht zu entdecken bzw. nachzuweisen. Die Übertragung der cDNA-Proben muß der eingestellten Zuordnung entsprechen. Das Programm darf keine Fehler enthalten.

Auch die in der SFGF hergestellten MA's sind nicht frei von Fehlern. Tu und Mitarbeiter konnten durch Nutzung der Distanz-Metrik sogenannte Plattendreher in der Produktion und Druckfehler nachweisen (Tu et al. 2004). Diese auf 265 Mio. Features basierende Analyse konnte 1,3 Mio. dieser Messwerte (0,5%) als potentiell fehlerhaft nachweisen. Bei dem Oligo-

basierten Affymetrix-System entsprechen ca. 20% der Proben nicht der entsprechenden Sequenz in der Datenbank.

Fehlinterpretationen von Hybridisierungssignalen sind möglich, da durch die Nutzung von cDNA-Fragmenten nur Teilsequenzen der Gene auf die Objektträger gedruckt werden. Viele Gene enthalten zudem auch Sequenzabschnitte, die eine hohe Sequenzhomologie untereinander aufweisen, so daß unter Umständen eine Kreuzhybridisierung erfolgen könnte (z.B. eng verwandte Sequenzen einer Genfamilie wie die *Lhc*-Gene). Wie bei allen Nukleinsäure-Hybridisierungen können im MA-Experiment hochkonservierte Gensequenzen nicht unterschieden werden (Ruan et al. 1998).

Die Qualität der in dieser Arbeit verwendeten Microarrays wurde durch Testhybridisierungen an der Stanford University bestmöglich überwacht.

5.1.3 Spotting der Microarrays

In diesem Projekt wurden bereits gedruckte 43K-cDNA-MA's der SFGF verwendet. Die für das Drucken verwendeten Stahl-Nadeln, welche im Innern ein kleines Reservoir aufweisen (Split-Pins), übertragen kleine Flüssigkeitsmengen durch aktives Berühren der Chip-Oberfläche (Kontaktverfahren). Die Nadeln (48 Stück) sind in einem sog. Nadelkopf eingehängt und können mittels einer Feder entgegen der Druckrichtung leicht nachgeben (Dämpfung). Dies ist nötig, um eine zu starke Berührung der Oberfläche durch die Nadel und somit eine Beschädigung der Array-Beschichtung zu vermeiden.

Bei einigen der in der Stanford-Microarray-Facility verwendeten Nadeln war dieser Federweg nicht mehr ganz funktionsfähig. Als Folge wiesen einige der 48 Pin-Arrays (jeweils Gesamtheit der Druckpunkte, die von einer Nadel hergestellt werden) Beschädigungen an den Druckpunkten auf. Die Stärke der Beschädigung war variabel. Minimale Beeinträchtigungen ergaben sich durch nicht ganz runde Druckpunkte. Bei maximaler Beschädigung waren auf der oberen und der unteren Seite des Druckpunktes jeweils 25% des Gesamtdruckpunktes auf der Glasoberfläche weggestanzt. Der Abdruck des Split-Pins auf dem Array war deutlich zu erkennen. Diese Beschädigung des Druckpunktes hat zunächst eine geringere Pixelmenge zur Berechnung des Signals zur Folge, da bis zu 50% weniger cDNA als Fänger-Probe im Druckpunkt vorhanden ist. Die Standardabweichungen dieser Messpunkte sind potentiell ebenfalls höher, da sich der Mittelwert aus geringeren Pixelzahlen berechnet und somit fehlerhafte Pixel erheblich mehr Einfluss bei der Berechnung haben. Bei noch stärkerer Beschädigung stößt die Nadel zudem durch die Oberflächenbeschichtung des MA's hindurch bis auf das Glas. Beim Scannen des hybridisierten MA reflektiert die angekratzte Glasoberfläche im Druckpunkt im (roten) 642 nm-Kanal. Da die experimentelle Probe Cy5-markiert ist und somit im Falschfarbenbild ebenfalls rot dargestellt wird, kann die Quantifizierungs-Software im 642 nm-Kanal nicht

zwischen Hybridisierungssignal und Glasreflektion unterscheiden. Der beschädigte Druckpunkt muss manuell von der Auswertung ausgenommen werden.

Ein Druck-System mit konstanterem Druckvolumen ist das Ring-and-pin-System. Hierbei wird ein Reservoir des Probenmaterials in einem kleinen Ring vorgehalten, durch den die Nadel stößt und dadurch einen Teil des Probenmaterials auf die Glasoberfläche überträgt.

Daneben gibt es ein aus der Tintenstrahldrucker-Technologie übernommenes Verfahren der piezoelektrischen und somit kontaktfreien Abgabe eines exakt definierten Probenvolumens.

Ein von Affymetrix patentiertes System stellen die GeneChips dar, bei denen die Oligonukleotide mittels photolithographischer Maske direkt auf dem Chip synthetisiert werden. Eine Weiterentwicklung stellt hier das Dynamic Micromirror Device-System (DMD) dar, bei dem die lichtsensitiven Kopplungsreaktionen mittels Mikrospiegeln gesteuert werden (Lausted et al. 2004).

Die Zahl der aufgebrachten Proben und somit deren Abstand zueinander definiert den Unterschied zwischen sog. HighDensity-Chips (mehrere 1.000 bis 45.000 Proben), die dann häufig auch als „Whole-Genome-Chips“ bezeichnet werden, und LowDensity-Chips (einige 100 Proben).

Das Raster, in dem die cDNA-Druckpunkte angeordnet sind, ist aufgrund der technischen Grenzen in der Feinmechanik der Übertragungswerkzeuge nicht perfekt regelmäßig. Die Nadeln sind in den Nadelhalter nur eingehängt. Das leichte Spiel führt zu Varianzen in der Aufbringung. Da die Menge der übertragenen Flüssigkeit und somit der cDNA zumindest bei „Split“-Nadeln nicht in jedem Fall gleich ist, können bei identischen Druckpunkten (Kopien) verschiedene Signalstrukturen entstehen. Die Druckpunktgröße variiert abhängig vom verwendeten Nadelsystem zwischen 50 und 500 μm im Durchmesser.

Die Neuentwicklung von sog. 2D/ 3D-Chips ist eine Möglichkeit, um dieses Problem bei der Drucktechnik zu mindern. Eine vorstrukturierte Oberfläche mit hydrophilen Anker-Molekülen auf der Oberfläche bestimmt ein symmetrisches Raster der gedruckten Proben mit jeweils exakt der gleichen Probenmenge. Die restliche Oberfläche vom Chip ist stark hydrophob und minimiert somit die unspezifischen Bindungen auf dem Objektträger.

5.1.4 Hybridisierung

In der Arbeitsgruppe von Prof. Holterhus wurden für die Hybridisierung der 43K-MA's Lifterlips der Firma Erie verwendet. Diese haben im Vergleich zu den normalen Deckgläschen (Coverslip) den Vorteil, dass aufgrund von seitlichen Stegen ein konstanteres Hybridisierungsvolumen zur Verfügung steht. Vorversuche mit Standard-Deckgläschen führten zu seitlichem Auslaufen der Hybridisierungslösung (leakage), da das Deckgläschen

bei diesem System als Ganzes auf der Lösung schwimmt. Dies resultierte zudem in unregelmäßigen Hybridisierungsergebnissen.

Im statischen Experiment mit einem Lifterslip kommen nur 0,3% der markierten spezifischen Sonde durch Diffusion zu der aufgetragenen Probe. Aktives Mischen der Hybridisierungslösung (entweder durch Mikropumpe oder durch Schütteln des MA's) erhöht die anschließende Signalstärke um bis zu 300% (Schaupp et al. 2005). Hierzu sind jedoch geschlossene, auf dem MA-Träger aufgeklebte Systeme mit sog. ports zum Befüllen wie das HybriWell von Grace Biolabs (Bend, Or, USA) oder der HybFrame von Eppendorf notwendig. Für die großen 43K-MA's sind jedoch keine dieser Hybridisierungskammern erhältlich.

5.1.5 Scannen

Nach der Hybridisierungsreaktion werden Fluoreszenzmessungen mit einem speziellen Mikroskop (Scanner), welches jeden Proben-Druckpunkt illuminiert und die Fluoreszenz für jeden Farbstoff einzeln (Experiment und Referenz) misst, durchgeführt. Bei dieser optischen Detektion wird die Fluoreszenzstärke für die Quantifizierung der Probenmenge verwendet. Je höher die Konzentration der Sonde im Probenmaterial war, desto stärker ist das aufgenommene Signal pro gescannter Flächeneinheit (Pixel). Mittels eines Analog-to-digital-converters (ADC) erfolgt eine Transformation des optischen Signals jedes Probenpunktes in eine digitale, numerische Form, bei der insgesamt pro eingesetztem Farbstoff ein 16-Bit-Grauenstufenbild erzeugt wird, welches anschließend als Falschfarbenbild auf dem Monitor darstellbar ist. Dies beschränkt den messbaren, linearen Bereich der Fluoreszenzstrahlung auf $65.536 (2^{16})$ relative Fluoreszenz-Einheiten (RFU) (Sharov et al. 2004).

Für die Generierung eines Durchschnittsbildes ist ein mehrmaliges Scannen mit gleicher PMT-Einstellung sinnvoll, Programme wie Σ POT bilden dann aus mehreren Aufnahmen einen Mittelwert (Romualdi et al. 2003). Möchte man den linearen Messbereich vollständig nutzen, um sowohl schwach exprimierte als auch stark exprimierte Gene zu detektieren, kann dies durch mehrere Scanaufnahmen mit verschiedenen PMT-Einstellungen erfolgen, welche dann mittels Software miteinander verrechnet werden (deLongueville et al. 2002).

Es gibt zwei verschiedene Scanner-Systeme für die Fluoreszenz-Signalmessung: weit verbreitet und technisch relativ einfach ist die Anregung der Fluoreszenz-Moleküle mit einem Laser und anschließender Messung mit einem Photodetektor. Eine Glas-Photo-Kathode (PMT = Photo-Multiplier-Tube) dient zur Verstärkung des entstandenen Photonenstroms. Hierzu gehören Geräte wie die GenePix-Scanner von Axon/ Molecular Devices (Union City, CA, USA), die ProScan/ ScanArrayExpress-Scanner von PerkinElmer (Shelton, CT, USA) oder die Typhoon-Scanner von GE Healthcare (Amersham, Freiburg).

Weitaus effektiver sind Systeme mit einer Halogen-Bogenlampe und der Emissionsmessung durch eine CCD-Kamera (charged coupled device) mit Interferenz-Filtern für die

verschiedenen Wellenlängen der unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffe. Hierzu sind jedoch komplexe und große externe optische Systeme nötig, die zu einem hohen Gerätepreis führen (Bsp: ArrayWoRx BiochipReader von Applied Systems (Issaquah, WA, USA) oder AlphaArray von Alpha Innotech (CA, USA)).

Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden mit einem confocalem, Laser-basiertem Fluoreszenz-Scanner 4000B von Axon generiert. Die Steuerungssoftware war GenePix 4.1.

5.1.6 Validierung von MA-Daten mit Real-Time PCR

Momentan wird von den Reviewern häufig eine Validierung der MA-basierten Expressionsergebnisse mittels Real-Time-PCR gefordert, da diese Methode als sog. Goldstandard angesehen wird. Hierbei sind jedoch bestimmte Dinge zu beachten.

Genau wie bei der MA-Technologie müssen die Messwerte bei der Real-Time-PCR normalisiert werden. Im Gegensatz zu der MA-Normalisierung werden bei der RT-PCR mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode i.d.R. nur ein oder zwei housekeeping-Gene für die Normalisierung der Messdaten eingesetzt. Dies bedeutet, die Qualität der Ergebnisse hängt von der Auswahl der housekeeping-Gene für die Normalisierung der Real-Time-PCR-Ergebnisse ab. Diese Auswahl ist somit kritisch für die Interpretation von Real-Time Expressionsdaten generell.

Bei den Genen ACTB, GAPDH, 18S und 28S, welche für die Normalisierung weit verbreitet sind, zeigen mittlerweile viele Studien, dass sich die Transkriptionslevel dieser Gene signifikant zwischen Individuen, bei Probenentnahmen zu verschiedenen Tageszeitpunkten, Zelltypen, Entwicklungsstadien, verschiedenen Krankheitsstadien und experimentellen Konditionen unterscheiden (Suzuki et al. 2000; Warrington et al. 2000; Bustin 2000; Bustin und Nolan 2004; Thellin et al. 1999). In RNA aus neutrophilen Zellen waren nur 5 von 10 weit verbreiteten housekeeping-Genen nutzbar (Zhang et al. 2005). Dheda et al. konnten nachweisen, daß in Blutzellen von 13 klassischen housekeeping-Genen nur eines eine Variabilität von kleiner 2 aufwies. Das klassische housekeeping-Gen GAPDH kann um den Faktor 30 variieren (Dheda et al. 2004).

Bei Vergleichen von mRNA Expressionsdaten aus Real-Time-PCR und cDNA-MA's ergibt sich im allgemeinen, unter Berücksichtigung bestimmter Faktoren, bei ca. 90% eine Übereinstimmung der Daten (Larkin et al. 2005). Diese Übereinstimmung ist jedoch nur dann nachweisbar, wenn moderate Expressionsebenen verglichen werden und wenn eine Sequenz-Überlappung zwischen Lokalisation der PCR-Primer und der Sonden-Sequenzen auf den MA's vorliegt (Etienne et al. 2004; Larkin et al. 2005).

Eine weitere, zunehmend anerkannte Methode der MA-Daten-Validierung ist die Reproduktion der Expressionsprofile auf einer anderen MA-Plattform, d.h. die Nutzung von Oligonukleotid-basierten und cDNA-basierten MA's (Barnes et al. 2005). Unterschiede zwischen Expressionsstudien auf verschiedenen Array-Plattformen basieren auf

Unterschieden im Arbeitsablauf während der Experimente und der Datenauswertung (Sherlock 2005; Irizarry et al. 2005). Durch Unterschiede bei unterschiedlichen Sonden-Sequenzen können auch splice-Varianten eine Rolle spielen.

Die Spotgröße, die Zahl der Sonden-Moleküle, die Konzentration, das Markierungsprotokoll und die unterschiedlichen Quantifizierungsalgorithmen führen dazu, dass bei einem inter-Plattform-Vergleich Unterschiede zwangsläufig sind, da die absoluten Signalwerte nie gleich sein können (Petersen et al. 2005; Suarez-Farinas et al. 2005). Die Tendenz sollte jedoch übereinstimmend sein. Bei einem Vergleich zwischen cDNA-Arrays und Oligonukleotid-Affymetrix-Arrays kann eine hohe Konkordanz nachgewiesen werden, wenn nur diejenigen Proben in die Analyse einfließen, die eine überlappende Transkript-Sequenz auf beiden Array-Typen aufweisen. Werden nur die UniGene-IDs als Anhaltspunkt verwendet, so können mit einer UniGene-ID verschiedene Teilsequenzen eines Gens definiert sein. Dies kann zu erheblichen Diskrepanzen im Expressionsprofil zwischen cDNA- und Oligonukleotid-Arrays führen (Carter et al. 2005). Die Unterschiede bei der Signalmessung zwischen Oligonukleotid- und cDNA-Arrays kann zudem darauf basieren, dass nur hohe Konzentrationen von langen Oligonukleotiden die gleiche Signalstärke erreichen wie niedrige Konzentrationen von cDNAs. Die aufgedruckten längeren cDNA-Moleküle reichen weiter über die MA-Oberfläche hinaus und sind somit für die Bindung der Sonde besser geeignet (Chou et al. 2004).

5.2 Datenauswertung

Vor Beginn der praktischen Arbeiten musste die Entscheidung getroffen werden, ob für die anstehenden Untersuchungen zur Beschreibung der Intersex-Formen ein klassisches Zellkulturmodell mit GSF-Zellen oder ein Blutmodell zu bevorzugen war. Aus diesem Grund wurden bereits vorhandene MA's, die auf LNCaP- und GSF-Zellkulturen basierten, einer sorgfältigen Auswertung unterzogen. So konnten zudem die Methoden zur Auswertung von umfangreichen MA-Datenmengen bereits parallel zu der Etablierung der experimentellen Methoden aufgebaut werden.

Die Etablierung der Datenauswerteprogramme verlief in mehreren Schritten. Die nach dem eigentlichen Experiment als Bild-Datei (tif-image) gespeicherten Signale müssen identifiziert und quantifiziert werden. Anschließend werden die Daten normalisiert und in eine Datenbank eingeladen. Auf Basis dieser Datenbank erfolgt die eigentliche Auswertung der Experimente mit Cluster-Programmen.

5.2.1 Quantifizierung der Mess-Signale

Für die Auswertung der MA-Hybridisierungen ist zunächst eine genaue Identifizierung der Druckpunkte nötig. Die Zuordnung erfolgt mit einem Setting-File, der eine Art Gitternetz (grid) darstellt und die Position jedes Druckpunktes auf dem Objektträger bzw. auf dem Bild des Objektträgers definiert. Hierzu sind Daten wie der Durchmesser der Punkte, der Abstand der Punkte untereinander, die Reihenfolge der Punkte, usw. erforderlich.

Die Positionierung des Gitternetzes kann mit einer speziellen Quantifizierungssoftware entweder manuell oder über die automatische Spot-Finding-Funktion erfolgen. In den letzten fünf Jahren (Diplom-Arbeit, Promotionsarbeit, Applikation Microarrays Fa. Eppendorf) wurden verschiedene dieser Programme in verschiedenen Versionen verwendet (Feature Extraction Software von Agilent; GenePix von Axon; ImaGene von BioDiscovery; ScanAlyze von der Eisen-Gruppe/ University of California, Berkley; ScanArrayExpress und QuantArray von Perkin Elmer; Silverquant von Eppendorf; softWoRx-Tracker von ArrayWoRx; ArrayVision von Amersham GE-Healthcare; TM4-Spotfinder vom TIGR-Consortium). Es gab kein Programm, das eine automatische Spot-Finding-Funktion aufwies, die in der Qualität der manuellen Anpassung entsprach. Selbst mit LowDensity-MAs ist die Qualität der Spot-Finding-Funktion der Software sehr abhängig von der Qualität der Druckpunkte.

Während der Erstellung der vorliegenden Arbeit stand die GenePix 4.1-Version zur Verfügung. Diese war für die automatische Positionierung des Gitternetzes nicht effektiv genug. Die später verwendete GenePix 6.0-Version funktioniert relativ gut, jedoch ist auch hier eine manuelle Nachkorrektur der Ergebnisse sinnvoll. Dies ist mit Varianzen in der Auswertung verbunden, da diese manuelle Definition des Druckpunktes subjektiv beeinflusst wird und sehr zeitaufwendig ist (ca. 8 Stunden pro 43K-MA). Es sollten daher möglichst alle MA's einer Untersuchungsgruppe von einer Person bearbeitet werden. Korn und Mitarbeiter konnten in umfangreichen Tests zeigen, dass die Kombination aus automatischem Spotfinding mit der GenePix-Software und manueller Nachkorrektur eine akzeptable Lösung darstellt (Korn et al. 2004).

Nach der Definition der Druckpunkte erfolgt die Quantifizierung oder Segmentierung der Mess-Signale. Für die Unterteilung bzw. die Messung der Strahlungsintensität eines Punktes gibt es verschiedene Methoden. QuantArray (GSI Luminomics, jetzt PerkinElmer) bzw. die aktuelle ScanArrayExpress Software setzt Schwellenwerte im Histogramm der Pixelwerte in einer definierten Region um den Druckpunkt herum (Adaptive Threshold), ScanAlyze (<http://rana.stanford.edu/software/>) verwendet einen Kreis um den Punkt mit einem fixen Radius, GenePix (Axon Instruments) verwendet einen punktspezifischen variablen Messradius (Adaptive Circel), UCSF Spot (Jain et al. 2002) verwendet Algorithmen aus der Histogramm-Segmentierung (die höchste Pixelintensität ist die Probe, die geringste Pixelsignal stellt den Hintergrund dar) und Jung und Cho entwickelten ein Spotfinding mit K-

nearest neighborsgraph, welches die Messung der Spotintensität verwendet (Jung und Cho 2002).

Die Art der Quantifizierungs-Algorithmen können erheblichen Einfluss auf die Präzision der Messdaten haben (Ahmed et al. 2004). Eine Studie sollte somit immer mit dem gleichen Quantifizierungsprogramm durchgeführt werden. Bei einer Quantifizierung eines Arrays mit circa 1000 Druckpunkten (DualChip human general) mit GenePix 6.0, ImaGene 5.0 und ScanArrayExpress 2.2/ 3.0 zeigte sich, dass, global betrachtet, die Quantifizierung der meisten Hybridisierungssignale zwischen den Programmen GenePix und ImaGene nur geringfügig voneinander abwich. Das Programm ScanArrayExpress wies jedoch erhebliche Unterschiede dazu auf.

Bei der Quantifizierung wird neben dem Probensignal auch die Stärke des lokalen Hintergrundes (Grundrauschen) gemessen und anschließend vom Probensignal subtrahiert. Durch Nutzung bestimmter Kontroll-Klone zur Unterscheidung zwischen Signal und Hintergrund, kann dieser Wert verbessert werden (Schuchhardt et al. 2000). Dies ist ebenfalls durch Verwendung von Betain im Druckpuffer und eine Blockierung der MA-Oberfläche mit Succinic-Anhydrid (höhere Druckpunkt-Homogenität und reduziertes Hintergrundsignal) möglich (Diehl et al. 2001).

Probleme bei der Auswertung treten auf, wenn die MA-Daten Fehler enthalten, die durch die Quantifizierungs-Software entstanden sind. So führt z.B. die Übersättigung des Hybridisierungssignals von im Überschuss vorhandenen Transkripten dazu, dass diese starken und sehr starken Signale von der Software in eine mittlere Signal-Intensität umgeformt werden. Damit einhergehend wird zusätzlich der mittlere Fehler („Average difference“) verändert (Hsiao et al. 2002).

Schwache Hybridisierungssignale können auch aus limitierter PCR-Amplifikation oder aus Drucken mit nicht optimal aufgereinigtem DNA-Material resultieren (Abecassis et al. 2003).

Die weitere Nutzung der Messwerte erfolgt in logarithmischer Darstellung, da diese erhebliche Vorteile aufweist. So haben z.B. die im Vergleich zur Referenz-Probe um den Faktor 2 heraufregulierten Gene einen Expressionsquotient von 2 ($2/1$). Entsprechend um den Faktor 2 herunterregulierte Gene haben einen Expressionsquotient von 0,5 ($1/2$). Das Messintervall der herunterregulierten Gene ist somit auf den Bereich zwischen 1 und 0 beschränkt. Durch die Logarithmisierung erscheinen die nicht regulierten Gene ($\log_2(\text{ratio})$) mit einem Wert von Null. Für herauf- und herunterregulierte Gene steht somit jeweils eine endliche Spannweite zur Verfügung, die nur durch das Detektionslimit begrenzt wird.

Niedrige Messwerte enthalten mehr Hintergrundrauschen, jedoch enthalten auch diese Signale u.U. wichtige Informationen. Der allgemein übliche Cut-off bei einem Messwert von z.B. 2,5 ist somit als generelle Methode nicht sinnvoll (van Hijum et al. 2005).

5.2.2 Normalisierung der Daten

Die Normalisierung der Messwerte dient der Reduzierung und möglichst kompletten Eliminierung von Artefakten wie Unterschiede in der Effizienz der Markierungsreaktion, verschiedene Objektträger, lokale mikroskopisch kleine Glasdefekte auf der Oberfläche, Defekte an den Druck-Nadeln, Probleme beim Scannen bestimmter, lokal eng begrenzter Gebiete in einem oder in beiden Kanälen, latente Fingerabdrücke, Kratzer, Staub, Waschartefakte oder zu starkes Trocknen der MA's (Tseng et al. 2001).

Ein erheblicher Teil der nicht normalisierten Genexpressionsprofile reflektiert nicht nur den Einfluß biologischer Zustände, sondern basiert auch auf verschiedenen technischen Artefakten, die bei der Erstellung eines MA-Datensets zwangsläufig entstehen. Der Einfluss von fehlerproduzierenden Faktoren bei dem gesamten Prozess ist schwer einzuschätzen, da das Wissen über das wie und wo bisher sehr begrenzt ist. Die Normalisierung ist nur ein kleiner Teilschritt in der Gesamtanalyse, er hat jedoch einen essentiellen Einfluss auf die Ergebnisse. Entsprechend viele verschiedene Methoden wurden entwickelt (Dean und Raftery 2005).

Bei der in der Arbeitsgruppe verwendeten globalen linearen Normalisierung wird von dem theoretischen Ansatz ausgegangen, dass die weitaus meisten Gene keine signifikanten Veränderungen aufweisen. Jeder Messwert wird durch den Mittelwert (mean) aller Messpunkte dividiert. Hieraus berechnet sich der globale Normalisierungsfaktor, der dann zur Re-Skalierung der Messwerte für jedes Gen einzeln dient (Quackenbush 2001). Dies führt in einem Scatterplot zu einer Verteilung der logarithmisierten Quotientenwerte (Mess-Intensitäten) auf einen Median-Wert von Null auf jedem Array (Schena et al. 1996). Eine Verbesserung der globalen Normalisierung kann durch Nutzung lokaler Regression erfolgen. Dies führt zu einer realistischeren Auswertung der normalisierten Expressionslevel genauso wie der davon abhängigen Fehlervarianzen (Kepler et al. 2002; Futschik und Crompton 2004). Die globale Normalisierung ist nicht optimal, da sie nur bei HighDensity-MA's funktioniert. Bei den LowDensity-MA's werden vorrangig Sequenzen von solchen Genen verwendet, welche explizit differentiell reguliert sind. Der Ansatz, dass im Durchschnitt alle Gene in ihrer Expression unverändert sind, ist somit nicht möglich (Yang et al. 2002).

Eine Zweistufennormalisierung ist von Vorteil. Zum einen erfolgt eine Normalisierung durch verschieden verdünnte Kontrollen spezieis-fremder spiking-RNA im Hybridisierungsansatz sowie entsprechend der reverse Strang auf dem MA als Druckpunkt (Schuchhardt et al. 2000; Eickhoff et al. 1999), zum anderen können unter bestimmten Voraussetzungen verschiedene housekeeping-Gene zum Normalisieren verwendet werden (deLongueville et al. 2002). Die alleinige Verwendung von einzelnen idealen und universell einsetzbaren housekeeping-Genen für die Normalisierung wie es bei der Real-Time-PCR verwendet wird,

ist nicht sinnvoll, da deren Expression gewebe- und experimentspezifisch zu sein scheint (Kim und Kim 2003; Bustin 2000).

5.2.3 Expressionsdatenbanken

Die enormen Datenmengen, welche bei MA-Experimenten entstehen, müssen sorgfältig verwaltet werden. Ein integratives Laboratory Information Management System (LIMS) ist eine Möglichkeit, um alle Aspekte dieser Analysen zu dokumentieren (Quackenbush 2001). QuickLIMS ist ein Data-Management von der Klon-Platte zum Array (Kokocinski et al. 2003). Die Microarray Gene Expression Data Society (MGED) fordert einen allgemeinen Standard für MA-Experimente, die Minimum-Information-About-a-Microarray-Experiment (MIAME). Diese Informationen sollen dem Leser einer Publikation eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse und eine Reproduktion ermöglichen (Brazma et al. 2001). Ein weiterer Standard ist die Microarray-Gene-Expression-Markup-Language (MAGE-ML). Diese sollte für die Darstellung von MA-Expressionsdaten verwendet werden, um den Austausch von MA-Informationen zwischen verschiedenen Daten-Systemen zu erleichtern (Spellman et al. 2002).

Diese Standards werden mittlerweile von allen wichtigen Journals verlangt. Einige Datenbanken wie der Stanford-Microarray-Database-(SMD)-Ableger Longhorn-Array-Database erfüllen bereits diesen Standard (Killion et al. 2003).

Für die Analysen der MA's wurde in der Gruppe von Prof. Holterhus aufgrund der engen Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jim Brooks aus der Stanford University die SMD verwendet. Diese Datenbank ist mit über 50.000 MA-Experimenten eine der größten MA-Datenbanken weltweit und ermöglicht den Anwendern ein breites Feld an Analysemethoden. Die Nomenklatur der Gene in den Datenbanken ist häufig noch nicht endgültig und da auch in Zukunft mit diversen Änderungen zu rechnen ist, kann es vorkommen, dass einige der Einträge in den Cluster-Analysen nicht mehr zu offiziell anerkannten Genen gehören. Desweiteren könnten Transkripte in Zukunft als Variationen verschiedener Gene definiert werden (Parisi et al. 2004). In dieser Arbeit wurde die Nomenklatur gemäß der SOURCE-Datenbank verwendet, da diese als Grundlage für die Stanford-MA's dient. Diese Nomenklatur stimmt fast komplett mit der Nomenklatur der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene) und dem HUGO-Konsortium (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature.htm) überein. Es gibt bereits Programme wie GFINDER, um die Annotation von Genlisten automatisch zu überprüfen (Masseroli et al. 2004).

5.2.4 Ontology-Datenbanken

Neben den Expressionsdatenbanken gibt es immer mehr Annotationsdatenbanken, in denen die Ontologie der Gene zusammengefasst wird (Anderle et al. 2003).

Die weitaus meisten verfügbaren Ressourcen für funktionelle Informationen sind momentan auf die Betrachtung einzelner Gene beschränkt. Diese Informationen über Gen-Funktionen sind primär in den Artikeln, die in der Medline-Datenbank archiviert sind, zu finden. Spezielle bioinformatische Werkzeuge sind nötig, um das funktionelle Profiling von großen Gen-Sets zu ermöglichen. GeneOntology ist eine Datenbank, die diese Informationen bündelt und in drei Gruppen (biologischer Prozess, molekulare Funktion und zelluläre Komponente) zusammenfasst. Eine Internet-basierte Plattform für die Interpretation von interessanten Gen-Gruppen mit Hilfe dieser Gen-Ontologie-Hierarchien ist die GOTree-Machine (<http://genereg.ornl.gov/gotm/>) (Zhang et al. 2004). Diese wurde in der vorliegenden Arbeit für die Einordnung der aufgelisteten Transkripte aus den Analysen verwendet.

In ArrayXPath erfolgt die Verknüpfung von Expressionsprofilen mit Ontologie-Daten (Chung et al. 2004). PANTHER ist eine relativ einfach aufgebaute Ontologie-Datenbank der Firmen ABI/ Celera (Foster City, Ca, USA). Die Grobübersicht der beteiligten pathways ist kostenfrei, eine genauere und aktuellere Analyse ist jedoch gebührenpflichtig (Thomas et al. 2003).

5.2.5 Daten-Clustering

Microarray-Daten benötigen eine andere wissenschaftliche Darstellungsweise als die bisherige Einzelgen-Analytik. Es gibt fundamentale Unterschiede zwischen der klassischen genetischen Karte und den durch MA-Experimente entstandenen genomweiten Karten. Für die Erstellung dieser Karten, die das globale Programm der Genexpression widerspiegeln, sind neue Ansätze nötig. Die Organisation der Messdaten erfolgt durch hierarchische Cluster-Algorithmen (Eisen et al. 1998), Parametrisierung (Verallgemeinerung von Messungen durch Erstellung von Sonde-Druckpunkt-Modellen und Überführung in Parameter-Modelle) oder Profiling-Methoden, um geordnete Strukturen zu erlangen. Eine Clusterbildung von Daten basiert auf einem Vergleich der Ähnlichkeit zweier Expressionsprofile. Der Informationsgehalt von MA-Daten aus einem Experiment erhöht sich erheblich, wenn diese mit den Expressionsdaten einer Serie von MA-Experimenten in einen Kontext gestellt werden können.

Zu den Methoden gehören Cluster (Tusher et al. 2001), coupled two-way clustering (Getz et al. 2000), ExpressionProfiler und EP:NG (Kapushesky et al. 2004), GenePublisher (Knudsen et al. 2003), GEPAS (Herrero et al. 2003; Herrero et al. 2004; Vaquerizas et al. 2005), MarC-

V (Schageman et al. 2002), MAPPFinder (Doniger et al. 2003), Shrinkage-based similarity metric (Cherepinsky et al. 2003) und andere.

Die Datenprofile müssen graphisch so darstellbar sein, dass einerseits die gesamte Bandbreite der Datenmengen dargestellt wird, andererseits aber auch der „fine-scale“ mit den einzelnen Genen betrachtet werden kann. Eine Reduzierung dieser Daten auf ein einfaches Grundmuster, wie von vielen Zeitschriften zunächst verlangt, eine sog. „bottom-line“, wurde von Brown 1999 in Nature (Brown und Botstein 1999) treffend mit der Erklärung der menschlichen Anatomie anhand eines Strichmännchens verglichen.

Bei der gruppenbildenden Analyse wird zwischen zwei Systemen unterschieden. Die nicht supervidierte Analyse dient der Identifizierung von neuen Mustern/ Gruppen nur anhand der Expressionsdaten. Für diese Algorithmen wird jedoch ein großer Arbeitsspeicher benötigt (Distanzmatrix). Bei nicht supervidierten Analysen, die dazu dienen, neue Taxonomien bzw. neue Gruppierungen der Proben zu identifizieren, ist die identische Markierung aller Proben sinnvoll. Diese Methode ist robuster, einfacher zu analysieren und ergibt bessere Cluster-Ergebnisse als andere Designs (Dobbin und Simon 2002).

Bei der supervidierten Analyse werden bereits bekannte Informationen, z.B. spezifische Genlisten, in die Erstellung des Musters eingebaut.

Durch das Clustering erfolgt eine Strukturierung und Partitionierung der Datenmenge aufgrund eines bestimmten Distanzmaßes, eine Sammlung ähnlicher und Trennung unähnlicher Daten. Die hierarchische Einteilung eines Clusters führt zu unterschiedlich vielen Unterclustern auf den verschiedenen Ebenen der Hierarchie. Es erfolgt eine immer gröbere Partitionierung mit absteigender Ähnlichkeit. Die Partitionierung kann in zwei Richtungen erfolgen. Zum einen die komplexe Variante des „top down“, hierbei beginnt das Programm mit einem Cluster, welches sukzessive aufgeteilt wird, zum anderen das „bottom up“, bei dem mit n Clustern begonnen wird, die sukzessive zusammengefasst werden.

Bei dem Average-linkage-Clustering wird die Distanz zwischen Clustern durch Nutzung von Durchschnittswerten kalkuliert. Die in der Forschergruppe eingesetzte „unweighted pair-group method average“ (CPGMA) berechnet die durchschnittliche Distanz aus der Distanz zwischen jedem Punkt in einem Cluster und allen Punkten in einem anderen Cluster. Die zwei Cluster mit der niedrigsten Durchschnittsdistanz bilden zusammen das nächsthöhere Cluster. Daneben gibt es noch single link (Minimum) und complete link (Maximum) Methoden.

Neben dem hierarchischen Clustering gibt es mittlerweile viele andere Modelle, eine Übersicht statistischer Methode für das Ranking von Expressionsdaten wurde von Broberg bzw. Quackenbush publiziert (Broberg 2003; Quackenbush 2001).

Generell gibt es bei MA-Analysen ein Dimensionsproblem beim Clustern der Daten. Die Schwierigkeit, ein entsprechendes Klassifizierungssystem zu entwickeln bzw. zu benutzen, steigt exponentiell mit der Dimension der Analyse, d.h. der Zahl der eingesetzten Gene, an. Letztendlich werden für solch ein Klassifizierungssystem mehr Trainingssets (Proben bzw. Patienten) als Variablen (Gene) benötigt (Draghici et al. 2003). Dies ergibt, dass die Zahl der Gene, die für die entscheidenden Clusteranalysen verwendet werden sollen, auf die wirklich relevanten Gene begrenzt sein sollte. Jedoch sind selbst beim Einsatz spezifischer Hypothesen und Fragestellungen und sehr eingegrenzten pathways i.d.R. noch hunderte Gene involviert. Dies sind immer noch zu viele Gene für eine Validierung der Ergebnisse mittels quantitativer PCR oder Northern-Blot. Eine Lösung stellen hier LowDensity-MA's dar. Ein Experiment mit deutlich weniger Genen bedeutet auch, deutlich weniger Komplikationen in der statistischen Auswertung zu haben, eine geringere Dimension beim Entwurf des Klassifizierungssystems und generell ein besseres Verhältnis zwischen Dimension (Zahl der Gene) und Datenpunkten (RNA-Proben).

5.2.6 Signifikanz-Test: SAM

Das Clustering ergibt nur unzureichende Information über statistische Signifikanzen. Für genauere Datenanalysen von Expressionsprofilen ist es nötig, die Daten auf einer höheren Organisationsebene als der Rohdaten-Ebene zu evaluieren (Quackenbush 2001).

Die gängigen statistischen Methoden basieren meistens auf dem T-Test. Sie resultieren in der Wahrscheinlichkeit (P), dass ein Unterschied im Expressionslevel eines einzelnen Gens zufallsbedingt ist. Obwohl ein P-Wert von 0.01 für Experimente mit geringer Probenzahl hoch signifikant ist, ist diese Wahrscheinlichkeit für MA's mit 43.000 Druckpunkten nicht nutzbar. In diesem Fall wären pro MA 430 Gene zufallsbedingt falsch positiv signifikant.

Es gibt verschiedene Modelle und Algorithmen für die Unterscheidung, ob Änderungen in der Genexpression signifikant sind, die speziell an die hohe Probenzahl der MA-Experimente adaptiert sind. Das MS-Excel-Makro SAM (significance analysis of microarrays) (Tusher et al. 2001; Broberg et al. 2003) wurde in dieser Arbeit als MA-spezifisches Analyse-Programm verwendet.

SAM generiert unter Verwendung vielfach wiederholter Permutationsschleifen eine two-sample T-Statistik für den normalisierten logarithmischen Quotienten des Expressionswertes für jedes Gen. Es entsteht eine Gen-Liste mit signifikanten Schwellenwerten und einer Abschätzung der falsch-positiven Detektionsrate (Wahrscheinlichkeit, dass Gene zufallsbedingt und nicht aufgrund ihrer Signifikanz detektiert werden). Fehlende Messwerte in einer Serie können durch entsprechende Programme interpoliert werden (Bo et al. 2004; Troyanskaya et al. 2001).

Eine ebenfalls verbreitete Methode ist ANOVA (Analysis of Variances). Dieser auf einem T-Test basierenden F-Test ist eine Analysemethode, um mehr als zwei Gruppen statistisch auszuwerten (Churchill et al. 2004; Cui und Churchill 2003).

5.3 AR-Coregulatoren

Für die Etablierung der Datenauswertung von MA-Experimenten wurden zunächst bereits vorhandene MA's, die auf LNCaP- und GSF-Zellkulturen basierten, einer sorgfältigen Auswertung unterzogen.

Sowohl kultivierte GSF als auch LNCaP-Zellen stellen Zellen bzw. Gewebe dar, die den AR exprimieren (Horoszewicz et al. 1983; Holterhus et al. 2003; Trapman et al. 1988). Es wird angenommen, dass die bereits bekannten gewebespezifischen Androgenwirkungen auf zellspezifischen Unterschieden im molekularen Milieu jedes Gewebes basieren. Diese Signalkaskaden sind in ein feines, eng verzweigtes Netzwerk aus Coaktivatoren, Corepressoren, Chaperonen und Cochaperonen eingefügt (Heinlein und Chang 2002). Die Interaktion des AR mit Coregulator-Proteinen ist somit ein potentiell sehr wichtiger Faktor in der Spezifität von Androgenwirkungen. Bisher wurden primär die Funktion und die Auswirkungen einzelner Cofaktoren untersucht. Für ein besseres Verständnis der Gesamtzusammenhänge bietet sich jedoch eine Untersuchung des Expressionsprofils einer möglichst vollständigen Zusammenstellung aller bekannten Coregulatoren der AR-Signaltransduktion an.

Für die Expressionsanalysen der AR-spezifischen Cofaktoren wurden MA's mit 43.000 Sequenz-validierten humanen cDNAs (32.968 UniGene Cluster) verwendet. Die eingesetzten LNCaP-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die GSF-Zellen kultiviert und entsprechend mit DHT (100 nM und 1000 nM) bzw. Methyltrienolon (0,001, 0,01, 0,1, 1,0 und 10 nM R1881) inkubiert.

Für die Analyse der Transkript-Antwort auf Androgengabe wurden zwei verschiedene experimentelle Designs verwendet. In einer Versuchsreihe wurde RNA von Androgen-behandelten Zellen mit der RNA von unbehandelten Kontroll-Zellen (nur EtOH) auf dem gleichen MA verglichen. Nach Eisen und Brown wird dieses Experiment als „Typ 1“ bezeichnet. (Eisen und Brown 1999). In „Typ 2“ Experimenten wird die RNA von Androgen-behandelten Zellen mit einer Common Reference RNA auf dem gleichen MA verglichen. Entsprechend werden Expressionsdaten für unbehandelte Zellen generiert. Ein „Typ 2“ Experiment kann in ein „Typ 1“ Experiment umgewandelt werden, indem durch Division des behandelten Wertes (ratio) durch den unbehandelten Wert (ratio) der Common Reference Faktor eliminiert wird.

Für die Analyse verwendet wurden MA's, deren Hybridisierung von Prof. Holterhus im Brooks-Labor der Stanford-University in der Zeit von 2001-2002 durchgeführt worden waren. Während einige der GSF-Daten bereits unter einer anderen Fragestellung analysiert und publiziert worden sind (Holterhus et al. 2003), wurden die Experimente mit den LNCaP-Zellen auf den 43K-cDNA-MA's bisher nicht veröffentlicht.

5.3.1 Genomweite Unterschiede zwischen LNCaP- und GSF-Zellen

Bei dieser Analyse wurden insgesamt 12 LNCaP 43K-MA's für die Berechnung von 10 genomweiten LNCaP-Datensets und 12 GSF 43K-MA's für die Berechnung von 7 genomweiten GSF-Datensets verwendet. Durch die Umrechnung wurden in der Gesamtbetrachtung nur MA's verwendet, welche die gleiche Referenz aufwiesen.

Der Vergleich der Expressionsprofile beider Zelltypen bestätigt bereits publizierte Arbeiten in der Aussage, dass sich die zelluläre Antwort der beiden Zelltypen auf Androgene grundlegend unterscheidet (DePrimo et al. 2002; Holterhus et al. 2003; Holterhus et al. 2005 (I); Castoria et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass LNCaP-Zellen eine reproduzierbare und eindeutige zelluläre Antwort auf Androgene aufweisen, wohingegen ausdifferenzierte primäre GSF-Zellen auf die Zugabe von Androgenen im Zellkulturmodell keine eindeutigen Antwortprofile aufweisen. Viele der Androgen-regulierten Gene in LNCaP-Zellen, die durch diese MA-Analysen detektiert wurden, sind in der Literatur in Einzelgen-Untersuchungen bereits entsprechend beschrieben worden. Dies unterstützt somit die Struktur und das Ergebnis der MA-Analyse (PSA (Kallikrein 3 = KLK 3) (Cleutjens et al. 1997; Gau et al. 1997), TPD52 (Tumor Protein D52) (Rubin et al. 2004), HERPUD1 (Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1) (Segawa et al. 2002), ANKH (Ankylosis, progressive homolog) (Dhanasekaran et al. 2005), STK39 (Serine threonine kinase 39 = SPAK) (Qi et al. 2001) oder TMEPAI (Transmembrane, prostate androgen induced RNA) (Xu et al. 2000).

Die umfangreichen zellphysiologischen Aufgaben vieler dieser androgen-regulierten Gene im Prostata-Gewebe (Produktion von Samenflüssigkeit, Proteinfaltung, Transport, Sekretion) wurde von DePrimo beschrieben (DePrimo et al. 2002).

Im Gegensatz zu den LNCaP-Zellen ist die funktionelle Rolle des AR und der androgen-regulierten Gene in den GSF erheblich weniger bekannt. Es gibt Vermutungen, dass der AR in diesen Zellen Bestandteil von Androgen-unabhängigen Signal-Transduktionswegen sein könnte (Castoria et al. 2003).

GSF- und LNCaP-Zellen stellen ein Modell zweier verschiedener humaner Zelltypen dar, die zwar vom Ursprung her beide aus dem genitalen Bereich stammen und den AR exprimieren,

aber dennoch deutlich unterschiedlich auf Androgene reagieren. Aus diesem Grund wurden diese beiden Zelltypen als Grundlage für weitere Fragestellungen zum Mechanismus der Gewebespezifität von Androgenen auf Expressionsebene verwendet.

5.3.2 AR-Coregulator-Profil-Vergleich

Die modulierende Wirkung der AR-spezifischen Coregulatoren auf die AR-Transaktivierung ist in der internationalen Literatur sehr gut dokumentiert. Die Coregulatoren werden in der Zelle zusammen mit dem AR exprimiert, hierzu gehören z.B. NCOA3 (Nuclear receptor coactivator 3) (Tan et al. 2000), Smad3 (SMAD, mothers against DPP homolog 3) (Kang et al. 2002), CCND1 (Cyclin D1) (Petre-Draviam et al. 2005), PIAS1 (Protein inhibitor of activated STAT 1) (Tan et al. 2000) oder TP53 (Tumor Protein 53) (Shenk et al. 2001).

Wie bei vielen anderen Untersuchungen auch, wurden bisher immer nur einzelne Cofaktoren untersucht und in ihrer Funktion aufgeklärt. Ebenso wichtig erscheint eine Betrachtung möglichst vieler Cofaktoren in ihrer Funktion als Gruppe innerhalb des Zellsystems. Es ist davon auszugehen, dass ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Cofaktoren in einem bestimmten Gewebetyp die entsprechende gewebespezifische Reaktion auf Androgengabe hervorruft. Für diese globalere Betrachtung eignen sich insbesondere MA-Analysen.

Die McGill-Datenbank des humanen AR (www2.mcgill.ca/androgenb/) wurde genutzt, um bereits bekannte und beschriebene AR-spezifische Coregulatoren zu finden. Unter Verwendung der in der McGill-Datenbank verwendeten Gen-Abkürzungen wurden die Cofaktoren in der SOURCE-Datenbank (genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/SMD/source/sourceSEARCH) auf weitere Alias-Namen überprüft. Dies war zwingend notwendig, da in der Literatur bis zu 25 verschiedene Namen zu finden sind, die laut SOURCE-Datenbank alle das gleiche Molekül darstellen. So wird NCOA3 (Nuclear Receptor Coactivator 3) auch als ACTR, AIB-1, AIB1, CAGH16, CTG26, NCoA-3, RAC-3, RAC3, SRC-3, SRC3, TNRC14, TNRC16, TRAM-1, TRAM1, p/CIP, pCIP, Amplified in breast cancer-1 protein, amplified in breast cancer 1, CBP-interacting protein, EC 2.3.1.48, Nuclear receptor coactivator 3, Receptor-associated coactivator 3, Steroid receptor coactivator protein 3 oder Thyroid hormone receptor activator molecule 1 bezeichnet. Für einige Coregulatoren musste die in der McGill-Datenbank angegebene jeweilige Primärliteratur, Sekundärliteratur sowie weitere Datenbanken (PubMed, OMIM und SwissProt) genutzt werden, um den beschriebenen Cofaktor einer offiziellen Nomenklatur zuordnen zu können.

Um eine Kompatibilität mit der Stanford Microarray Database (SMD) zu ermöglichen, wurde die ursprüngliche McGill-Nomenklatur der Coregulatoren der SOURCE-Schreibweise angepasst. Durch Eingabe der Gen-Abkürzungen in SOURCE-Nomenklatur in die SMD-

public search (genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/SMD/mad.pl) entstand eine finale IMAGE ID-Liste von Cofaktoren, die auf den verwendeten MA's präsent war.

Der Vergleich der Basis-Transkriptions-Profile von AR-spezifischen Coregulatoren basierte auf kompetitiven Hybridisierungsreaktionen gegen jeweils die gleiche Common Reference RNA. Für diese Analyse wurden 26 43K-MA's verwendet, 4 LNCaP-Arrays, 2 Prostata-Arrays und 20 GSF-Arrays. Es wurden nur Signale verwendet, deren Intensität den Hintergrund um den mindestens 1,5-fachen Faktor im Referenz-Kanal überschritten und welche in mindestens 80% aller Experimente ein auswertbares Signal aufwiesen. Das Clustering erfolgte mit der „centered average linkage“ Funktion. Für die Detektion der signifikanten Unterschiede zwischen GSF- und LNCaP-Zellen wurde die Significance Analysis of Microarrays (SAM) verwendet.

Interessanterweise wiesen zwei Gene (NSD1 (Nuclear receptor binding SET domain protein 1 = ARA267) und SMAD3 (SMAD, mothers against DPP homolog 3)) Diskrepanzen beim Vergleich verschiedener IMAGE-Klone auf. Im Fall von NSD1 basieren die beiden Druckpunkte auf den MA's auf den beiden IMAGE-Klone IMAGE:770266 und IMAGE:771262. Der mehr zum 5'-Ende des NSD1-Gens verlagerte Klon IMAGE:770266 ist nur mit seinem zentralen Teil von circa 300 bp mit der NSD1 mRNA Sequenz kompatibel. Dies lässt vermuten, dass dieser Klon keine der beiden bekannten NSD1-Transkript-Varianten darstellt. Aus diesem Grunde wurde der IMAGE-Klon 770266 von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

SMAD3 beinhaltet an der Position 2564 (bp) eine interne Polyadenylierungsstelle. Dies kann potentiell zu zwei verschiedenen Transkript-Varianten führen. Während IMAGE:323028 das 5'-Ende des Gens darstellt, ist IMAGE:345935 weiter im sog. downstream Bereiches des Gens lokalisiert. Dies könnte die detektierten Unterschiede im Expressionsbild erklären.

Momentan gibt es nur relativ wenig konkret experimentelle Daten zu der Frage, ob komplexe AR-Coregulator-Expressionsmuster gewebespezifisch auftreten (Linja et al. 2004; Nessler-Menardi et al. 2000). Basierend auf den vorliegenden Analysen zu LNCaP- und GSF-Zellen ist jedoch von einem grundlegenden Unterschied in der Regulierung der AR-Coregulator-Transkripte in den beiden Zelltypen auszugehen.

In der vorliegenden Arbeit konnten 48 AR-Coregulator-Transkripte, welche 33 unterschiedliche Gene darstellten, identifiziert werden, deren Expressionslevel sich statistisch signifikant zwischen GSF- und LNCaP-Zellen unterscheidet. Die Expressionsmuster dieser Transkripte waren über alle MA-Experimente hinweg reproduzierbar. Viele IMAGE-Klone, die mit unterschiedlichen Transkriptbereichen das gleiche Gen repräsentieren, clustern nebeneinander oder in sehr nahem Abstand

zueinander. Dies stützt die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Daten. Unter den differentiell transkribierten Genen waren einige Gene der p160 Coaktivator-Gruppe (NCOA2/ TIF2/ GRIP1 und NCOA3/ AIB1/ TRAM1/RAC3/ pCIP/ ACT-R/ SRC3) bei denen bereits gezeigt werden konnte, dass sie in-vitro die AR-Transaktivierung mittels der LXXLL-Motife beeinflussen (Alen et al. 1999). Unterschiede in der Expression dieser Moleküle könnten die zell-spezifische Androgen-Sensitivität in den beiden Zelltypen LNCaP und GSF und die damit verbundene unterschiedliche Reaktion mit erklären.

Interessanterweise sind viele der differentiell exprimierten Coregulatoren Bestandteil im Zellzyklus, wie z.B. CAV1 (Lu et al. 2001), CCND1 (Baldin et al. 1993; Petre et al. 2002), CCNH (Cyclin H) (Fisher und Morgan 1994) oder PCAF (P300/ CBP-associated factor) (Fu et al. 2000). Während diese Unterschiede zum einen generelle Unterschiede in der Zellzyklus-Regulation von LNCaP- und GSF-Zellen darstellen, könnten diese verschiedenen Profile in der Proliferation auch aufgrund der Androgengabe und der damit verbundenen Responsivität der LNCaP-Zellen beeinflusst sein.

Die dargestellten Expressionsdaten deuten daraufhin, dass das zellspezifische Gleichgewicht von AR-Coaktivatoren und Corepressoren einen Einfluss auf die unterschiedliche Expressionsantwort von LNCaP- und GSF-Zellen auf Androgengabe hat. Zudem stellen diese Expressionsdaten eine interessante Quelle für weitere funktionelle Untersuchungen von differentiell exprimierten Coregulatoren unter Berücksichtigung der Androgenwirkung dar. Diese tiefgehenden funktionellen Analysen einzelner Faktoren waren jedoch nicht Ziel dieser Arbeit. Die Auswahl von Einzelfaktoren für Cotransfektionsuntersuchungen wäre zudem arbiträr, da die vorliegenden Daten eher auf die funktionelle Bedeutung eines Gesamtnetzwerkes und nicht von Einzelfaktoren hindeuten.

5.3.3 Einfluß von Kulturbedingungen auf das Expressionsprofil

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass kultivierte Fibroblasten bei dem Wechsel vom exponentiellen proliferierenden Wachstum zur G₀-Phase einen signifikanten Wechsel im Transkriptionsprogramm durchlaufen (Iyer et al. 1999). Da viele der bekannten AR-Coregulatoren Bestandteil des Zellzyklus sind (Lu et al. 2001; Baldin et al. 1993; Petre et al. 2002; Fisher und Morgan 1994; Fu et al. 2000), konnte vermutet werden, dass die Kulturbedingungen der Zellen, die zu Unterschieden im Proliferationsstatus der Zellen führen, zudem sowohl Androgenresponsivität als auch das Expressionsprofil der AR-Coregulatoren beeinflussen könnten.

Während, wie bereits gezeigt, die transkriptionellen Änderungen in GSF-Zellen bei Androgengabe nicht nachweisbar waren, so hatten die Zellkulturbedingungen einen sehr deutlichen Effekt auf das Expressionsprofil der Coregulatoren. Wie erwartet, konnten die deutlichsten Unterschiede zwischen proliferierenden und in G₀-arretierten Zellen festgestellt werden. Das Sub-Cluster, welches am meisten zu der Abtrennung der proliferierenden Fibroblasten von den G₀-Phase-Fibroblasten beiträgt, enthält viele AR-Coregulatoren, die auch als Zellzyklus-Gene bekannt sind. So zeigen in exponentiell wachsenden Zellen CDC37 und CCNH beide ein erheblich höheres Expressionssignal als in G₀-arretierten Zellen.

Des Weiteren trennt das Clustering bei den G₀-arretierten Zellen diejenigen Kulturen, die mit Kohle-gefilterten FCS kultiviert worden sind, von den Kulturen, die mit normalem FCS kultiviert worden sind. Dies lässt vermuten, dass im normalen FCS Steroidhormone und Peptid-Hormone vorhanden sind, die das transkriptionelle Gleichgewicht der AR-Coregulatoren beeinflussen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Expressionsprofil der AR-Coregulatoren in GSF-Zellen nicht konstant ist, sondern durch Änderungen in den Zellkulturbedingungen und bei Änderungen im Proliferationsstatus der Zellen systematisch variiert. Der direkte Zusammenhang zwischen dem zellulären Coregulator-Profil und den Zellkulturbedingungen sowie dem Proliferationsstatus der Zellkultur sollte bei weiteren MA-Studien unbedingt beachtet werden.

Es spricht vieles dafür, dass dieser enge Zusammenhang zwischen Kulturbedingungen und Expressionsprofilen nicht nur auf Coregulatoren beschränkt ist.

5.3.4 Prostata und AR-Coregulatoren

Der Nachweis von Gewebespezifität und Zellzyklus-Variationen im Profil von AR-Coregulatoren in LNCaP- und GSF-Zellen lassen auch in verschiedenen Prostata-Gewebetypen unterschiedliche Coregulator-Profile vermuten. Prostata-Karzinomgewebe entstammt einem Androgen-abhängigen Tumor. Diese Krebsform kann behandelt werden, jedoch können sich die meisten fortgeschrittenen Tumoren auch ohne weitere Hormoneinwirkung weiterentwickeln (Chen et al. 2004). Wechselnde AR-Coregulator-Profile könnten die Aktivität des AR in fortgeschrittenen Prostata-Krebs beeinflussen (Nessler-Menardi et al. 2000). Damit stellen die AR-Coregulatoren ein vielversprechendes therapeutisches Ziel dar (Rahman et al. 2003). Bisherige Untersuchungen von AR-Coregulatoren in Prostata-Karzinomen waren auf einzelne Cofaktoren beschränkt (Nessler-Menardi et al. 2000; Linja et al. 2004).

Daher wurde die vorliegende AR-Coregulator Liste mit einem kürzlich publizierten MA-Daten-Set (Lapointe et al. 2004) von normalem Prostata-Gewebe, verschiedenen karzinogenen Prostata-Geweben und Lymphknotenmetastasen kombiniert. Nach Einsatz entsprechender

Datenfilter wurden 80 AR-Coregulator-Transkripte für eine supervidierte hierarchische Cluster-Analyse verwendet.

Die erste Hauptgruppe im Cluster beinhaltet alle Prostata-Gewebeproben und einige wenige lokalisierte Prostata-Karzinoma-Proben. Die weitaus meisten Karzinoma-Proben bilden eine zweite Hauptgruppe, die sich erneut in zwei Untergruppen aufteilt: zum einen die Lymphknotenmetastasen und einige wenige Primärtumor-Proben, zum anderen eine reine Primärtumor-Gruppe.

Diese Auftrennung von normalem Prostata-Gewebe und carcinogenem Gewebe und die relative Abgrenzung der Lymphknotenmetastasen erfolgt in der Cluster-Analyse nur aufgrund der Expressionsprofile der AR-Coregulatoren. Dies lässt vermuten, dass die Umwandlung von normalem Prostatagewebe zu karzinogenem Prostata-Gewebe und Lymphknotenmetastasen von deutlichen Änderungen in der Expression der AR-spezifischen Coregulatoren begleitet wird. Dies könnte zudem auch die Responsivität des jeweiligen Gewebes auf Androgene beeinflussen. Auch in Krebszellen ist die ursprüngliche Lokalisation codiert.

Die unerwartete Zuordnung einiger Proben in bestimmte Subcluster („falsche Hauptgruppe“) könnte durch unterschiedliche Zelldifferenzierung bzw. einen unterschiedlichen Malignitätsgrad verursacht sein. Da die histologischen Diagnosen nicht vorliegen, ist eine histologische Subtypisierung nicht möglich.

AR-pathway-bezogene Analysen können den biologischen Verlauf in der Zelle in Hinblick auf den Krankheitsfortschritt nur unkomplett abbilden. Wahrscheinlich ist nur eine Unterauswahl der für die Analyse eingesetzten AR-Coregulatoren mit dem Krankheitsfortschritt signifikant assoziiert. Diese Analysen wären nur unter Berücksichtigung der exakten klinischen Verlaufsdaten möglich, so dass sie hier nicht erfolgt sind.

5.3.5 AR-Coregulatoren in verschiedenen Gewebeproben

Der AR wird in vielen verschiedenen humanen Geweben exprimiert (Kimura et al. 1993; Ruizeveld de Winter 1991; Takeda et al. 1990). Hierbei sind die Leukozyten, speziell das Lymphatische System (Benten et al. 2002; Sader et al. 2005; Olsen et al. 2001) und das Gehirn (Beyenburg et al. 2000) hervorzuheben. Die funktionelle Rolle des AR in diesen Geweben ist sehr spezifisch: sexuelle Differenzierung und Entwicklung der Fertilität aufgrund der AR-Expression im genitalen Gewebe, geschlechtsspezifische Modulation der Immunantwort aufgrund des AR in lymphatischen Zellen (Nitsch et al. 2004), geschlechtsspezifische Gehirnentwicklung aufgrund von AR in bestimmten Teilen des Gehirns (Sato et al. 2004).

Für eine Überprüfung, ob bei den unterschiedlichen Geweben neben dem AR auch die bereits im Zellkultur-Modell als modulierend nachgewiesenen AR-Coregulatoren eine Rolle spielen, wurde ein kürzlich publizierter Daten-Set von 115 MA's, welcher 35 verschiedene humane Gewebelokalisationen beinhaltet (Shyamasundar et al. 2005), als Datenbasis eingesetzt. Dieser Daten-Set ist über die SMD-Website (genome-www5.stanford.edu) öffentlich zugänglich. Die in-silico Re-Analyse zeigt ein klares gewebespezifisches Muster der AR-Coregulatoren. Dies lässt eine Abhängigkeit von der Gewebespezifität des AR vermuten. Die zusätzliche Beobachtung, dass funktionell und ontogenetisch verwandte Gewebe ein ähnliches AR-Coregulator-Muster aufweisen, stützt diese These. Die gewebespezifische Expression in humanen Geweben stützt zudem die Beobachtung bei den LNCaP- und GSF-Zellen, dass diese deutlichen Unterschiede in der Regulierung der AR-Coregulatoren nicht nur auf Zellkultur-Systeme beschränkt sind, sondern auch in Geweben in-vivo auftreten.

5.3.6. Validierung von AR-Coregulator Expressionsprofilen mittels Real-Time-PCR

Von den Genen, die im Vergleich zwischen LNCaP- und GSF-Zellen signifikante Unterschiede in ihrem Expressionsprofil aufwiesen, wurden CAV1, FHL2, NCOA2 und FKBP4 für eine Validierung mittels semi-quantitativer RT-PCR ausgewählt. Material aus fünf Zell-Linien (2x LNCaP, GSF 40, GSF 52, GSF 58 und GSF 59) ergab sechs unabhängige, neue RNA-Proben.

Die Quantifizierung der vier ausgewählten Transkripte mittels Real-Time-PCR bestätigte deutlich die Ergebnisse aus den MA-Analysen. Sehr auffällig war die extreme Herunterregulation von CAV-1 und FHL2 in den beiden unabhängigen LNCaP-Zell-Linien. Dies passt mit dem Muster in der Cluster-Analyse überein.

Das Transkript von CAV1 konnte in acht RT-PCR Experimenten, basierend auf LNCaP-Material, nicht detektiert werden. Daher konnte bei diesem Gen keine „fold difference“ zwischen LNCaP- und GSF-Zellen gebildet werden. In GSF-Zellen konnte die Expression von CAV1 nachgewiesen werden. Das FHL2-Transkript in den vier verschiedenen GSF-Kulturen wies eine relative Heraufregulation von ca. 200-fach bis zu 2000-fach im Vergleich zu den LNCaP-Zellen auf.

Zusammenfassend lässt sich für das Coregulator-Projekt sagen, dass die genomweite Analyse der AR-Coregulatoren mittels cDNA-MA's durch Verknüpfung mit bereits bestehenden AR-Datenbanken ein vielversprechendes Werkzeug darstellt.

Es ist realistisch, dass die zelltyp-spezifischen Muster der AR-Coregulatoren in einem engen Kontext zu den Unterschieden bei LNCaP- und GSF-Zellen in der Antwort auf Androgengabe

stehen. Die globale Analyse von AR-Coregulator Expressionsprofilen ist eine neue Methode, um die Spezifität und Diversität von AR-vermittelten biologischen Funktionen in humanen Gewebe besser zu verstehen.

5.4 Geschlechtsspezifische Genexpression in PBMC

Da für eine ausführliche Beschreibung von Intersex-Formen auch funktionelle Untersuchungen mit Hormonen stattfinden sollten, erfolgte der Systemwechsel von GSF-Zellen auf PBMCs. GSF-Zellen sind aufgrund der schwierigen Entnahme am Patienten (operativ) für größere Studien sowie aufgrund mangelnder Androgenresponsivität für funktionelle Experimente mit Androgengabe nicht geeignet. Dies hat nicht zuletzt auch ethische Implikationen.

Ein erheblicher weiterer Nachteil von Zellkultur-Modellen ist das Auftreten von Mycoplasmen in den Zellen bzw. eine hochgradige Durchseuchung der meisten Stickstoff-Zellkultur-Lagertanks in Forschungsinstituten mit Mycoplasmen. Diese beeinflussen das Expressionsprofil der betroffenen Zellen zum Teil erheblich, vor allem in den Bereichen Cytokine, Stress-response-Proteine, Transporter-Proteine, Rezeptoren, Ionen-Kanäle, Wachstumsfaktoren, Oxidasen, Tumor-Suppressor-Proteine und Oncogene (Miller et al. 2003).

Der Wechsel in der Lokalisation der Proben von Gewebe aus den Geschlechtsorganen (GSF) zu Blutzellen brachte zudem die Frage auf, inwieweit in diesen Zellen eine geschlechtsspezifische Expression bestimmter Gene nachgewiesen werden kann. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass PBMCs eine signifikante Androgen-Bindung aufweisen (Kuhnle et al. 1994).

Die Nutzung von Vollblut ist schwierig, da ein erheblicher Anteil der daraus isolierten RNA das Globin der Erythrozyten codiert. Der Anteil der übrigen mRNA an der Gesamt-RNA würde erheblich unter den üblichen 5-10% liegen. Daraus resultierend würde weniger Probenmaterial auf dem Array hybridisieren können. Für die Nutzung einer bestimmten Zellfraktion, den peripheren mononucleären Blutzellen (PBMC), mussten im Labor zunächst entsprechende Isolierungsmethoden für die PBMCs aus Vollblutproben sowie Methoden für RNA-Isolierung und lineare RNA-Amplifikation etabliert werden.

5.4.1 Probenmaterial

In dem zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob sich geschlechtsspezifische Genexpression in PBMCs nachweisen lässt. Des Weiteren wurde untersucht, ob Variationen in der Geschlechtsentwicklung, die in der medizinischen Diagnose festgestellt wurden, durch das Expressionsprofil reflektiert werden können.

Hierzu wurden zunächst Monozyten bzw. die daraus differenzierenden Makrophagen als Zielzellen anvisiert, um eine möglichst homogene Zellgruppe zu verwenden. Für die Aufreinigung der Monozyten aus EDTA-Vollblutproben wurden verschiedene Protokolle durchgeführt und teilweise miteinander kombiniert (Pertoft et al. 1980; Morrey et al. 1994; Tarsi-Tsuk und Levy 1990). Die laut Literatur erreichbaren Reinheiten von bis zu 90% konnten unter den gegebenen Laborbedingungen nicht erreicht werden. Die bei einer Kombination aus Ficoll-Gradient und mehreren spezifischen Waschschritten isolierten Monozyten/ Makrophagen wurden extern mit CD-14-PE gekoppelten Antikörpern in einem FACC (Fluorescence activated cell counter) untersucht. Die hierbei erreichte maximale Ausbeute betrug jedoch nur 13% CD-14-positive Zellen. Zudem war die in Kultur erreichte Zellausbeute unzureichend.

Ein ausreichender Zellertrag kann mit speziellen Gegenstromzentrifugen (Elutriationszentrifugation) erreicht werden. Hierbei wird mit einer Pumpe ein bestimmter Puffer mit spezifischem Druck entgegen der Zentrifugalkraft durch einen speziellen Rotorblock gepresst. Aufgrund von Dichte und Volumen sammeln sich die Monozyten an einer bestimmten Stelle im Rotorblock. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit im Forschungszentrum Borstel und am Institut für Biochemie des UKE in Hamburg getestet. Da diese Isolierungsmethode mit einem sehr großen zeitlichen und materiellen Aufwand verbunden ist und die Mindesteinsatzmenge ca. 0,5 l Blut beträgt, war das System weder für eine größere Probenzahl noch für pädiatrische Blutproben mit maximal 8 ml Blut geeignet.

Aufgrund dieser Problematik wurde die Zielsetzung des Projektes leicht abgewandelt und die PBMCs als nächsthöhere Gruppe von Blutzellen als Modellsystem ausgewählt. In den letzten beiden Jahren wurden einige Arbeiten publiziert, die auf PBMCs als Probenmaterial für Expressionsanalysen basieren (u.a. Whitney et al. 2003; Bomprezzi et al. 2003; Stürzebecher et al. 2003; Burczynski et al. 2005).

Die Blutentnahme wurde möglichst standardisiert um 13:00 durchgeführt, um circadiane Schwankungen im Expressionsprofil möglichst gering zu halten. Diese Schwankungen konnten von Ueda und Mitarbeitern bei *Drosophila* bei 5,3% aller Gene (712 Gene) nachgewiesen werden (Ueda et al. 2002). Es ist davon auszugehen, dass auch in humanen Geweben viele Gene einer circadianen Regulierung der Expression unterliegen (Ueda et al. 2004; Yamazaki et al. 2002; Nonaka et al. 2001; Bjarnason et al. 2001). Dies trifft insbesondere für die Hormonkonzentration im Körper zu (Czeisler und Klerman 1999), wie z.B. das Cortisol, welches einen hohen Peak am Morgen aufweist (mündliche Information Dr. Sven Pischke, Universitätsklinikum Hannover). Plasma-Cortisol zeigt einen ultradianen Rhythmus von 8 h (Rivest et al. 1989). Diese Schwankungen, die z.T. erheblichen Einfluss auf die Expression bestimmter Gene haben, konnten aufgrund der breiten Verteilung der

Gesamtheit der Hormon-Peaks in der Probennahme nur durch den fixierten Blutentnahmezeitpunkt berücksichtigt werden.

Für die PBMC-Isolierung und Aufreinigung wurden verschiedene Protokolle zu einem den Gegebenheiten im Labor angepassten Protokoll zusammengefasst. Bei der Aufreinigung der PBMCs mittels Ficoll entsteht eine Zell-Mischpopulation. Neutrophile und Thrombozyten sind aufgrund von Dichte und Form von den PBMCs nur mit einem aufwendigen Prozess im Cell-Sorter zu trennen. Die späteren Auswirkungen sind jedoch zu vernachlässigen, da diese Mischpopulation bei jeder Probe auftritt und somit einen systematischen Fehler darstellt. Zudem enthalten Thrombozyten nur sehr wenig RNA.

Eine alternative Technik zur Aufreinigung der PBMC ist die Verwendung von Erythrozyten-Lysis-Puffer, was jedoch auch bei den PBMC Stressreaktionen und somit ein geändertes Expressionsprofil hervorruft.

5.4.2 RNA-Proben

Nach einer zügigen und gekühlten Isolation der PBMCs erfolgte anschließend die RNA-Präparation. Spruessel konnte zeigen, dass bei Untersuchung der Zeitlinie nach erfolgter Probennahme aus Tumor-Gewebe bereits nach 30 min ca. 20% der Gene im Vergleich zu T₀ ein signifikant unterschiedliches Expressionsprofil auf Affymetrix-18K-GeneChips aufwiesen (Spruessel et al. 2004). Ein standardisiertes Protokoll ist somit notwendig, um diese externen Einflüsse auf die Expression zumindest konstant zu halten.

Die Isolierung der PBMCs wurde mit Trizol und anschließender RNeasy-Mini-Aufreinigung durchgeführt. Die Aufreinigung war zwingend notwendig, da sich phenolische Substanzen in der wässrigen Phase sowohl bei Verwendung von Trizol als auch bei Phenol-Chloroform feststellen ließen. Dieser Verschleppungseffekt könnte durch Reste des Ficolls (Polysaccharide) verursacht sein. Diese phenolischen Reste konnten durch Chloroform-Ausschüttung lediglich reduziert werden. Der Effekt trat sowohl bei Verwendung von Festwinkel- als auch von Ausschwing-Rotoren auf.

Ohne Aufreinigung wies die RNA bei der photometrischen Messung einen niedrigen 260/280-Quotienten und einen hohen E230-Wert auf, was auf eine Verunreinigung mit Phenolen bzw. aromatischen Bestandteilen hindeutet (Eppendorf Product Guide Biophotometer). In einem denaturierenden Agarose-Gel wiesen die entsprechenden RNA-Proben ein anderes Laufverhalten auf. Beide Banden waren leicht verschwommen und etwas weiter im Gel gelaufen als eine entsprechende Kontroll-RNA. Eine Aufreinigung eliminierte diese Effekte.

Für Expressionsanalysen (MA und Real-Time-PCR) sollte zudem immer eine Zwei-Stufen-Isolierung der RNA erfolgen (mündliche Information Dr. Kerstin Vieluff, Applikation RNA-Aufreinigung, Fa. Eppendorf).

5.4.3 RNA-Amplifikation

Wie bei Biopsie-Material steht auch bei pädiatrischen Blutproben (2-8 ml Vollblut) für die Nutzung von Gesamt-RNA oder mRNA nicht genügend Ausgangsmaterial für MA-Experimente zur Verfügung. Aufbauend auf dem von der Gruppe um Eberwine entwickelten Prinzip (van Gelder et al. 1989; Eberwine et al. 1992) wurde eine Methode etabliert, RNA linear zu amplifizieren (aRNA). Bei einer normalen exponentiellen Amplifikation mittels klassischer PCR werden überproportional viel kurze RNA-Fragmente amplifiziert. Die längeren RNA-Moleküle werden jedoch unterproportional angereichert. Bei dem Protokoll gemäß dem Eberwine-Prinzip erfolgte zunächst eine reverse Transkription mit Poly-T-Primern, dann eine cDNA-Zweitstrangsynthese und abschließend eine fünfstündige in-vitro-Transkription (IVT) mit T7-RNA-Polymerase. Diese lange IVT hat sich in der Jeffrey-Gruppe (Zhao et al. 2002) als optimal in Ausbeute und Korrelationskoeffizient herausgestellt. Die Zugabe von DNA-Ligase in der Zweitstrang-Synthese ist laut Zhao (Zhao et al. 2002) nicht nötig, jedoch ergibt sich bei Zugabe eine etwas bessere Ausbeute.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Startmenge von 3 µg Gesamt-RNA enthält im Schnitt ca. 5-10% mRNA, dies entspricht ca. 0,15-0,3 µg. Die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit der Amplifikation verändert sich bei variabler Startmenge an Gesamt-RNA (0,3-3,0 µg) nicht (Zhao et al. 2002).

Die lineare Amplifikation führte zu einer erzielten aRNA-Menge von 3–8 µg, dies entspricht einer Amplifikationsrate von Faktor 20 bis 40. Die in der Literatur angegebenen Amplifikationsraten von 100 oder 1000 sind mit weiteren Schleifen in diesem System zu erzielen. Dabei erhöht sich jedoch der Anteil der unspezifischen Produkte. Zudem nimmt die aRNA-Länge ab der zweiten Amplifikationsrunde ab (Scherer et al. 2003).

Ausführliche Vergleiche von aRNA und RNA beweisen die Validität dieser T7-basierten RNA-Amplifikation (Baugh et al. 2001). Korrelationskoeffizienten von aRNA zu aRNA betragen 0,997 (Scherer et al. 2003), 0,9-0,97 (Zhao et al. 2002) bzw. 0,93-0,95 (Feldman et al. 2002).

Richter und Mitarbeiter konnten in einem Vergleich der verschiedenen Markierungsmethoden (direkt, indirekt über Aminoallyl, mittels Hapten, über T7-RNA-Amplifikation bzw. mit 3-D-multi-markierter Struktur) nachweisen, dass die T7-RNA-Amplifikation am sensitivsten und zuverlässigsten ist (Richter et al. 2002). Dies wurde ebenfalls von Puskas gezeigt (Puskas et al. 2002).

Bei der Validierung der MA-Expressionsdaten mittels Real-Time-PCR fällt der Vergleich zwischen Gesamt-RNA und aRNA in der Literatur nicht ganz einheitlich aus. Puskas spricht von geringfügig höherer Diskrepanz der aRNA im Vergleich zur Gesamt-RNA (Puskas et al. 2002). Feldmann stellt den eindeutigen Vorteil der aRNA heraus (Feldman et al. 2002).

Die Korrelation von Gesamt-RNA zu aRNA beträgt 0,82 (Zhao et al. 2002) bzw. 0,75-0,82 (Feldman et al. 2002). Aufgrund dieser Unterschiede sollten möglichst keine MA's mit verschiedenen Labeling-Methoden bzw. aRNA/ Gesamt-RNA als Probenmaterial in einer Studie verwendet werden (Puskas et al. 2002).

Von dem klassischen T7-Eberwine-System sind verschiedene Modifikationen und Abwandlungen publiziert worden (Al-Mulla et al. 2004; Baugh et al. 2001; Dunmire et al. 2002; Hu et al. 2002; Pabon et al. 2001; Petalidis et al. 2003; Scherer et al. 2003; Sotiriou et al. 2002; Wang et al. 2000; Wang et al. 2003; Xiang et al. 2003 (I); Xiang et al. 2003 (II)).

Da aufgrund der abschließenden reversen Transkription zur Herstellung der markierten cDNA-Sonden ein sense-Strang entsteht, ist diese Art der RNA-Amplifikation nur für cDNA-MA's geeignet. Diese beinhalten in ihren Druckpunkten beide Stränge der cDNA. Oligonukleotid-MA's weisen hingegen lediglich sense-Stränge auf (Kaposi-Novak et al. 2004; Marko et al. 2005).

Um aRNA auch für Oligonukleotid-MA's nutzen zu können, wäre eine Fluoreszenz-Markierung der aRNA schon bei der IVT nötig. Die Verwendung von Aminoallyl-UTP würde hierbei eine zwei- bis dreifache Steigerung der Markierungseffizienz im Vergleich zu direkter Markierung bewirken (t'Hoen et al. 2003). Eine weitere Methode wurde von der Gruppe um Schlingemann entwickelt. Mittels Klenow-Fragment entsteht (über die antisense-aRNA) aus sense-cDNA markierte antisense-cDNA (Schlingemann et al. 2005). Desweiteren gibt es den senseAmp-Kit von Genesphere (Hatfield, PA, USA) zur Herstellung von sense-aRNA (Goff et al. 2004) sowie eine Methode von Marko (Marko et al. 2005).

Insgesamt betrachtet ist die Amplifikation der RNA die Methode der Wahl, um mit geringen und geringsten Probenmaterial MA-Experimente durchführen zu können. Bei den weitaus meisten MA-Publikationen wird dieses Verfahren standardmäßig angewendet.

5.4.4 Systemtest Referenz-RNA und Amplifikation (Vergleich Mann-Frau)

Das in diesem Projekt verwendete zwei-Farb-Markierungssystem basiert auf einer kompetitiven Hybridisierung zweier unterschiedlich markierter cDNA-Proben (nach reverser Transkription), also der Einsatz einer Probanden-RNA gegen eine Vergleichs-RNA. Dieser Test z.B. einer weiblichen Probe gegen eine männliche Probe ermöglicht ein differentielles Screening (Typ-I-Experiment) innerhalb eines Versuches.

Bei der reversen Transkription wird in bestimmten Transkripten einer der beiden Farbstoffe tendenziell besser gebunden bzw. eingebaut. Um den Einfluss des ungleichen Farbstoffeinbaus zu beurteilen, müsste jedes Experiment revers wiederholt werden (dye-swap). Dies bedeutet, die Farbstoffmarkierung Cy5-Probe bzw. Cy3-Referenz müsste jeweils getauscht werden. Die kompetitive Hybridisierung mit dem Referenz-RNA-Design relativiert

das Problem der Bevorzugung eines Farbstoffes, indem alle experimentellen Proben grundsätzlich mit dem gleichen Farbstoff markiert werden (Dobbin et al. 2003). Dies wird als Typ-II-Experiment bezeichnet (z.B. weibliche Probe gegen Referenz; männliche Probe gegen Referenz). Es ermöglicht zudem ein reales Expression-Profiling, da alle Experimente einer Versuchsreihe in beliebiger Kombination miteinander verglichen werden können.

Im Idealfall sollte die Referenz-RNA möglichst viele Druckpunkte abdecken, d.h. ein Grundsignal bei möglichst vielen Druckpunkten ergeben (Novoradovskaya et al. 2004). Die Referenz-RNA kann aus Zellkultur-Linien oder Blut selbst hergestellt werden. Jedoch muss vor dem Projektstart die Zahl der MA-Experimente und somit die Menge der Referenz-RNA festgelegt werden.

In einem Vorexperiment wurde Proben-aRNA von zwei männlichen und drei weiblichen Probanden (jeweils gegen die aRNA einer weiblichen Referenz-Person) miteinander verglichen. Supervidierte Clusteranalysen mit Beschränkung der Daten auf die von Whitney et al. (2003) als geschlechtsspezifisch publizierten Gene führte zu einer eindeutigen Separation der zwei männlichen Proben von den drei weiblichen Proben. Diese erste Analyse mit lediglich fünf Proben deutete bereits auf die Existenz einer geschlechtsspezifischen Genexpression in PBMCs hin. Trotz der geringen Probenzahl und den damit verbundenen Unsicherheiten bestätigte dies die Ergebnisse von Whitney et al. (2003). Dieses Vorexperiment zeigte auch, dass die Art und Herkunft der Referenz-RNA nicht relevant ist. Lediglich eine möglichst gleichmäßige, kompetitive Abdeckung der Druckpunkte ist für die spätere Berechnung der Messwerte wichtig.

Für die Vergleichbarkeit von Expressionsanalysen mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen ist die Nutzung der gleichen Referenz-RNA essentiell. Dies ist nur mit einer kommerziell erwerblichen Common-Reference-RNA (CR-RNA) möglich, welche leicht und lange in der gleichen Lot-Nummer verfügbar ist.

Nach den Vorexperimenten wurde in diesem Projekt CR-RNA verwendet. Zunächst wurde die CR-RNA der Firma BD Biosciences (San Jose, Ca, USA) getestet. Die Abdeckung der Druckpunkte war jedoch nicht zufriedenstellend. Dieses Problem wurde von Frau Dr. Francoise de Longueville (Universität Namur bzw. Eppendorf Array Technology/ Belgien, mündliche Information) in unabhängigen MA-Experimenten mit anderen MAs ebenfalls festgestellt.

Eine weit verbreitete Referenz-RNA ist die CR-RNA von Stratagene. Dieses RNA-Gemisch basiert auf 10 verschiedenen, jedoch genau definierten Krebs-Zellkulturlinien (Gehirn, Brust, Haut, Hoden, Cervix, Leber, Lipocyten, Makrophagen, Lymphoblastom-leukemie, Plasmacytoma Zell-Linie). Der Korrelationskoeffizient zwischen zwei Lots beträgt laut Stratagene 0,9736 (Novoradovskaya et al. 2004).

Bei einem Vergleich von RNA aus Lymphgewebe gegen Common-Reference-RNA der Firma Stratagene konnte die Gruppe um Dybkaer zeigen, dass reine Lymph-RNA (aus Thymus, sek. Lymphknotengewebe und lymphoider Zell-Linie) das Spektrum der immunspezifischen Gene nur geringfügig besser als die CR-RNA abdeckt (Dybkaer et al. 2004).

Eine PCR-basierte Amplifikation aller auf dem Array vorkommenden Sequenzen mit anschließenden Pooling und Aliquotierung der gemischten Produkte ergibt eine optimale Abdeckung (Sterrenburg et al. 2002; Gorreta et al. 2004), die umfassender als mit einer CR-RNA ist. Jedoch ist diese Methode sehr aufwendig und die Reproduzierbarkeit aufgrund des Poolings u.U. beeinträchtigt.

5.4.5 Vergleich Mann-Frau mit Whitney-Genliste

Die von Whitney und Mitarbeitern (2003) publizierte Liste der Gene, deren Expression sich signifikant zwischen gesunden weiblichen und männlichen Individuen unterschied, wurde als erste Validierungsmöglichkeit der MA-Experimente der Normalkontrollen verwendet. Das Resultat von Whitney et al., eine eindeutige Auftrennung zwischen männlichen und weiblichen Normalkontrollen, wurde bestätigt. Dieses Ergebnis stützt zudem die Qualität der eigenen Experimente.

Erwartungsgemäß waren die Gene, deren Expressionsprofil am deutlichsten eine Geschlechtsspezifität aufwies, auf den Geschlechtschromosomen X bzw. Y lokalisiert.

Jedoch scheint die Gruppe der geschlechtsspezifischen Gene von Whitney et al. nicht repräsentativ zu sein. Nur bei sehr wenigen Genen ist eine deutliche Abgrenzung zwischen den Geschlechtern zu erkennen (RPS4X, TM2B, SEPT6). Die starke Expression von SEPT6 (Septin 6) bei den weiblichen Personen ist hier hervorzuheben, da dieses Gen später auch bei der Erstellung der eigenen geschlechtsspezifischen Genliste als signifikant reguliert aufgeführt wird.

Insgesamt zeigt das Bild 4.2.2 mit dem auf der Whitney-Liste basierenden Cluster, wie wichtig die Trainingsgruppe für die Berechnung der Genliste ist. Die Auswahl signifikanter Gene korreliert eng mit der Gruppe der Probanden. Dies hat in der Vergangenheit wiederholt zu Kritik an der MA-Technologie insgesamt und an bestimmten publizierten Genlisten geführt. So wurde z.B. die Liste von etwa 70 relevanten Brustkrebs-Marker-Genen in der Publikation von van t'Veer (van t'Veer et al. 2002) heftig angegriffen und angezweifelt (Eindor et al. 2005; Michiels et al. 2005).

Letztendlich bedeutet dies, dass andere Microarrays durchaus für eigene Analysen genutzt werden können, auf Arrays basierende publizierte Genlisten basieren jedoch auf ganz spezifischen Filtereinstellungen und Algorithmen zur Bestimmung der Signifikanz. Bei Einhaltung des MIAME-Standards und der damit verbundenen Pflicht, diese essentiellen

Analyseeinstellungen zusammen mit der Genliste zu publizieren, erhöht sich jedoch die Wahrscheinlichkeit, auch signifikante Genlisten fremder Publikationen mit eigenen Arrays reproduzieren zu können.

5.4.6 Signifikanz-Analyse geschlechtsspezifischer Gene

Die MA-Analysen von Whitney et al. betrachten die verschiedenen individuellen Aspekte. Die Geschlechtsüberprüfung und Zuordnung der dort verwendeten Proben nach männlichen bzw. weiblichen Geschlecht diente lediglich als System-Kontrolle. Der Schwerpunkt der Arbeit lag nicht auf der Geschlechtsspezifität, intersexuelle Aspekte wurde überhaupt nicht betrachtet. Die Genliste war für die in dieser Arbeit verwendeten Normalkontrollen nur bedingt repräsentativ. Zudem erfolgten die Analysen auf 18K-MA's. In der hier vorliegenden Arbeit standen 43K-MA's zur Verfügung. Somit war die Erstellung einer eigenen geschlechtsspezifischen Genliste essentiell. Hierzu wurde zunächst im Set der vorhandenen MA-Experimente eine genomweite Genabfrage durchgeführt und alle Gene zentriert.

Fehlende Messparameter wurden von der Software interpoliert.

Bei einer Analyse des gesamten Gendatensatzes auf den MA's ist der Einfluss der individuellen Unterschiede im Expressionsprofil zu groß. Eine Eingrenzung der relevanten Daten ist somit essentiell. Die entscheidenden Gene, auf denen die zu untersuchenden Unterschiede zwischen zwei Gruppen basieren, müssen durch entsprechende Filter markiert und selektiert werden. Die aus der genomweiten Analyse resultierende Genliste wurde einem SAM-Test unterzogen, um diejenigen Gene zu detektieren, die sich zwischen männlichen und weiblichen Individuen signifikant unterscheiden.

Der Vergleich zwischen den 46,XY und 46,XX Normalkontrollen ergab eine Liste mit 97 signifikant regulierten Transkripten (Bild 4.2.3). Diese Transkripte sind geschlechtsspezifisch exprimiert, d.h. ihr Expressions-Level ist nicht individuell-, sondern geschlechtsspezifisch reguliert. Durch den Signifikanz-Test der beiden Gruppen und nicht der Individuen können diese Unterschiede zwischen den Individuen minimiert werden.

Sehr deutlich sichtbar ist dieser Effekt bei dem abgegrenzten Block der Y-chromosomalen Gene wie RPS4Y1, USP9Y, CYorf15B, CYorf157 und DDX3Y. Diese Gene sind in allen männlichen Probanden deutlich heraufreguliert und entsprechend bei den weiblichen Probanden herunterreguliert bzw. im Vergleich dazu nicht vorhanden. Die Expression liegt bei allen Personen einer Gruppe auf ungefähr dem gleichen Niveau.

DDX3Y (DEAD Asp-Glu-Ala-Asp box polypeptide 3, Y-linked) ist eine RNA-Helicase, die laut Abdelhaleem (Abdelhaleem 2005) primär in Keimzellen exprimiert wird und dort zusammen mit USP9Y (Ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked facets-like, Drosophila) als Teil des

AZFa-Komplexes eine sehr wichtige Rolle in der Spermatogenese spielt (Foresta et al. 2000). Ein herunterreguliertes USP9Y kann männliche Infertilität anzeigen (Lee et al. 2003). In diesem Zusammenhang ist die Analyse von Vawter et al. interessant. Dort konnte in verschiedenen Cortex-Proben von Männern und Frauen eine geschlechtsspezifische Expression von Genen wie DDX3Y, RPS4Y, USP9Y und XIST auf Affymetrix-GeneChips nachgewiesen und dies auch mittels Real-Time-PCR validiert werden (Vawter et al. 2004). Vawter bringt dies in Verbindung mit der Geschlechtsprävalenz einiger neuropsychiatrischer Erkrankungen.

XIST (X(inactive) specific transcript) inaktiviert bei Frauen eines der beiden X-Chromosomen (transcriptionally silenced) (Avner und Heard 2001; Penny et al. 1996). Dieses Gen ist in der Clusteranalyse von Bild 4.2.3 im weiblichen Block deutlich heraufreguliert. Die grüne Färbung im männlichen Block stellt somit ein Artefakt des Algorithmus aufgrund der gewählten Filtereinstellung dar. In diesem Fall ist herabreguliert mit nicht oder kaum exprimiert gleichzusetzen. Das silencing des X-Chromosoms ist bei Männern unter normalen Umständen nicht möglich.

Trotz des silencing des einen X-Chromosoms ist das X-chromosomal codierte SEPT6 (Septin 6), das zu der Familie der GTPasen gehört, bei den weiblichen Personen deutlich stärker exprimiert als bei den männlichen Personen. Hierfür gibt es zwei Erklärungsmodelle. Zum einen könnte dies ein nicht vollständiges silencing des Chromosoms darstellen, da ca. 15% der X-chromosomalen Gene bei Frauen nicht der Inaktivierung unterliegen (Carrel und Willard 2005). Zum anderen könnte die SEPT6-Expression bei vollständigem silencing des einen X-Chromosoms von dem anderen Allel geschlechtsspezifisch reguliert sein.

Diese beiden möglichen Erklärungen gelten auch für die Heraufregulation von EIF1AP1 (Eukaryotic translation initiation factor 1A pseudogene 1) in den weiblichen Proben. EIF1AP1 ist laut der Swiss-Prot-Eintragung gleichartig zu EIF-1AX, welches X-chromosomal codiert ist.

Im Gegensatz zu der supervidierten Cluster-Analyse mit der Whitney-Genliste (Bild 4.2.2) zeigen die aufgeführten autosomalen Transkripte in Bild 4.2.3 eine deutliche Differenzierung zwischen phänotypisch weiblichen und männlichen Proben. Jedoch sind hier die Expressionslevel individuell beeinflusst, d.h. die entsprechenden Gene sind nicht bei allen Individuen einer Subgruppe gleich stark exprimiert. Bei der Überprüfung der in der Signifikanz-Analyse aufgeführten Gene in PubMed auf Übereinstimmung mit Literaturdaten zeigte sich bei vielen Genen, dass bisher noch keinerlei Analysen über die Sequenzbestimmung hinaus bzw. Funktionstests erfolgt sind. Dementsprechend schwierig ist die Einordnung der jeweiligen Array-Daten.

Bei den weiblichen Personen sind verschiedene Gene deutlich heraufreguliert exprimiert: IGF1R (Insulin-like growth factor 1 receptor) ist eine multifunktionelle transmembrane Tyrosin Kinase, die in einem engen Zusammenspiel mit dem Estrogen-Rezeptor alpha bei hormon-abhängigen Brustkrebs-Zellen wirkt (Surmacz und Bartucci 2004). Laut Esberg et al. ist IGF1R in ventriculären Myozyten von männlichen Ratten heraufreguliert. Dies könne ein Baustein im geschlechtsspezifischen Unterschied bei der Herzfunktion sein (Esberg et al. 2004). Zudem wird IGF1R als Verstärker der Androgenwirkung auf die Beta-Glucuronidase angesehen (Niermann und Watson 1999). Auch wenn sich somit die Expressionsstärke von IGF1R in männlichen Probanden in unterschiedlichen Zellmaterial (unter Nichtbeachtung des Unterschieds Mensch/ Maus/ Ratte) unterscheidet, so deuten diese unabhängig voneinander gezeigten Phänomene auf eine geschlechtsspezifische Rolle des IGF1R hin. Bei einem triple-knockout vom INSR (Insulin receptor), IGF1R und INIRR (Insulin receptor related receptor) in Mäusen führt dies zu einem kompletten male-to-female-sex-reversal. Das Insulin-Signalling in der frühen Phase der Gonadogenese scheint essentiell für die männliche Entwicklung zu sein (Brennan und Capel 2004).

AQP9 (Aquaporin 9) codiert einen Wasserkanal in der Zelle. Die Expression von AQP9 in oviductalen Epithelzellen wird durch Steroidhormone reguliert (Branes et al. 2005), was auf eine geschlechtsspezifische Regulation deutet.

Bei dem deutlich geschlechtsspezifisch regulierten RASGRP1 (RAS guanyl releasing protein 1) waren keinerlei ergänzende Daten zu finden. Laut der SOURCE-Datenbank spielt das Protein eine Rolle bei der Signalkaskade des T-Zell-Rezeptors. Weder dies noch Hinweise auf eine geschlechtsspezifische Rolle konnten in der Literatur gefunden werden.

Das MSCP (Solute carrier family 25, member 37) wird gemäß der SOURCE-Datenbank primär in Blut exprimiert. Weitere Angaben zu dem Gen oder dem entsprechenden Protein fehlen. Dies gilt ebenfalls für das HA-1 (Minor histocompatibility antigen HA-1).

Die Zahl der Gene, die in dieser Analyse bei den männlichen Probanden als signifikant heraufreguliert bestimmt worden sind, ist um den Faktor 3,5 größer.

RANBP5 (RAN binding protein 5) wird normalerweise primär in Hodengewebe exprimiert (Anway et al. 2003) und spielt eine wichtige Rolle in der Spermatogenese (Loveland et al. 2005). Dies deutet auf eine geschlechtsspezifische Funktion von RANBP5 auch in Blut hin.

Das in den männlichen Proben heraufregulierte APOD (Apolipoprotein D) ist Androgen-induziert (Alvarez et al. 2004) und transportiert kleine hydrophobe Liganden wie Cholesterol und Sterole (Helisalmi et al. 2004). Zudem spielt es beim männlichen Brustkrebs und Gynaecomastien eine essentielle Rolle (Serra-Diaz et al. 1999).

Das FZD6 (Homolog des Frizzled homolog 6 (Drosophila)) scheint eine wichtige Rolle bei dem Haarmuster von Mäusen zu spielen (Guo et al. 2004; Klein und Mlodzik 2004), wo es

sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen Unterschiede zwischen den Geschlechtern gibt. Desweiteren spielt FZD6 eine Rolle als Rezeptor für das Wnt-signalling (Golan et al. 2004). Zu den in den männlichen Proben heraufregulierten Transkripten gehören jedoch auch Gene, denen bisher noch keine geschlechtsspezifische Funktion nachgewiesen wurde, wie z.B. das LEFTY2 (Left-right determination factor 2), ein zur TGF-beta Familie gehöriges Gen, dessen Protein für die Links-Rechts-Symmetrie des Körpers mitverantwortlich ist (Yashiro et al. 2000).

Die SCD4 (Stearoyl-CoA desaturase 5) wird laut SOURCE-Datenbank in Hodengewebe zwar exprimiert, seine Funktion ist jedoch die Umwandlung von gesättigten Fettsäuren in mono-ungesättigte Fettsäuren. Eine ähnliche Funktion weist die PPT2 (Palmitoyl-protein thioesterase 2) auf. Diese cytosomale Thioesterase hydrolysiert langkettige Fettsäure-AcylCoAs (Gupta et al. 2001).

BUB1B (BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)) spielt als Kinase in der Mitose eine Kontrollfunktion bei dem Spindelapparat (Davenport et al. 1999). Das CHEK1 (CHK1 checkpoint homolog) stellt eine Kinase dar, die ebenfalls Teil der Kontrolle im Zellzyklus bei DNA-Beschädigung ist (Clay-Farrace et al. 2003).

Bei einer von der Literatur-Validierung unabhängigen Analyse dieser geschlechtsspezifischen Transkriptliste in der GoTree-Ontology –Datenbank (Stand 11/2005) zeigte sich, dass von den 50 regulären Genen dieser Liste drei dem biologischen Prozess der Reproduktion zugeordnet werden (CHEK1, LEFTY2 und USP9Y).

Der Vergleich der in der MA-Analyse als geschlechtsspezifisch dargestellten Transkripte mit Literatur-Daten zeigt bei den Transkripten, zu denen publizierte Daten vorliegen, generell Übereinstimmungen. Hierauf basierend wurde diese Transkriptliste für eine Analyse aller MA-Daten dieses Projektes verwendet.

5.4.7 Abgleich der geschlechtsspezifischen Transkriptliste mit allen

Patientengruppen und allen Normalkontrollen

Die geschlechtsspezifische Transkriptliste wurde genutzt, um die Expressionsprofile der weiblichen und männlichen Normalkontrollen mit allen vorhandenen Intersex-Patientendatensätzen in einer supervidierten Analyse zu vergleichen.

Hierbei zeigt sich eine Auftrennung der Individuen durch die Clusteranalyse in zwei Hauptgruppen (Bild 4.2.4). Dies basiert primär auf den Y-chromosomal-spezifischen Genen USP9Y, RPS4Y1, DDX3Y, EIF1AY sowie dem X-chromosomal-spezifischen XIST.

Auf der linken Seite des Clusters lagern sich die weiblichen Normalkontrollen 46,XX mit den AGS-Personen (46,XX, vermännlichter Phänotyp) zusammen. Die gemeinsame

Gruppenbildung basiert jedoch lediglich auf den bereits aufgeführten gonosomalen Genen. In dieser Gruppe der 46,XX-Personen unterscheiden sich die weiblichen Normalkontrollen bei den autosomalen Genen deutlich von den AGS-Personen mit weiblichen Phänotyp aber vermännlichten Genitalbereich.

Die AGS-Person P114 gruppiert sich an die Gruppe der weiblichen Normalkontrollen. P114 weist eine 21-Hydroxylase-Mutation mit Salzverlustsyndrom (SVS) auf. Die Patientin war nie compliant, sie ist daher sehr klein geblieben und besitzt eine tiefe Stimme. Die Eingruppierung anhand des Expressionsmusters ist erstaunlich, da trotz männlicher Geschlechtsorganausprägung (postpartal Stufe IV von V) und dem hohen Testosteron-Spiegel (fast ständig im männlichen Bereich) ein Expressionsbild auftritt, das bei der hierbei verwendeten geschlechtsspezifischen Transkriptliste dem der weiblichen Normalkontrollen sehr ähnelt. Dies könnte einerseits an der relativ hohen Zahl an nicht messbaren Transkripten bei dieser Person liegen (graue Felder in der Clusteranalyse). Andererseits könnten bei AGS zusätzlich andere Faktoren als der geschlechtliche Dimorphismus die detektierten Gene beeinflusst haben. Eine Wiederholung des Experimentes mit dieser überaus interessanten Patientin war aufgrund fehlender MA's dieser Produktions-Lot abschließend nicht möglich.

Auf der rechten Seite des Clusters gruppieren sich die männlichen Normalkontrollen mit den verschiedenen intersexuellen Zwischenformen, die alle einen 46,XY-Karyotyp aufwiesen und partiell virilisierten. Die Personen mit intersexuellem Phänotyp im 46,XY-Block bilden hierbei kein zusammenhängendes Muster als Intersex-Block. Dies konnte Frau Dr. Deppe in ihren MA-Versuchen mit Gewebeproben verschiedener Intersex-Personen ebenfalls nachweisen. Die beiden SRD5A2-Patienten (P004 und P032) weisen eine Mutation im 5-alpha-Reduktase-Typ-2-Gen auf. Die Umwandlung von Testosteron in Dihydrotestosteron ist durch diesen Defekt gestört. Beide Patienten clustern in zwei verschiedenen Subgruppen. Die Patientin P004 (homozygote Mutation im SRD-5A2-Gen) war bei der Probennahme 22 Jahre alt und wurde im Alter von zwei Jahren gonadektomiert. Dies bedeutet, bis zu diesem Zeitpunkt war der Organismus einer erheblichen Androgenwirkung ausgesetzt (Prader-Stadium bei Geburt PIII). Die Patientin wurde aufgrund der Ähnlichkeit der Expressionsdaten in den Block der männlichen Normalkontrollen eingruppiert. Anhand der Genexpressionsdaten lässt sich zeigen, dass trotz einer 20 Jahre zurückliegenden Gonadektomie der männliche Karyotyp zu einem eher „männlichen“ Expressionsbild führt. Es müssen spezifische, originär Testosteron-induzierte zelluläre Prozesse vorliegen, die durch die in den ersten beiden Jahren vorhandenen Gonaden ausgelöst worden sind, aber seit der Gonadektomie unabhängig davon ablaufen. Diese werden scheinbar auch nicht durch eine stattfindende Hormontherapie mit Presomen unterdrückt.

Dieser Aspekt ist interessant, da in der Literatur eine möglichst frühe Gonadektomie empfohlen wird, um die Maskulinisierung der Patienten zu verhindern (Sultan et al. 2002). Die Expressionsanalyse von P004 zeigt jedoch, daß diese männlichen Entwicklungen auf genetischer Ebene nach dem entsprechenden hormonellen Anstoß selbst 20 Jahre nach der Gonadektomie noch nachweisbar sind.

Die Patientin P032 war zum Zeitpunkt der Probenahme 1 ½ Jahre alt. Die Patientin weist einen vollständig weiblichen Phänotyp ohne jegliche Zeichen einer Virilisierung auf. Die Patientin besitzt einen normalen Hoden sowie einen erhöhten T-Spiegel. Nach einer hCG-Injektion erfolgt ein normaler Anstieg der T-Konzentration. Entsprechend ihres Phänotyps clustert P032 bei den weiblichen 46,XY-Patienten, was die Annahme der geschlechtsspezifischen Genexpression unterstützt.

Zusammen mit der AGS-Person mit männlichem Phänotyp (P113) gruppiert sich die Person P115 in den Block der männlichen Normalkontrollen. P115 ist ein fünfzehnjähriges sog. 46,XY-Mädchen, das keinerlei Virilisierung aufweist. Die Vagina endet blind, nach hCG-Gabe erfolgt kein Testosteronanstieg. Probenmaterial für die Analyse des 17,20-Lyase-Gens liegt im Routine-Labor vor, weder ein AR-Defekt noch ein 5-alpha-Reduktase-Mangel konnten nachgewiesen werden.

Bei den weiteren Patienten zeigt sich der Androgenmangel als Ursache für die Virilisierungsstörungen. Durch unterschiedlich stark ausgeprägte Störungen, die im Steroidbiosyntheseweg zudem unterschiedlich schwerwiegende Folgen haben können, unterscheiden sich die Patienten in ihrem Phänotyp bzw. ihrem Hormonhaushalt.

Die Personen mit Gonadendysgenese (GD) und weiblichem Phänotyp (P017, P018, P019, P089) bilden eine eigene, homogene Subgruppe. Die GD-Person mit überwiegend männlichem Phänotyp (P088) gruppiert sich an diese Gruppe, weist jedoch geringe Unterschiede in der Expression auf.

Die Person mit dem P450SCC-Defekt (P033) und die Person mit 17 β -HSDIII-Defekt (P027) lagern sich an die GD-Gruppe. P033 weist neben dem P450SCC-Defekt auch eine GD auf. Die Ähnlichkeit im Expressionsmuster mit den GD-Personen ist somit zu erwarten.

Durch den Defekt in der 17- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, von dem mittlerweile 11 Isoformen bekannt sind, kann bei P027 das Androstendion nicht zu Testosteron umgewandelt werden. Bei diesen männlichen Pseudohermaphroditen weisen männliche 46,XY-Personen externe weibliche Genitalien auf.

Die Zahl der in dieser Analyse verwendeten Personen mit diesen beiden Enzymdefekten ist jedoch zu gering, um eindeutige Aussagen über 17- β -HSD-III oder P450SCC zu treffen.

Die Person mit partieller LCH (P110) gruppiert sich in die männlichen Normalkontrollen. Mutationen im LH-Rezeptor der Leydig Zellen verhindern eine zelluläre Antwort auf das lutenisierende Hormon (LH) und das Chorion Gonadotropin (hCG), dies führt zu einem Abfall oder zum völligen Fehlen von Testosteron Sekretion durch den Hoden (Chan et al. 1998). Abhängig hiervon entstehen verschiedene Formen der Leydig Zell-Hypoplasie (LCH) (Richter-Unruh et al. 2002, Richter-Unruh et al. 2005). Die Bandbreite reicht von 46,XY-Personen mit komplett weiblichen Phänotyp (Richter-Unruh et al. 2004) bis hin zu hypoplastischen männlichen externen Genitalien bzw. Hypospadie. In diesem Fall ist der LH-Rezeptor noch bedingt funktionsfähig, die Testosteron-Sekretion ist somit lediglich eingeschränkt und die Eingruppierung von P110 in die Gruppe der männlichen Normalkontrollen entspricht den Erwartungen.

Bei der Patienten P090 ist die endgültige Diagnose bei Erstellung der Arbeit noch nicht gestellt. Es wird eine Subtelomerdeletion vermutet. Das P090-Expressionsprofil in der Cluster-Analyse deutet jedoch Ähnlichkeiten mit den AGS-Patienten hin.

Durch die freie Drehbarkeit von Subgruppen auf gleichem Niveau, d.h. solche mit gleichwertigem Ähnlichkeitsfaktor, könnten durch selektive Verwendung nur der autosomalen Gene die Ähnlichkeiten von den Normalkontrollen mit den jeweiligen Gruppen von Patienten, die phänotypisch mit dieser Gruppe Normalkontrollen übereinstimmen, jedoch einen anderen Karyotyp aufweisen, dargestellt werden.

Bei den weiblichen Normalkontrollen 46,XX und den GD-Personen 46,XY mit weiblichen Phänotyp gibt es eine kleinere Gruppe von ähnlich heraufregulierten Transkripten sowie einen größeren Block ähnlich herunterregulierter Transkripte. Vergleicht man die in 5.4.6 näher beschriebenen Gene mit den Daten aus Bild 4.2.4, so bestätigt sich die geschlechtsspezifische Regulation dieser Gene auch bei den entsprechenden Intersex-Personen. AQP9 wird sowohl in den weiblichen Normalkontrollen als auch in den GD 46,XY mit weiblichem Phänotyp exprimiert. Dies stützt die Wahrscheinlichkeit, dass AQP9 ein von den Gonosomen unabhängig reguliertes „weibliches“ Gen darstellt.

Dies gilt ebenfalls für RASGRP1, HA-1, MSCP und IGF1R.

Entsprechend revers bilden sich diese beiden Muster der autosomalen Transkript-Gruppen bei den männlichen Normalkontrollen 46,XY sowie den AGS-Personen mit 46,XX-Karyotyp aber einem vermännlichten weiblichen Phänotyp. Dies korreliert auch mit der AGS-Person mit komplett männlichem Phänotyp (P112), die zwar ein AGS-Phänomen aufweist, jedoch

aufgrund ihres 46,XY-Karyotyps direkt an den Block der männlichen Normalkontrollen angelagert wird.

Interessant ist hier u.a. das androgenregulierte APOD, das sowohl bei den männlichen Normalkontrollen als auch bei den AGS-Personen stark exprimiert wird. Dies zeigt, dass die AGS-Personen einer Androgenwirkung ausgesetzt waren. Auch die anderen Gene aus 5.4.6 sind entsprechend sowohl bei den männlichen Normalkontrollen als auch den AGS-Personen heraufreguliert (LEFTY2, RANBP5, SCD4, CHEK1, FZD6, BUB1B und PPT2).

5.4.8 Analyse der geschlechtsspezifischen autosomalen Transkriptliste mit allen Patientengruppen und allen Normalkontrollen

Die Diskrepanz zwischen Geno- und Phänotyp bei der Intersexualität im Vergleich zu Normalkontrollen 46,XX und 46,XY mit normal weiblichem bzw. männlichem Phänotyp basiert auf Mutationen in den Genen der Androgenbereitstellung und der Androgenwirkung. Dieser Unterschied müsste auf der Transkriptionsebene nachweisbar sein. Dies war bereits in Bild 4.2.4 aufgrund der Ähnlichkeit von 46,XY Normalkontrollen und AGS-Personen 46,XX sowie 46,XX Normalkontrollen und GD-Personen 46,XY im autosomalen Bereich der geschlechtsspezifischen Transkriptliste deutlich zu erkennen.

Für eine genauere Betrachtung des Einflusses der autosomalen Gene, also die Hervorhebung der autosomalen Gene, die unabhängig vom Karyotyp den Phänotyp beeinflussen, wurde in einer weiteren Cluster-Analyse erneut die geschlechtsspezifische Genliste mit den Expressionsprofilen der weiblichen und männlichen Normalkontrollen sowie allen vorhandenen Intersex-Patientendatensätzen in einer supervidierten Analyse verknüpft. Im Gegensatz zu der Cluster-Analyse in Bild 4.2.4, deren Expressionsprofile sich primär aufgrund ihrer gonosomalen Gene gruppierten, wurde bei dieser Analyse der GeneWeight der gonosomalen Gene (12 Transkripte: XIST, DDX3Y, USP9Y, RPS4Y1, CYorf15B, ZFX, IMAGE:288683, IMAGE:301740) vor dem Cluster-Vorgang mit Null definiert. Die Expression dieser gonosomalen Gene wird im Cluster zwar dargestellt, hat aber keinen direkten Einfluss auf die Berechnung des Clusters.

In der graphischen Darstellung dieses supervidierten Clusters (Bild 4.2.5) ergibt sich eine eindeutige Auftrennung bezüglich der Phänotypen. Diese Zuordnung erfolgt also unabhängig vom chromosomalen Geschlecht, enthält jedoch jeweils verschiedene Diagnosen. In der ersten Hauptgruppe befinden sich vorwiegend Personen mit einem weiblichen Phänotyp. Dies umfasst die weiblichen Normalkontrollen und die Patienten mit GD, 17- β -HSD, P450SCC, eine Person mit SRD5A2 mit weiblichen Phänotyp sowie die AGS-Person P114.

Bei der Gonadendysgenese (GD) ist der Phänotyp aufgrund mangelnder Testosteronbildung zum Zeitpunkt der Geburt i.d.R. weiblich. In Kombination mit dem TDF (Testis determining factor) ist das HY-Antigen in der frühen Embryonalentwicklung für die Entwicklung der Hoden aus den noch undifferenzierten Gonaden verantwortlich. Wird nun das HY-Antigen nicht oder nur strukturell verändert exprimiert, entsteht trotz eines 46,XY-Karyotyps ein weiblicher Phänotyp („46,XY-Frauen“).

Abhängig von der genetischen Mutation liegt eine unterschiedliche Störung in der Gonaden-Differenzierung vor.

Eine weitere Variante des 46,XY-Karyotyps mit weiblichen Phänotyp sind Patientinnen mit P450SCC-Defekt. Die Patientin (P033) wies eine homozygote Deletionsmutation im CYP11A1-Gen auf, so dass keinerlei adrenale oder gonadale Steroide gebildet werden können.

In der zweiten Hauptgruppe (phänotypisch männlicher Block) befinden sich die männlichen Normalkontrollen sowie die AGS-Personen mit männlichem Phänotyp. Diese Personen weisen einen 46,XX-Karyotyp auf. Diese Zuordnung zeigt, dass diese Cluster-Analyse nicht auf Basis der gonosomalen Gene erfolgt ist.

In der Gruppe der phänotypisch männlichen Personen finden sich auch hier wieder Gene wie APOD, LEFTY2, RANBP5, SCD4, CHEK1, FZD6, BUB1B und PPT2 als heraufregulierte Markergene, die somit den Phänotyp „männlich“ reflektieren.

5.4.9 Vergleich 46,XX weiblicher Phänotyp gegen 46,XX vermännlichter Phänotyp

Neben 46,XY-Personen mit weiblichen Phänotyp gibt es auch 46,XX-Personen mit einer Vermännlichung des weiblichen äußeren Genitales. Auch diese Gruppe ist eine interessante Analysegruppe, da auch hier wie bei den 46,XY-Personen mit weiblichem Phänotyp eine Diskrepanz zwischen Genotyp und Phänotyp besteht. Diese Umwandlung sollte auf Expressionsebene nachweisbar sein.

Der autosomal-rezessiv vererbte Enzymdefekt der 21-Hydroxylase führt zur Ausprägung des Adrenogenitalen Syndroms (AGS) bzw. der Congenitalen Adrenalen Hyperplasie (CAH).

Durch den 21-Hydroxylase-Defekt in der Nebenniere kann das 17-Hydroxy-Progesteron, abhängig vom Grad des Enzymdefektes, nur bedingt oder gar nicht in Kortisol umgewandelt werden. Dies führt zu einer Anreicherung von ACTH (adrenokortikotropes Hormon), welches zu einer erheblichen Überproduktion von adrenalen Androgenen und somit zu einer Hyperandrogenisierung führt. Der Überschuss an Androgenen führt bei weiblichen 46,XX-Feten, die chromosomal, gonadal und gonoduktal eigentlich weiblich sind, zu einer genitalen

Virilisierung. Dies kann zu einer Vermännlichung des weiblichen äußeren Genitale einer Person bis zu der Bildung eines Pseudopenis führen (Hughes 2002).

Von der Gruppe von AGS-Personen standen sechs verschiedene Blutproben zur Verfügung. Es wurden die weiblichen Normalkontrollen 46,XX mit den fünf 46,XX AGS-Personen mit vermännlichtem weiblichen Phänotyp auf signifikante genetische Unterschiede getestet. Hierbei ergab sich eine Liste mit 183 signifikant regulierten Genen (Bild 4.2.6).

In AGS-Personen werden 79 Transkripte signifikant heraufreguliert, von denen momentan jedoch knapp 30 nur als Klon bzw. ORF definiert sind. Bei den definierten Genen befinden sich einige interessante Kandidaten-Gene:

Das SSX1 (Synovial sarcoma, X breakpoint 1) codiert X-chromosomal einen Transkriptionsrepressor. SSX-Gene werden sehr limitiert exprimiert, die entsprechenden SYT-SSX-Fusionstranskripte sind daher als Marker für Synovial-Sarkome nutzbar (Crew et al. 1995). SSX1 ist jedoch bisher nur in Hodengewebe mittels RT-PCR nachweisbar (Hasegawa et al. 2004). Dies könnte auf eine geschlechtsspezifische Expression hindeuten, wenn auch bisher für Blutproben keinerlei publizierte Daten vorliegen.

Das LAMA4 (Laminin alpha 4) (Richards et al. 1994) hat eine Funktion als Signal-Molekül (Wang et al. 2005) sowie als Struktur-Protein in der kardiovaskulären Entwicklung (Iivanainen et al. 1995). In den vorliegenden Analysen wird LAMA4 in allen Analysen als jeweils signifikant reguliert dargestellt. Es wird in männlichen Normalkontrollen stärker als in weiblichen Normalkontrollen exprimiert (Vergleich 4.2.3), jedoch nicht so stark wie in den AGS-Personen (Vergleich Bild 4.2.7). Bei den weiblichen Normalkontrollen (Vergleich Bild 4.2.7) und bei den 46,XY-Frauen (GD-Patienten) (Vergleich Bild 4.2.5) ist keine deutliche Expression nachweisbar. Dies deutet daher nicht auf eine 46,XY- oder 46,XX-spezifische Expression sondern auf eine Spezifität bei männlichem oder vermännlichtem Phänotyp hin.

Das SHBG (Sex hormone-binding globulin) ist ein Androgen-Transport-Protein, welches spezifisch DHT, T und 17-beta-Estradiol als Zielmoleküle erkennt (Anderson 1974) und von der Leber in die Blutlaufbahn abgegeben (Hammond 1990). In transgenen Mäusen konnten Janne et al. nachweisen, dass SHBG nur in männlichen shbg11-Mäusen stark exprimiert wird. Wurden diese Mäuse kastriert, so reduzierte sich die SHBG-Konzentration. In weiblichen Mäusen konnte durch externe Androgengabe eine Expression von SHBG induziert werden (Janne et al. 1999). Dies stimmt überein mit der geringen oder nicht vorhandenen Expression von SHBG bei den weiblichen Normalkontrollen. Die AGS-Personen mit vermännlichten Geschlechtsorganen weisen jedoch einen höheren Androgenspiegel auf. Somit kann auch eine deutliche Expression des SHBG erwartet

werden. P114 hat fast permanent hohe (männliche) T-Spiegel, bei ihr ist das SHBG besonders stark exprimiert.

Die Expression des X-chromosomal codierten GAGE2 (G antigen 1) konnte bisher nur in Hodengewebe (SOURCE-Datenbank, 30% Hoden) und Leberzell-Tumoren nachgewiesen werden (Schlott et al. 1999). Zumindest die testiculäre Expression deutet auf eine geschlechtsspezifische, männliche Rolle hin, was mit der Diagnose der 46,XX-AGS-Personen mit vermännlichten Geschlechtsorganen korrelieren würde.

Das TREM1 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 1) ist in den AGS-Personen herunterreguliert. TREM1 wird in der SOURCE-Datenbank als primär placental exprimiert dargestellt.

Viele Gene, welche aufgrund der SAM-Algorithmen als geschlechtsspezifisch oder spezifisch für bestimmte intersexuelle Zwischenformen signifikant reguliert dargestellt werden, sind in der Literatur bisher nicht genau beschrieben. Bei den Genen mit bereits vorliegender Funktionsbeschreibung in der SOURCE-Datenbank fällt deutlich die große Gruppe der Transkriptionsfaktoren auf (KLF4, KLF6, EGR2, JUNB, IRF8, ELF1, GATA2, POU2F2). Wie schon in der Diskussion der Ergebnisse der Androgenrezeptor-spezifischen Coregulatoren zeigt sich auch hier die enorm wichtig Rolle von Coregulatoren bzw. Transkriptionsfaktoren für viele Prozesse. Dies ist bisher zuwenig beachtet worden. In vielen Einzelgen-Untersuchungen werden Gene getrennt von ihrem natürlichen Milieu betrachtet: So könnten z.B. bestimmte humane Gene in transgenen Mäusen mit Mäuse-Coregulatoren ein anderes Funktionsbild abgeben als mit humanen Coregulatoren in humaner Zellumgebung.

Bei einer Analyse der Normalkontrollen 46,XY und 46,XX, der sechs AGS-Personen (5x vermännlichter weiblicher und 1x männlicher Phänotyp) sowie den übrigen Intersex-Personen mit dieser signifikanten AGS-spezifischen Genliste (46,XX gegen 46,XX-AGS) ergab sich eine klare Abtrennung der AGS-Personen von den Normalkontrollen und den übrigen Intersex-Personen (Bild 4.2.7).

Bei einzelnen Genen oder kleinen Gengruppen treten Übereinstimmungen mit anderen Intersex-Personen auf, die Betrachtung der Abtrennung der AGS-Personen muß jedoch als Ganzes, also innerhalb dieser über 300 Gene erfolgen.

Die weiblichen und männlichen Normalkontrollen unterteilten sich nicht in zwei eindeutige geschlechtsspezifische Gruppen. Dies bedeutet, die aus dem Vergleich zwischen 46,XX

Normalkontrollen und 46,XX-AGS-Personen generierte Genliste ist weder gonosomal noch sonst geschlechtsspezifisch, sondern AGS-spezifisch.

Dies wird auch durch die unspezifische Verteilung der anderen Intersex-Patienten innerhalb der Mischgruppe der männlichen und weiblichen Normalkontrollen gestützt.

Eine männliche Normalkontrolle (N-M-104) wurde anhand ihres Expressionsprofils in der Gruppe der AGS-Patienten lokalisiert. Die N-M-104 ist der Vater der P105 AGS-Person. Da AGS einen rezessiver Enzymdefekt darstellt, muss der Vater dieser Person ein Konduktor sein.

Eine Vertauschung von N-M-104 mit Patienten oder N-F ist sehr unwahrscheinlich, da die Person beim direkten Vergleich Mann gegen Frau (ohne AGS-Personen) eindeutig im männlichen Bereich clustert (Bild 4.2.3) und ausgeprägte Y-chromosomale Gene bzw. Transkripte exprimiert (DDX3Y, RPS4Y1, USP9Y, CYorf15B).

Interessanterweise scheint das bei über 95% der AGS-Personen betroffene Enzym 21-Hydroxylase selbst in der heterozygoten Form wie bei der N-M-104 indirekt signifikante Auswirkungen auf über 300 Gene zu haben. Interessant wäre hier das Expressionsprofil der Mutter von P105. Da die weitaus meisten signifikanten Gene dieser Liste nicht geschlechtsspezifisch sind, würde man eine ähnliche Zuordnung der heterozygoten Mutter zu den AGS-Personen erwarten wie bei dem Vater. Die Analyse des mütterlichen Expressionsprofils war aufgrund rechtlicher Konstellationen in dieser Studie nicht möglich.

Bei genauerer Betrachtung der AGS-Gruppe zeigt P113 (männlicher Phänotyp) ein ähnliches Bild wie die anderen AGS-Personen mit weiblichen Phänotyp, jedoch lässt sich generell eine leicht schwächere Expressionsrate der entsprechenden Gene nachweisen.

Eine weitere interessante Person ist P114, die zusammen mit P113 von den übrigen AGS-Personen etwas differenziert. Die Ursache für die Abgrenzung von P114 gegenüber den übrigen AGS-Personen basiert auf den unter 5.4.8 dargestellten diagnostischen Besonderheiten dieser Person.

Die Patientin mit partiellem LCH (P110) wird dem AGS-Block zugeordnet. Dies ist momentan vom medizinischen Standpunkt nicht eindeutig erklärbar. Eine LCH Patientin (46,XY) weist normalerweise einen zu niedrigen Androgenspiegel auf, eine AGS-Patienten (46,XX) weist jedoch einen zu hohen Androgenspiegel auf. Da die Erstellung der AGS-spezifischen Genliste auf einem Signifikanz-Test mit den weiblichen Normalkontrollen und den AGS-Personen beruht, könnte dieses Transkriptprofil zu einem erheblichen Anteil von dem hohen Androgenspiegel in den AGS-Personen herrühren.

Eine Vertauschung der P110-Probe mit der P111 (AGS-Person), die in diesen Analysen nicht verwendet wurde, ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Aufgrund

der Komplexität der Datenauswertung wurden die experimentellen Abläufe sorgfältig dokumentiert und die Probenverwendung in drei unabhängigen Listen aufgeführt.

Ein möglicher Zeitpunkt für eine Verwechslung ist die Blutabnahme. Die Probe P110 wurde um 11:45 und die Probe P111 um 12:00 entnommen und zusammen mit P112 in das Labor überführt.

P115 mit einem vermuteten Androgenbiosythesedefekt wird ebenfalls der Peripherie des AGS-Blockes zugeordnet. Für eine genauere Erklärung dieser Zuordnung von P115 fehlt die eindeutige molekulargenetische Diagnose, die zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit noch nicht vorlag.

Bei beiden Patienten (P110 und P115) könnte eine heterozygote CYP21-Mutation, die in der Bevölkerung relativ häufig ist (1:40 – 1:50; Beier et al. 2001), für die entsprechende Einordnung im AGS-Block verantwortlich sein. Sequenzen des entsprechenden Gens dieser Patienten liegen jedoch nicht vor.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gonosomalen Gene eine entscheidene Rolle in der differentiellen Genexpression spielen. Zudem beeinflussen Hormone, wie im Fall der Geschlechtsentwicklung Androgene, in erheblichem Maße die Expression von autosomalen Genen.

Es zeigt sich, dass die PBMC-Zellen in erheblichen Maße eine geschlechtsdimorphe Transkript-Signatur aufweisen. Diese konnte mit der verwendeten Microarray-Methode nachgewiesen werden. Die Geschlechtszuordnung von Personen aufgrund ihres Phänotyps lässt sich auf die PBMC übertragen. Auch hier liegen die Zuordnungen „männlich“, „weiblich“ und „intersexuell“ vor.

Es ist möglich, Intersex-Personen aufgrund ihrer PBMC-Expressionsprofile bestimmten, auf medizinischen Diagnosen basierenden Gruppierungen zuzuordnen. Hierbei hat sich jedoch auch deutlich gezeigt, dass die Gruppen, die unter medizinischen Gesichtspunkten, d.h. aufgrund von Diagnosen, definiert sind, sich auf molekularer Ebene in mehrere Subgruppen aufteilen können. Die Filterkriterien müssen für die Analysen so gewählt werden, dass die gruppenspezifischen Markergene für die molekulare Gruppierung ausschlaggebend sind. Individuelle und Subgruppen-spezifische Profile müssen herausgefiltert werden, hierzu sind größere Gruppen von Personen mit gleicher Diagnose wünschenswert und nötig. Dies ist jedoch aufgrund der bereits aufgeführten Problematik der richtigen Diagnose und der relativ selten auftretenden Fälle von Intersexualität schwierig.

5.5 Einfluß von DHT auf PBMC-Expressionsprofil

Neben dem Nachweis geschlechtsspezifischer Expressionsmuster stellt sich die Frage, ob die Wirkung von Androgenen auf PBMCs im Expressionsprofil darstellbar ist und ob sich dadurch Biomarker der Androgenwirkung identifizieren lassen. Die Fragestellung dieses Teilprojektes bezog sich auf die Einwirkung von verschiedenen Dihydrotestosteron-Konzentrationen (DHT) auf PBMC unter Zellkulturbedingungen innerhalb von 24 h.

Kuhnle et al. konnten eine Androgen-Bindungsstelle in PBMCs darstellen (Kuhnle et al. 1994). Ein Nachweis der Androgenwirkung auf das Expressionsprofil von kultivierten PBMCs könnte zukünftig eine Ergänzung bei der Diagnostik spielen, da der Rezeptor direkt in seiner Funktion als Transkriptionsregulator untersucht wird.

Für diese Experimente wurden die PBMCs für 24 h in phenolrotfreiem Medium kultiviert. Phenolrot kann Steroidhormon-ähnliche Wirkungen auf Zellen haben (Rajendran et al. 1987; Ortmann et al. 1990; Tsang et al. 2001). Das hierbei als Stimulus eingesetzte Hormon DHT war in 100% EtOH gelöst, die entsprechenden Kontrollen wurden mit der selben Konzentration EtOH versetzt. Die Inkubation der PBMCs erfolgte über Nacht rotierend in einem CO₂-Brutschrank. RNA-Isolation, Amplifikation und Hybridisierung erfolgte wie beschrieben.

Für die Datenanalyse wurde anstelle der sonst üblichen Nutzung der Messwerte auf Basis des „R/ G log base 2 Normalized Ratio“ der „R/ G Normalized Mean“ verwendet. Für einen Überblick über eine mögliche Induktion von Genexpression aufgrund der Hormoninkubation wurden die Messwerte zunächst relativiert. Hierzu wurde von den beiden unabhängigen EtOH-Kontrollen zunächst der Mittelwert des R/G normalisierten Means pro Gen gebildet. Die fünf verschiedenen Hormoninkubationswerte sowie der LPS-Wert wurden durch diesen EtOH-Mittelwert dividiert, um die Wirkung des EtOH, in dem das Hormon gelöst war, aus dem Expressionsprofil herauszurechnen und um Herauf- und Herabregulation direkt ablesen zu können. Die resultierenden Expressionsdaten basieren somit nur auf der Wirkung der jeweiligen Androgen- bzw. Wirkstoffkonzentration und nicht auf dem EtOH-Gehalt im Medium. Die geringfügig unterschiedlichen Bedingungen in den fünf verschiedenen Inkubationsröhrchen spielen jedoch eine nicht zu vernachlässigende Rolle.

Die resultierenden Quotienten wurden vor dem Clustern erneut logarithmisiert. Im Clustering erfolgte weder eine mittlere Zentrierung der Gene, noch ein zentriertes Clustering der Arrays, da hier der Unterschied zwischen den verschiedenen Hormonkonzentrationen im Blickpunkt stand.

In Bild 4.3.1 sind deutlich herauf- bzw. herunterregulierte Transkripte zu erkennen. Diese Regulation ist unabhängig vom EtOH-Gehalt im Medium.

Auffällig ist die Gruppe der zahlreichen Transkripte von Transkriptionsfaktoren wie FOSL2 (Fos-Like antigen 2), TCF4 (Transcriptionfactor 4) und diverser Zinkfingerproteine (ZNF46; ZNF250; ZNF354B; ZNF518; ZNF533; DPF1 [D4, zinc and double PHD fingers family 1]) sowie von Transkripten, die Struktur- und Regulationsproteine codieren, wie KIF13A (Kinesin family member 13A) oder STK38L (Serine/ Threonin kinase 38 like).

Mit diesen Expressionsdatensätzen wurden in Kombination mit den Expressionswerten der Zellen aus dem Versuch mit dem Kontrollstimulus LPS verschiedene sogenannte „Data-mining“-Analysen durchgeführt (Datencluster nicht gezeigt).

Die Expressionsantwort von Makrophagen (Isolation durch Elutriation, kommerziell erworben) auf Pathogene, sowie auf LPS-Zugabe von 1 µg/ ml finaler Endkonzentration wurde von Nau et al. auf 6,8K-Affymetrix-GeneChips gezeigt (Nau et al. 2002). Dies führte bei Maus-Makrophagen, welche ebenfalls mit LPS inkubiert wurden, zu 1055 signifikant veränderten Genen (von 13.000; 8%) (Bjoerkbacka et al. 2004).

Es wurden verschiedene Experimente veröffentlicht, bei denen in PBMCs durch LPS-Gabe verschiedene Interleukine verstärkt exprimiert wurden. Hierzu zählen unter anderem IL-6 (Asai et al. 2001), IL-8 (Netea et al. 2002), IL-10 (Creery et al. 2002), IL-23 und seine Untereinheiten IL-12p40 und IL-12-p19 (Ma et al. 2004) oder IL-24 (Poindexter et al. 2005).

Keines dieser Interleukine konnte im Expressionsprofil der durchgeführten Experimente als besonders heraufreguliert nachgewiesen werden. Dies führt zu der Annahme, dass die Interleukine in dieser experimentellen Konfiguration generell nicht heraufreguliert wurden. Ein Fehler in der Datenauswertung ist aufgrund verschiedener Image-Klone pro Interleukin sowie verschiedener Interleukine unwahrscheinlich.

Die durch LPS-Stimulation erhöhte Expression von TNF-alpha in PBMCs (Asai et al. 2001; Takahashi et al. 2003; Netea et al. 2002) konnte jedoch ebenso nachgewiesen werden wie die LPS-induzierte Heraufregulation von CD14 (Creery et al. 2002). Diese konnte sogar in zwei unabhängigen Image-Klonen nachgewiesen werden (IMAGE:435434 und IMAGE:417018).

Für die Durchführung der Experimente wurden in insgesamt drei Versuchsansätzen Poly-L-Lysin-beschichtete MA´s sowie Ultra-GAPS von Corning (Acton, MA, USA) verwendet. Die beiden MA-Serien unterschieden sich nur in der Oberflächenbeschichtung. In einzelnen Vorabexperimenten waren zuvor keinerlei Unterschiede zwischen beiden MA-Oberflächenbeschichtungen sichtbar gewesen. Die in den Vorversuchen gefundene Übereinstimmung zwischen Poly-L-Lysin-beschichteten MA´s und Ultra-GAP-MA´s konnte in

der eigentlichen Experiment-Reihe jedoch nicht wiedergefunden werden. Die Ergebnisse wiesen ein erhebliches Problem bei der Vergleichbarkeit der beiden unterschiedlichen MA-Serien auf. Benötigte weitere Experiment-Reihen waren aufgrund fehlender MA's zum Ende der Arbeit nicht mehr durchführbar.

Unterschiede zwischen einzelnen Printruns können laut Benito et al. zu erheblichen Problemen in der Datenauswertung führen. Durch diesen sog. batch effect können verschiedene Herstellungs-Chargen untereinander nur bedingt verglichen werden (Benito et al. 2004).

Dieser Faktor könnte durch entsprechende Wiederholungsexperimente sowie höhere Probandenzahlen relativiert werden. Die Validierung der Expressionsdaten ist jedoch nur mit Wiederholungsexperimenten aus neu isolierter RNA gleichem Ursprungs sinnvoll. Für eine statistische Auswertung von Wiederholungsexperimenten sind mindestens drei unabhängige Wiederholungen nötig (Brown et al. 2004), was weder aufgrund der Patientenverfügbarkeit noch aufgrund des finanziellen Rahmens der Projekte (100 MA-Experimente wurden für beide Teilprojekte dieser Arbeit durchgeführt, jedes MA-Experiment führte zu Kosten von ca. 500 Euro) möglich war. Dies führt bei fast allen publizierten MA-Projekten dazu, dass der Umfang der Experimente geringer als gewünscht und erheblich geringer als bei den meisten Einzelgen-Untersuchungen ausfällt (Jenssen et al. 2002).

Neben der Problematik der unterschiedlichen Beschichtung der MA's und somit dem unterschiedlichen Hybridisierungsverhalten der Proben können auch biologische Varianzen eine Rolle gespielt haben. Selbst in genetisch identischen Zell-Kulturen unter identischen Bedingungen können, wenn untereinander verglichen, substantielle Expressionsunterschiede bei einzelnen Genen auftreten (Hatfield et al. 2003). Dies basiert auf unterschiedlichen Faktoren wie der Micro-Umgebung, Ernährung, Temperatur-Gradienten, Wachstumsphasen oder Phasenverschiebung.

Trotz dieser Problematik weisen die Untersuchungen zu DHT-stimulierten PBMC darauf hin, dass über diesen Versuchsansatz potentielle Biomarker der Androgenwirkung identifiziert werden können, die eine funktionelle Diagnose der Androgenrezeptorfunktionsstörung bei AIS erlauben. In Blutzellen werden viele für die Geschlechtsdeterminierung essentielle Gene exprimiert.

Microarray-Untersuchungen bilden die Transkriptionsebene ab. Aus den resultierenden Expressionsprofilen können keine direkten Aussagen zur Translation der entsprechenden Transkripte getroffen werden. Hierzu müssten umfangreiche Proteinanalysen durchgeführt werden. Aussagen über diese Fragestellung standen jedoch für diese Projekte nicht im

Fokus. Zudem widerspricht die Einzelgen- bzw. Einzelproteinuntersuchung dem globalen Analyse-Ansatz der Array-Technologie. Eine effektive und sinnvolle Überprüfung der Expressionsprofile wäre durch Einsatz von Protein-Arrays möglich, deren Ergebnisqualität bislang jedoch noch schwankend ist.

Der gewählte Versuchsansatz ist aber vielversprechend, da dies eine Methode darstellt, die Wirkung von Hormonen wie DHT auf das Expressionsprofil von Blutzellen eines bestimmten Patienten zu überprüfen. Hier erfolgt die Überschneidung der genomweiten Analyse, basierend auf MA-Technologie, mit funktionellen Tests, welche abschließend in einer verbesserten Therapie enden könnten.

Die Daten aus der Literatur und die in diesen MA-Studien erzielten Ergebnisse ergeben, dass PBMC-Zellen ein vielversprechendes Modell für die Untersuchung von AR-Funktionen sind. Es lassen sich hiermit erfolgreich Biomarker für die AR-Funktion in-vitro lokalisieren.

Funktionelle Untersuchungen an Blut müssen in Zukunft optimiert und durch andere Methoden ergänzt werden.

5.6 Ausblick

Genexpression und Diagnostik

Ein Ziel in der MA-Technologie ist die Weiterentwicklung zu einem Diagnostik-Werkzeug. Biopsie-Proben oder Blutproben von Patienten mit bestimmten Erkrankungen könnten getestet werden, um den spezifischen Grund für die Erkrankung zu identifizieren. Zudem könnte die Untersuchung Aufschluß darüber geben, in welcher Form eine Erkrankung das Expressionsprofil verändert. Die Analyse könnte zudem zeigen, wie der Patient auf Expressionsebene auf bestimmte Arzneimittel reagieren könnte. Dies könnte dann dazu führen, auf die genetische Ebene abgestimmte und maßgeschneiderte Arzneimittel zu erschaffen. Dies würde die bisherige Suche nach effektiven Behandlungswegen bei vielen Erkrankungen revolutionieren.

Für die Zulassung nach IVD-Richtlinien (98/79/EG vom 27.10.1998) müssen die Systeme jedoch sehr aufwendig geprüft werden, und es muß eine lückenlose Dokumentation aller Herstellungsschritte sowie der jeweilig verwendeten Geräte erfolgen. Dies ist sehr zeit- und geldaufwendig. Zum momentanen Zeitpunkt (Frühjahr 2006) bietet nur die holländische Firma Agendia (www.agendia.com) einen auf MA-Daten basierenden Brust-Krebs-Test mit ca. 70 relevanten Marker-Genen an (van t'Veer et al. 2002). Die Auswahl der entsprechenden Marker-Gene ist jedoch sehr umstritten (Ein-Dor et al. 2005; Michiels et al. 2005).

Eine Zwischenstufe zum Proteomiksbereich stellen sog. Transkriptionsfaktor-MA's dar. Hierbei ist die Transkriptionsfaktor-Bindestelle als doppelsträngige DNA auf dem MA verankert. Potentiell bindende Transkriptionsfaktoren aus der Probe können anschließend detektiert werden.

Die Entwicklung von Protein-MA's hat gerade erst begonnen. Die Molekül-Stabilität der Proteine auf dem MA sowie die Beständigkeit der Bindung der Proteine zur MA-Oberfläche stellt jedoch noch ein erhebliches Problem dar.

6. Literatur

1. Abdelhaleem M. RNA helicases: regulators of differentiation. *Clin Biochem* 2005;38(6):499-503.
2. Abecassis V, Jaffrelo L, Rickman D, Aggerbeck L, Herbert C, Truan G, et al. Microarray-based method for combinatorial library sequence mapping and characterization. *Biotechniques* 2003;34(6):1272-9.
3. Adachi M, Takayanagi R, Tomura A, Imasaki K, Kato S, Goto K, et al. Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N Engl J Med* 2000;343(12):856-62.
4. Ahmed AA, Vias M, Iyer NG, Caldas C, Brenton JD. Microarray segmentation methods significantly influence data precision. *Nucleic Acids Res* 2004;32(5):e50.
5. Al-Mulla F, Al-Tamimi R, Bitar MS. Comparison of two probe preparation methods using long oligonucleotide microarrays. *Biotechniques* 2004;37(5):827-33.
6. Alen P, Claessens F, Verhoeven G, Rombauts W, Peeters B. The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. *Mol Cell Biol* 1999;19(9):6085-97.
7. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-11.
8. Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, et al. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(12):6745-50.
9. Alvarez ML, Barbon JJ, Gonzalez LO, Lamelas ML, Vazquez J, Vizoso FJ. Expression of two androgen-induced proteins (pepsinogen C and apolipoprotein d) in epithelial skin cancers of the eyelids. *Ophthalmologica* 2004;218(2):115-9.
10. Anderle P, Duval M, Draghici S, Kuklin A, Littlejohn TG, Medrano JF, et al. Gene expression databases and data mining. *Biotechniques* 2003;Suppl:36-44.
11. Anderson DC. Sex-hormone-binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1974;3(1):69-96.
12. Anderson RA, Wallace AM, Sattar N, Kumar N, Sundaram K. Evidence for tissue selectivity of the synthetic androgen 7 alpha-methyl-19-nortestosterone in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(6):2784-93.
13. Andriole G, Bruchofsky N, Chung LW, Matsumoto AM, Rittmaster R, Roehrborn C, et al. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5alpha-reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2004;172(4 Pt 1):1399-403.
14. Angele MK, Knoferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, et al. Sex steroids regulate pro- and anti-inflammatory cytokine release by macrophages after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 1999;277(1 Pt 1):C35-42.
15. Anway MD, Li Y, Ravindranath N, Dym M, Griswold MD. Expression of testicular germ cell genes identified by differential display analysis. *J Androl* 2003;24(2):173-84.
16. Asai K, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Unou K, Kaminishi M. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock* 2001;16(5):340-3.
17. Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* 2001;2(1):59-67.
18. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993;7(5):812-21.
19. Ball CA, Awad IA, Demeter J, Gollub J, Hebert JM, Hernandez-Boussard T, et al. The Stanford Microarray Database accommodates additional microarray platforms and data formats. *Nucleic Acids Res* 2005;33 Database Issue:D580-2.
20. Barnes M, Freudenberg J, Thompson S, Aronow B, Pavlidis P. Experimental comparison and cross-validation of the Affymetrix and Illumina gene expression analysis platforms. *Nucleic Acids Res* 2005;33(18):5914-23.
21. Baugh LR, Hill AA, Brown EL, Hunter CP. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* 2001;29(5):E29.
22. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 2000;6(3):225-36.
23. Beier, Bosinski, Hartmann, Loewit. *Sexualmedizin*. München: Urban & Fischer; 2001.
24. Benito M, Parker J, Du Q, Wu J, Xiang D, Perou CM, et al. Adjustment of systematic microarray data biases. *Bioinformatics* 2004;20(1):105-14.
25. Benten WP, Stephan C, Wunderlich F. B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol. *Steroids* 2002;67(7):647-54.
26. Beyenburg S, Watzka M, Clusmann H, Blumcke I, Bidlingmaier F, Elger CE, et al. Androgen receptor mRNA expression in the human hippocampus. *Neurosci Lett* 2000;294(1):25-8.

27. Bjarnason GA, Jordan RC, Wood PA, Li Q, Lincoln DW, Sothorn RB, et al. Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases. *Am J Pathol* 2001;158(5):1793-801.
28. Bjorkbacka H, Fitzgerald KA, Huet F, Li X, Gregory JA, Lee MA, et al. The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiol Genomics* 2004;19(3):319-30.
29. Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(7):2173-8.
30. Blok LJ, de Ruiter PE, Brinkmann AO. Androgen receptor phosphorylation. *Endocr Res* 1996;22(3):197-219.
31. Bo TH, Dysvik B, Jonassen I. LSImpute: accurate estimation of missing values in microarray data with least squares methods. *Nucleic Acids Res* 2004;32(3):e34.
32. Bohan SP, Troyanskaya OG, Alter O, Warnke R, Botstein D, Brown PO, et al. Variation in gene expression patterns in follicular lymphoma and the response to rituximab. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(4):1926-30.
33. Bompreszi R, Ringner M, Kim S, Bittner ML, Khan J, Chen Y, et al. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet* 2003;12(17):2191-9.
34. Branes MC, Morales B, Rios M, Villalon MJ. Regulation of the immunoexpression of aquaporin 9 by ovarian hormones in the rat oviductal epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288(5):C1048-57.
35. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001;29(4):365-71.
36. Brazma A, Parkinson H, Sarkans U, Shojatalab M, Vilo J, Abeygunawardena N, et al. ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI. *Nucleic Acids Res* 2003;31(1):68-71.
37. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 2004;5(7):509-21.
38. Breuninger LM, Dempsey WL, Uhl J, Murasko DM. Hydrocortisone regulation of interleukin-6 protein production by a purified population of human peripheral blood monocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;69(2):205-14.
39. Brinkmann A, Jenster G, Ris-Stalpers C, van der Korput H, Bruggenwirth H, Boehmer A, et al. Molecular basis of androgen insensitivity. *Steroids* 1996;61(4):172-5.
40. Broberg P. Statistical methods for ranking differentially expressed genes. *Genome Biol* 2003;4(6):R41.
41. Brodsky L, Leontovich A, Shtutman M, Feinstein E. Identification and handling of artifactual gene expression profiles emerging in microarray hybridization experiments. *Nucleic Acids Res* 2004;32(4):e46.
42. Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, et al. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 1989;44(2):264-9.
43. Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 1999;21(1 Suppl):33-7.
44. Brown JS, Kuhn D, Wisser R, Power E, Schnell R. Quantification of sources of variation and accuracy of sequence discrimination in a replicated microarray experiment. *Biotechniques* 2004;36(2):324-32.
45. Burczynski ME, Twine NC, Dukart G, Marshall B, Hidalgo M, Stadler WM, et al. Transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells prognostic of clinical outcomes in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(3):1181-9.
46. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25(2):169-93.
47. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004;15(3):155-66.
48. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 2005;434(7031):400-4.
49. Carter SL, Eklund AC, Mecham BH, Kohane IS, Szallasi Z. Redefinition of Affymetrix probe sets by sequence overlap with cDNA microarray probes reduces cross-platform inconsistencies in cancer-associated gene expression measurements. *BMC Bioinformatics* 2005;6(1):107.

50. Carvalho AF, Neves EJ, Hirata Junior R, Reis LF. Glass slide-based agarose gel electrophoresis for determining the efficiency of RNA amplification and cyanine dye incorporation during RNA labeling. *Biotechniques* 2003;35(4):688-90, 692.
51. Castoria G, Lombardi M, Barone MV, Bilancio A, Di Domenico M, Bottero D, et al. Androgen-stimulated DNA synthesis and cytoskeletal changes in fibroblasts by a nontranscriptional receptor action. *J Cell Biol* 2003;161(3):547-56.
52. Chan WY. Molecular genetic, biochemical, and clinical implications of gonadotropin receptor mutations. *Mol Genet Metab* 1998;63(2):75-84.
53. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(20):12877-82.
54. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 2004;10(1):33-9.
55. Cherepinsky V, Feng J, Rejali M, Mishra B. Shrinkage-based similarity metric for cluster analysis of microarray data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;5:5.
56. Chou CC, Chen CH, Lee TT, Peck K. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. *Nucleic Acids Res* 2004;32(12):e99.
57. Chung HJ, Kim M, Park CH, Kim J, Kim JH. ArrayXPath: mapping and visualizing microarray gene-expression data with integrated biological pathway resources using Scalable Vector Graphics. *Nucleic Acids Res* 2004;32(Web Server issue):W460-4.
58. Churchill GA. Using ANOVA to analyze microarray data. *Biotechniques* 2004;37(2):173-5, 177.
59. Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, et al. Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;76(1-5):23-30.
60. Claustres M, Sultan C. Androgen and erythropoiesis: evidence for an androgen receptor in erythroblasts from human bone marrow cultures. *Horm Res* 1988;29(1):17-22.
61. Clay-Farrace L, Pelizon C, Santamaria D, Pines J, Laskey RA. Human replication protein Cdc6 prevents mitosis through a checkpoint mechanism that implicates Chk1. *Embo J* 2003;22(3):704-12.
62. Cleutjens CB, Steketee K, van Eekelen CC, van der Korput JA, Brinkmann AO, Trapman J. Both androgen receptor and glucocorticoid receptor are able to induce prostate-specific antigen expression, but differ in their growth-stimulating properties of LNCaP cells. *Endocrinology* 1997;138(12):5293-300.
63. Cohen C, Lawson D, DeRose PB. Sex and androgenic steroid receptor expression in hepatic adenomas. *Hum Pathol* 1998;29(12):1428-32.
64. Cohen-Kettenis PT. Gender change in 46,XY persons with 5alpha-reductase-2 deficiency and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency. *Arch Sex Behav* 2005;34(4):399-410.
65. Collaer ML, Hines M. Human behavioral sex differences: a role for gonadal hormones during early development? *Psychol Bull* 1995;118(1):55-107.
66. Creery D, Angel JB, Aucoin S, Weiss W, Cameron WD, Diaz-Mitoma F, et al. Nef protein of human immunodeficiency virus and lipopolysaccharide induce expression of CD14 on human monocytes through differential utilization of interleukin-10. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(6):1212-21.
67. Creighton CJ, Cordero KE, Larios JM, Miller RS, Johnson MD, Chinnaiyan AM, et al. Genes regulated by estrogen in breast tumor cells in vitro are similarly regulated in vivo in tumor xenografts and human breast tumors. *Genome Biol* 2006;7(4):R28.
68. Crew AJ, Clark J, Fisher C, Gill S, Grimer R, Chand A, et al. Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *Embo J* 1995;14(10):2333-40.
69. Cui X, Churchill GA. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol* 2003;4(4):210.
70. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, et al. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 1994;54(20):5474-8.
71. Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Steiner H, Hobisch A. Androgen receptors in prostate cancer. *J Urol* 2003;170(4 Pt 1):1363-9.
72. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Barone A, Sulli A, Coviello DA, et al. Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(2):820-7.
73. Czeisler CA, Klerman EB. Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. *Recent Prog Horm Res* 1999;54:97-130; discussion 130-2.

74. Davenport JW, Fernandes ER, Harris LD, Neale GA, Goorha R. The mouse mitotic checkpoint gene *bub1b*, a novel *bub1* family member, is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Genomics* 1999;55(1):113-7.
75. de Longueville F, Surry D, Meneses-Lorente G, Bertholet V, Talbot V, Evrard S, et al. Gene expression profiling of drug metabolism and toxicology markers using a low-density DNA microarray. *Biochem Pharmacol* 2002;64(1):137-49.
76. de Longueville F, Atienzar FA, Marcq L, Dufrane S, Evrard S, Wouters L, et al. Use of a low-density microarray for studying gene expression patterns induced by hepatotoxicants on primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol Sci* 2003;75(2):378-92.
77. Dean N, Raftery AE. Normal uniform mixture differential gene expression detection for cDNA microarrays. *BMC Bioinformatics* 2005;6(1):173.
78. Delpedro AD, Barjavel MJ, Mamdouh Z, Bakouche O. Activation of human monocytes by LPS and DHEA. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18(2):125-35.
79. DePrimo SE, Diehn M, Nelson JB, Reiter RE, Matese J, Fero M, et al. Transcriptional programs activated by exposure of human prostate cancer cells to androgen. *Genome Biol* 2002;3(7):RESEARCH0032.
80. Dhanasekaran SM, Dash A, Yu J, Maine IP, Laxman B, Tomlins SA, et al. Molecular profiling of human prostate tissues: insights into gene expression patterns of prostate development during puberty. *Faseb J* 2005;19(2):243-5.
81. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 2004;37(1):112-4, 116, 118-9.
82. Diehl F, Grahlmann S, Beier M, Hoheisel JD. Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res* 2001;29(7):E38.
83. Diehn M, Sherlock G, Binkley G, Jin H, Matese JC, Hernandez-Boussard T, et al. SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2003;31(1):219-23.
84. Dobbin K, Simon R. Comparison of microarray designs for class comparison and class discovery. *Bioinformatics* 2002;18(11):1438-45.
85. Dobbin K, Shih JH, Simon R. Statistical design of reverse dye microarrays. *Bioinformatics* 2003;19(7):803-10.
86. Doniger SW, Salomonis N, Dahlquist KD, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR. MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data. *Genome Biol* 2003;4(1):R7. 5.
87. Draghici S, Khatri P, Shah A, Tainsky MA. Assessing the functional bias of commercial microarrays using the onto-compare database. *Biotechniques* 2003;Suppl:55-61.
88. Drews U. Sexual dimorphism in genital and brain differentiation: lessons to be learned from animal models. Abstractbook International symposium "Intersex - from Gene to Gender", Lübeck, 1.4.-3.4.2004 2004.
89. Dunmire V, Wu C, Symmans WF, Zhang W. Increased yield of total RNA from fine-needle aspirates for use in expression microarray analysis. *Biotechniques* 2002;33(4):890-2, 894, 896.
90. Dybkaer K, Zhou G, Iqbal J, Kelly D, Xiao L, Sherman S, et al. Suitability of stratagene reference RNA for analysis of lymphoid tissues. *Biotechniques* 2004;37(3):470-2, 474.
91. Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, Cao Y, Nair S, Finnell R, et al. Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(7):3010-4.
92. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002;30(1):207-10.
93. Eickhoff B, Korn B, Schick M, Poustka A, van der Bosch J. Normalization of array hybridization experiments in differential gene expression analysis. *Nucleic Acids Res* 1999;27(22):e33.
94. Ein-Dor L, Kela I, Getz G, Givol D, Domany E. Outcome signature genes in breast cancer: is there a unique set? *Bioinformatics* 2005;21(2):171-8.
95. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(25):14863-8.
96. Eisen MB, Brown PO. DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol* 1999;303:179-205.
97. Esberg LB, Zhang X, Scott GI, Culver B, Ren J. Impact of gender on basal and insulin-like growth factor I-regulated nitric oxide synthase activity in adult rat left ventricular myocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2004;138(2):141-6.
98. Etienne W, Meyer MH, Peppers J, Meyer RA, Jr. Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. *Biotechniques* 2004;36(4):618-20, 622, 624-6.
99. Evans BA, Hughes IA, Bevan CL, Patterson MN, Gregory JW. Phenotypic diversity in siblings with partial androgen insensitivity syndrome. *Arch Dis Child* 1997;76(6):529-31.

100. Fare TL, Coffey EM, Dai H, He YD, Kessler DA, Kilian KA, et al. Effects of atmospheric ozone on microarray data quality. *Anal Chem* 2003;75(17):4672-5.
101. Farjo R, Yu J, Othman MI, Yoshida S, Sheth S, Glaser T, et al. Mouse eye gene microarrays for investigating ocular development and disease. *Vision Res* 2002;42(4):463-70.
102. Feldman AL, Costouros NG, Wang E, Qian M, Marincola FM, Alexander HR, et al. Advantages of mRNA amplification for microarray analysis. *Biotechniques* 2002;33(4):906-12, 914.
103. Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 1994;78(4):713-24.
104. Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* 2000;9(8):1161-9.
105. Forster T, Costa Y, Roy D, Cooke HJ, Maratou K. Triple-target microarray experiments: a novel experimental strategy. *BMC Genomics* 2004;5(1):13.
106. Fu M, Wang C, Reutens AT, Wang J, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, et al. p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem* 2000;275(27):20853-60.
107. Fuller PJ. The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *Faseb J* 1991;5(15):3092-9.
108. Futschik M, Crompton T. Model selection and efficiency testing for normalization of cDNA microarray data. *Genome Biol* 2004;5(8):R60.
109. Gau JT, Salter RD, Krill D, Grove ML, Becich MJ. The biosynthesis and secretion of prostate-specific antigen in LNCaP cells. *Cancer Res* 1997;57(17):3830-4.
110. Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, et al. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet* 1994;7(1):34-9.
111. Getz G, Levine E, Domany E. Coupled two-way clustering analysis of gene microarray data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(22):12079-84.
112. Ghali SA, Gottlieb B, Lumbroso R, Beitel LK, Elhaji Y, Wu J, et al. The use of androgen receptor amino/carboxyl-terminal interaction assays to investigate androgen receptor gene mutations in subjects with varying degrees of androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2185-93.
113. Gmuender H. Perspectives and challenges for DNA microarrays in drug discovery and development. *Biotechniques* 2002;32(1):152-4, 156, 158.
114. Goff LA, Bowers J, Schwalm J, Howerton K, Getts RC, Hart RP. Evaluation of sense-strand mRNA amplification by comparative quantitative PCR. *BMC Genomics* 2004;5(1):76.
115. Golan T, Yaniv A, Bafico A, Liu G, Gazit A. The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade. *J Biol Chem* 2004;279(15):14879-88.
116. Gollub J, Ball CA, Binkley G, Demeter J, Finkelstein DB, Hebert JM, et al. The Stanford Microarray Database: data access and quality assessment tools. *Nucleic Acids Res* 2003;31(1):94-6.
117. Gorreta F, Barzaghi D, VanMeter AJ, Chandhoke V, Del Giacco L. Development of a new reference standard for microarray experiments. *Biotechniques* 2004;36(6):1002-9.
118. Gottlieb B, Lehvaslaiho H, Beitel LK, Lumbroso R, Pinsky L, Trifiro M. The Androgen Receptor Gene Mutations Database. *Nucleic Acids Res* 1998;26(1):234-8.
119. Gottlieb B, Beitel LK, Wu JH, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat* 2004;23(6):527-33.
120. Guo N, Hawkins C, Nathans J. Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(25):9277-81.
121. Gupta P, Soyombo AA, Atashband A, Wisniewski KE, Shelton JM, Richardson JA, et al. Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(24):13566-71.
122. Halgren RG, Fielden MR, Fong CJ, Zacharewski TR. Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones. *Nucleic Acids Res* 2001;29(2):582-8.
123. Hammond GL. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocr Rev* 1990;11(1):65-79.
124. Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, Crothers J, Khodabakhsh D, Pulliam BL, et al. The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(17):6092-7.
125. Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr Rev* 2003;24(4):466-87.

126. Hasegawa K, Koizumi F, Noguchi Y, Hongo A, Mizutani Y, Kodama J, et al. SSX expression in gynecological cancers and antibody response in patients. *Cancer Immun* 2004;4:16.
127. Hatfield GW, Hung SP, Baldi P. Differential analysis of DNA microarray gene expression data. *Mol Microbiol* 2003;47(4):871-7.
128. Hawkins JR. Mutational analysis of SRY in XY females. *Hum Mutat* 1993;2(5):347-50.
129. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344(8):539-48.
130. Hedenfalk IA, Ringner M, Trent JM, Borg A. Gene expression in inherited breast cancer. *Adv Cancer Res* 2002;84:1-34.
131. Hedenfalk I, Ringner M, Ben-Dor A, Yakhini Z, Chen Y, Chebil G, et al. Molecular classification of familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(5):2532-7.
132. Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, et al. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* 2000;29(3):548-50, 552-4, 556 passim.
133. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 2002;23(2):175-200.
134. Helisalmi S, Hiltunen M, Vepsalainen S, Iivonen S, Corder EH, Lehtovirta M, et al. Genetic variation in apolipoprotein D and Alzheimer's disease. *J Neurol* 2004;251(8):951-7.
135. Henshall SM, Afar DE, Hiller J, Horvath LG, Quinn DI, Rasiyah KK, et al. Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res* 2003;63(14):4196-203.
136. Herrero J, Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Mateos A, Vaquerizas JM, Santoyo J, et al. GEPAS: a web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res* 2003;31(13):3461-7.
137. Herrero J, Vaquerizas JM, Al-Shahrour F, Conde L, Mateos A, Diaz-Uriarte JS, et al. New challenges in gene expression data analysis and the extended GEPAS. *Nucleic Acids Res* 2004;32(Web Server issue):W485-91.
138. Hessner MJ, Wang X, Hulse K, Meyer L, Wu Y, Nye S, et al. Three color cDNA microarrays: quantitative assessment through the use of fluorescein-labeled probes. *Nucleic Acids Res* 2003;31(4):e14.
139. Hiley SL, Jackman J, Babak T, Trochesset M, Morris QD, Phizicky E, et al. Detection and discovery of RNA modifications using microarrays. *Nucleic Acids Res* 2005;33(1):e2.
140. Hines M. Biology of gender: The role of prenatal androgen in psychosexual development. Abstractbook International symposium "Intersex - from Gene to Gender", Lübeck, 1.4.-3.4.2004 2004.
141. Hiort O, Holterhus PM. The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol* 2000;142(2):101-10.
142. Hiort O, Reinecke S, Thyen U, Jurgensen M, Holterhus PM, Schon D, et al. Puberty in disorders of somatosexual differentiation. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003;16 Suppl 2:297-306.
143. Hiort O, Thyen U, Holterhus PM. The Basis of Gender Assignment in Disorders of Somatosexual Differentiation. *Horm Res* 2005;64 Suppl 2:18-22.
144. Holterhus PM, Wiebel J, Sinnecker GH, Bruggenwirth HT, Sippell WG, Brinkmann AO, et al. Clinical and molecular spectrum of somatic mosaicism in androgen insensitivity syndrome. *Pediatr Res* 1999;46(6):684-90.
145. Holterhus PM, Sinnecker GH, Hiort O. Phenotypic diversity and testosterone-induced normalization of mutant L712F androgen receptor function in a kindred with androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(9):3245-50.
146. Holterhus PM, Piefke S, Hiort O. Anabolic steroids, testosterone-precursors and virilizing androgens induce distinct activation profiles of androgen responsive promoter constructs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;82(4-5):269-75.
147. Holterhus PM, Hiort O, Demeter J, Brown PO, Brooks JD. Differential gene-expression patterns in genital fibroblasts of normal males and 46,XY females with androgen insensitivity syndrome: evidence for early programming involving the androgen receptor. *Genome Biol* 2003;4(6):R37.
148. Holterhus PM, Salzburg J, Werner R, Hiort O. Transactivation properties of wild-type and mutant androgen receptors in transiently transfected primary human fibroblasts. *Horm Res* 2005;63(3):152-8.
149. Holterhus PM, Werner R, Struve D, Hauffa BP, Schroeder C, Hiort O. Mutations in the amino-terminal domain of the human androgen receptor may be associated with partial androgen insensitivity and impaired transactivation in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005;113(8):457-63.
150. Holterhus PM, Werner R, Hoppe U, Bassler J, Korsch E, Ranke MB, et al. Molecular features and clinical phenotypes in androgen insensitivity syndrome in the absence and presence of androgen receptor gene mutations. *J Mol Med* 2005.

151. Hoppe U, Holterhus P, Marschke C, Hiort O. Detection of androgen receptor transcription in peripheral bloodcells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003;111:S28.
152. Hoppe U, Holterhus P, Marschke C, Hiort O. Existence of interindividual differences in 17 β -HSD-isoenzymes transcription profiles in peripheral blood cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004;112:S69.
153. Hoppe U, Holterhus PM, Wunsch L, Jocham D, Drechsler T, Thiele S, et al. Tissue-specific transcription profiles of sex steroid biosynthesis enzymes and the androgen receptor. *J Mol Med* 2006.
154. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983;43(4):1809-18.
155. Hsiao PW, Thin TH, Lin DL, Chang C. Differential regulation of testosterone vs. 5 α -dihydrotestosterone by selective androgen response elements. *Mol Cell Biochem* 2000;206(1-2):169-75.
156. Hsiao LL, Jensen RV, Yoshida T, Clark KE, Blumenstock JE, Gullans SR. Correcting for signal saturation errors in the analysis of microarray data. *Biotechniques* 2002;32(2):330-2, 334, 336.
157. Hu L, Wang J, Baggerly K, Wang H, Fuller GN, Hamilton SR, et al. Obtaining reliable information from minute amounts of RNA using cDNA microarrays. *BMC Genomics* 2002;3(1):16.
158. Hughes IA. Congenital adrenal hyperplasia: 21-hydroxylase deficiency in the newborn and during infancy. *Semin Reprod Med* 2002;20(3):229-42.
159. Iivanainen A, Sainio K, Sariola H, Tryggvason K. Primary structure and expression of a novel human laminin alpha 4 chain. *FEBS Lett* 1995;365(2-3):183-8.
160. Ikonen T, Palvimo JJ, Janne OA. Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem* 1997;272(47):29821-8.
161. Irizarry RA, Warren D, Spencer F, Kim IF, Biswal S, Frank BC, et al. Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nat Methods* 2005;2(5):345-50.
162. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 1999;283(5398):83-7.
163. Jain AN, Tokuyasu TA, Snijders AM, Segraves R, Albertson DG, Pinkel D. Fully automatic quantification of microarray image data. *Genome Res* 2002;12(2):325-32.
164. Janne M, Hogeveen KN, Deol HK, Hammond GL. Expression and regulation of human sex hormone-binding globulin transgenes in mice during development. *Endocrinology* 1999;140(9):4166-74.
165. Janne OA, Moilanen AM, Poukka H, Rouleau N, Karvonen U, Kotaja N, et al. Androgen-receptor-interacting nuclear proteins. *Biochem Soc Trans* 2000;28(4):401-5.
166. Jenssen TK, Langaas M, Kuo WP, Smith-Sorensen B, Myklebost O, Hovig E. Analysis of repeatability in spotted cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2002;30(14):3235-44.
167. Jenster G, van der Korput HA, van Vroonhoven C, van der Kwast TH, Trapman J, Brinkmann AO. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 1991;5(10):1396-404.
168. Jenster G, van der Korput JA, Trapman J, Brinkmann AO. Functional domains of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41(3-8):671-5.
169. Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO. Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem J* 1993;293 (Pt 3):761-8.
170. Jenster G, van der Korput HA, Trapman J, Brinkmann AO. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 1995;270(13):7341-6.
171. Jenster G. Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update. *Mol Cell Endocrinol* 1998;143(1-2):1-7.
172. Jung HY, Cho HG. An automatic block and spot indexing with k-nearest neighbors graph for microarray image analysis. *Bioinformatics* 2002;18 Suppl 2:S141-51.
173. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 1996;106(2):410-5.
174. Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Nakaya A. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res* 2002;30(1):42-6.
175. Kang HY, Huang KE, Chang SY, Ma WL, Lin WJ, Chang C. Differential modulation of androgen receptor-mediated transactivation by Smad3 and tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 2002;277(46):43749-56.
176. Kaposi-Novak P, Lee JS, Mikaelyan A, Patel V, Thorgeirsson SS. Oligonucleotide microarray analysis of aminoallyl-labeled cDNA targets from linear RNA amplification. *Biotechniques* 2004;37(4):580, 582-6, 588.

177. Kapushesky M, Kemmeren P, Culhane AC, Durinck S, Ihmels J, Korner C, et al. Expression Profiler: next generation--an online platform for analysis of microarray data. *Nucleic Acids Res* 2004;32(Web Server issue):W465-70.
178. Kepler TB, Crosby L, Morgan KT. Normalization and analysis of DNA microarray data by self-consistency and local regression. *Genome Biol* 2002;3(7):RESEARCH0037.
179. Killion PJ, Sherlock G, Iyer VR. The Longhorn Array Database (LAD): an open-source, MIAME compliant implementation of the Stanford Microarray Database (SMD). *BMC Bioinformatics* 2003;4:32.
180. Kim CJ, Reintgen DS, Yeatman TJ. The promise of microarray technology in melanoma care. *Cancer Control* 2002;9(1):49-53.
181. Kim S, Kim T. Selection of optimal internal controls for gene expression profiling of liver disease. *Biotechniques* 2003;35(3):456-8, 460.
182. Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, Nagura H. Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem* 1993;41(5):671-8.
183. Klein TJ, Mlodzik M. A conserved signaling cassette regulates hair patterning from Drosophila to man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(25):9173-4.
184. Knudsen S, Workman C, Sicheritz-Ponten T, Friis C. GenePublisher: automated analysis of DNA microarray data. *Nucleic Acids Res* 2003;31(13):3471-6.
185. Kokocinski F, Wrobel G, Hahn M, Lichter P. QuickLIMS: facilitating the data management for DNA-microarray fabrication. *Bioinformatics* 2003;19(2):283-4.
186. Korn EL, Habermann JK, Upender MB, Ried T, McShane LM. Objective method of comparing DNA microarray image analysis systems. *Biotechniques* 2004;36(6):960-7.
187. Kote-Jarai Z, Williams RD, Cattini N, Copeland M, Giddings I, Wooster R, et al. Gene expression profiling after radiation-induced DNA damage is strongly predictive of BRCA1 mutation carrier status. *Clin Cancer Res* 2004;10(3):958-63.
188. Kremer H, Kraaij R, Toledo SP, Post M, Fridman JB, Hayashida CY, et al. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. *Nat Genet* 1995;9(2):160-4.
189. Kuhnle U, Lindl U, Keller U, Armanini D, Meurer M, Baur S. Androgen binding sites in peripheral human mononuclear leukocytes of healthy males and females. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;48(4):403-8.
190. Lage JM, Hamann S, Gribanov O, Leamon JH, Pejovic T, Lizardi PM. Microgel assessment of nucleic acid integrity and labeling quality in microarray experiments. *Biotechniques* 2002;32(2):312-4.
191. Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(3):811-6.
192. Larkin JE, Frank BC, Gavras H, Sultana R, Quackenbush J. Independence and reproducibility across microarray platforms. *Nat Methods* 2005;2(5):337-44.
193. Laudet V, Gronemeyer H. *The Nuclear Receptor FactsBook*. 1 ed. London: Academic Press; 2002.
194. Lausted C, Dahl T, Warren C, King K, Smith K, Johnson M, et al. POSaM: a fast, flexible, open-source, inkjet oligonucleotide synthesizer and microarrayer. *Genome Biol* 2004;5(8):R58.
195. Lee KH, Song GJ, Kang IS, Kim SW, Paick JS, Chung CH, et al. Ubiquitin-specific protease activity of USP9Y, a male infertility gene on the Y chromosome. *Reprod Fertil Dev* 2003;15(1-2):129-33.
196. Li X, Rao S, Wang Y, Gong B. Gene mining: a novel and powerful ensemble decision approach to hunting for disease genes using microarray expression profiling. *Nucleic Acids Res* 2004;32(9):2685-94.
197. Lin KK, Chudova D, Hatfield GW, Smyth P, Andersen B. Identification of hair cycle-associated genes from time-course gene expression profile data by using replicate variance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(45):15955-60.
198. Linja MJ, Porkka KP, Kang Z, Savinainen KJ, Janne OA, Tammela TL, et al. Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(3):1032-40.
199. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
200. Lottspeich F, Zorbach H. *Bioanalytik*. 1 ed. Heidelberg, Berlin; 1998.
201. Loveland KL, Hogarth C, Szczepny A, Prabhu SM, Jans DA. Expression of Nuclear Transport Importins beta 1 and beta 3 Is Regulated During Rodent Spermatogenesis. *Biol Reprod* 2005.

202. Lu ML, Schneider MC, Zheng Y, Zhang X, Richie JP. Caveolin-1 interacts with androgen receptor. A positive modulator of androgen receptor mediated transactivation. *J Biol Chem* 2001;276(16):13442-51.
203. Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon CJ, Wilson EM, et al. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(23):9534-8.
204. Ma XT, Zhang XJ, Zhang B, Geng YQ, Lin YM, Li G, et al. Expression and regulation of interleukin-23 subunits in human peripheral blood mononuclear cells and hematopoietic cell lines in response to various inducers. *Cell Biol Int* 2004;28(10):689-97.
205. Marko NF, Frank B, Quackenbush J, Lee NH. A robust method for the amplification of RNA in the sense orientation. *BMC Genomics* 2005;6(1):27.
206. Masseroli M, Martucci D, Pinciroli F. GFINDER: Genome Function INtegrated Discoverer through dynamic annotation, statistical analysis, and mining. *Nucleic Acids Res* 2004;32(Web Server issue):W293-300.
207. McCrohon JA, Death AK, Nakhla S, Jessup W, Handelsman DJ, Stanley KK, et al. Androgen receptor expression is greater in macrophages from male than from female donors. A sex difference with implications for atherogenesis. *Circulation* 2000;101(3):224-6.
208. McEwan IJ. *Essays in Biochemistry. The Nuclear Receptor Family*. Portland Press 2004:27-39.
209. McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69(1-6):3-12.
210. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999;20(3):321-44.
211. Meyer-Bahlburg HF. Gender identity outcome in female-raised 46,XY persons with penile agenesis, cloacal exstrophy of the bladder, or penile ablation. *Arch Sex Behav* 2005;34(4):423-38.
212. Michiels S, Koscielny S, Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 2005;365(9458):488-92.
213. Migeon CJ, Wisniewski AB, Gearhart JP, Meyer-Bahlburg HF, Rock JA, Brown TR, et al. Ambiguous genitalia with perineoscrotal hypospadias in 46,XY individuals: long-term medical, surgical, and psychosexual outcome. *Pediatrics* 2002;110(3):e31.
214. Migeon CJ, Wisniewski AB, Brown TR, Rock JA, Meyer-Bahlburg HF, Money J, et al. 46,XY intersex individuals: phenotypic and etiologic classification, knowledge of condition, and satisfaction with knowledge in adulthood. *Pediatrics* 2002;110(3):e32.
215. Miller CJ, Kassem HS, Pepper SD, Hey Y, Ward TH, Margison GP. Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles. *Biotechniques* 2003;35(4):812-4.
216. Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* 2004;5(9):R68.
217. Miyagi M, Morishita M, Iwamoto Y. Effects of sex hormones on production of prostaglandin E2 by human peripheral monocytes. *J Periodontol* 1993;64(11):1075-8.
218. Moilanen AM, Karvonen U, Poukka H, Yan W, Toppari J, Janne OA, et al. A testis-specific androgen receptor coregulator that belongs to a novel family of nuclear proteins. *J Biol Chem* 1999;274(6):3700-4.
219. Morishita M, Miyagi M, Iwamoto Y. Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes. *J Periodontol* 1999;70(7):757-60.
220. Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol* 1994;153(6):2671-80.
221. Mund C, Beier V, Bewerunge P, Dahms M, Lyko F, Hoheisel JD. Array-based analysis of genomic DNA methylation patterns of the tumour suppressor gene p16INK4A promoter in colon carcinoma cell lines. *Nucleic Acids Res* 2005;33(8):e73.
222. Nagai T, Chapman WH, Jr. Analysis of microliter volumes of dye-labeled nucleic acids. *Biotechniques* 2002;32(2):356-8, 360, 362, 364.
223. Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(3):1503-8.
224. Nessler-Menardi C, Jotova I, Culig Z, Eder IE, Putz T, Bartsch G, et al. Expression of androgen receptor coregulatory proteins in prostate cancer and stromal-cell culture models. *Prostate* 2000;45(2):124-31.

225. Netea MG, Kullberg BJ, Demacker PN, Jacobs LE, Verver-Jansen TJ, Hijmans A, et al. Native LDL potentiate TNF alpha and IL-8 production by human mononuclear cells. *J Lipid Res* 2002;43(7):1065-71.
226. Niermann GL, Watson GL. Growth hormone and insulin-like growth factor-I enhance beta-glucuronidase gene activation by androgen in mouse kidney. *Mol Cell Endocrinol* 1999;153(1-2):47-55.
227. Nitsch SM, Wittmann F, Angele P, Wichmann MW, Hatz R, Hernandez-Richter T, et al. Physiological levels of 5 alpha-dihydrotestosterone depress wound immune function and impair wound healing following trauma-hemorrhage. *Arch Surg* 2004;139(2):157-63.
228. Nitsche EM, Hiort O. The molecular basis of androgen insensitivity. *Horm Res* 2000;54(5-6):327-33.
229. Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Tachikawa M, Toda T, et al. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 2003;12(6):595-600.
230. Nonaka H, Emoto N, Ikeda K, Fukuya H, Rohman MS, Raharjo SB, et al. Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2001;104(15):1746-8.
231. Novoradovskaya N, Whitfield ML, Basehore LS, Novoradovsky A, Pesich R, Usary J, et al. Universal Reference RNA as a standard for microarray experiments. *BMC Genomics* 2004;5(1):20.
232. Ojaniemi H, Evengard B, Lee DR, Unger ER, Vernon SD. Impact of RNA extraction from limited samples on microarray results. *Biotechniques* 2003;35(5):968-73.
233. Olsen NJ, Olson G, Viselli SM, Gu X, Kovacs WJ. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology* 2001;142(3):1278-83.
234. Ortmann O, Sturm R, Knuppen R, Emons G. Weak estrogenic activity of phenol red in the pituitary gonadotroph: re-evaluation of estrogen and antiestrogen effects. *J Steroid Biochem* 1990;35(1):17-22.
235. Pabon C, Modrusan Z, Ruvolo MV, Coleman IM, Daniel S, Yue H, et al. Optimized T7 amplification system for microarray analysis. *Biotechniques* 2001;31(4):874-9.
236. Parisi M, Nuttall R, Edwards P, Minor J, Naiman D, Lu J, et al. A survey of ovary-, testis-, and soma-biased gene expression in *Drosophila melanogaster* adults. *Genome Biol* 2004;5(6):R40.
237. Parkinson H, Sarkans U, Shojatalab M, Abeygunawardena N, Contrino S, Coulson R, et al. ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI. *Nucleic Acids Res* 2005;33(Database issue):D553-5.
238. Pavey S, Johansson P, Packer L, Taylor J, Stark M, Pollock PM, et al. Microarray expression profiling in melanoma reveals a BRAF mutation signature. *Oncogene* 2004;23(23):4060-7.
239. Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 1996;379(6561):131-7.
240. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(16):9212-7.
241. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747-52.
242. Pertoff H, Johnsson A, Warmegard B, Seljelid R. Separation of human monocytes on density gradients of Percoll. *J Immunol Methods* 1980;33(3):221-9.
243. Petalidis L, Bhattacharyya S, Morris GA, Collins VP, Freeman TC, Lyons PA. Global amplification of mRNA by template-switching PCR: linearity and application to microarray analysis. *Nucleic Acids Res* 2003;31(22):e142.
244. Petersen D, Chandramouli GV, Geoghegan J, Hilburn J, Paarlberg J, Kim CH, et al. Three microarray platforms: an analysis of their concordance in profiling gene expression. *BMC Genomics* 2005;6(1):63.
245. Petre CE, Wetherill YB, Danielsen M, Knudsen KE. Cyclin D1: mechanism and consequence of androgen receptor co-repressor activity. *J Biol Chem* 2002;277(3):2207-15.
246. Petre-Draviam CE, Williams EB, Burd CJ, Gladden A, Moghadam H, Meller J, et al. A central domain of cyclin D1 mediates nuclear receptor corepressor activity. *Oncogene* 2005;24(3):431-44.
247. Pinsky L, Kaufman M, Lambert B, Faucher G, Rosenfeld R. Male pseudohermaphroditism: diagnosis in cell culture. *Can Med Assoc J* 1977;116(11):1274-5.
248. Poindexter NJ, Walch ET, Chada S, Grimm EA. Cytokine induction of interleukin-24 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol* 2005;78(3):745-52.
249. Polan ML, Daniele A, Kuo A. Gonadal steroids modulate human monocyte interleukin-1 (IL-1) activity. *Fertil Steril* 1988;49(6):964-8.

250. Prader A. [Genital findings in the female pseudo-hermaphroditism of the congenital adrenogenital syndrome; morphology, frequency, development and heredity of the different genital forms.]. *Helv Paediatr Acta* 1954;9(3):231-48.
251. Puskas LG, Zvara A, Hackler L, Jr., Van Hummelen P. RNA amplification results in reproducible microarray data with slight ratio bias. *Biotechniques* 2002;32(6):1330-4, 1336, 1338, 1340.
252. Qi H, Labrie Y, Grenier J, Fournier A, Fillion C, Labrie C. Androgens induce expression of SPAK, a STE20/SPS1-related kinase, in LNCaP human prostate cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001;182(2):181-92.
253. Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* 2001;2(6):418-27.
254. Rahman MM, Miyamoto H, Lardy H, Chang C. Inactivation of androgen receptor coregulator ARA55 inhibits androgen receptor activity and agonist effect of antiandrogens in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(9):5124-9.
255. Rajendran KG, Lopez T, Parikh I. Estrogenic effect of phenol red in MCF-7 cells is achieved through activation of estrogen receptor by interacting with a site distinct from the steroid binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;142(3):724-31.
256. Reid J, Betney R, Watt K, McEwan IJ. The androgen receptor transactivation domain: the interplay between protein conformation and protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 5):1042-6.
257. Richards AJ, al-Imara L, Carter NP, Lloyd JC, Leversha MA, Pope FM. Localization of the gene (LAMA4) to chromosome 6q21 and isolation of a partial cDNA encoding a variant laminin A chain. *Genomics* 1994;22(1):237-9.
258. Richmond T, Somerville S. Chasing the dream: plant EST microarrays. *Curr Opin Plant Biol* 2000;3(2):108-16.
259. Richter A, Schwager C, Hentze S, Ansorge W, Hentze MW, Muckenthaler M. Comparison of fluorescent tag DNA labeling methods used for expression analysis by DNA microarrays. *Biotechniques* 2002;33(3):620-8, 630.
260. Richter-Appelt H, Discher C, Gedrose B. Gender identity and recalled gender related childhood play-behaviour in adult individuals with different forms of intersexuality. *Anthropol Anz* 2005;63(3):241-56.
261. Richter-Unruh A, Martens JW, Verhoef-Post M, Wessels HT, Kors WA, Sinnecker GH, et al. Leydig cell hypoplasia: cases with new mutations, new polymorphisms and cases without mutations in the luteinizing hormone receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;56(1):103-12.
262. Richter-Unruh A, Verhoef-Post M, Malak S, Homoki J, Hauffa BP, Themmen AP. Leydig cell hypoplasia: absent luteinizing hormone receptor cell surface expression caused by a novel homozygous mutation in the extracellular domain. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(10):5161-7.
263. Richter-Unruh A, Korsch E, Hiort O, Holterhus PM, Themmen AP, Wudy SA. Novel insertion frameshift mutation of the LH receptor gene: problematic clinical distinction of Leydig cell hypoplasia from enzyme defects primarily affecting testosterone biosynthesis. *Eur J Endocrinol* 2005;152(2):255-9.
264. Rieger KE, Hong WJ, Tusher VG, Tang J, Tibshirani R, Chu G. Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(17):6635-40.
265. Rivest RW, Schulz P, Lustenberger S, Sizonenko PC. Differences between circadian and ultradian organization of cortisol and melatonin rhythms during activity and rest. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68(4):721-9.
266. Rodien P, Mebarki F, Mowszowicz I, Chaussain JL, Young J, Morel Y, et al. Different phenotypes in a family with androgen insensitivity caused by the same M780I point mutation in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(8):2994-8.
267. Romualdi C, Trevisan S, Celegato B, Costa G, Lanfranchi G. Improved detection of differentially expressed genes in microarray experiments through multiple scanning and image integration. *Nucleic Acids Res* 2003;31(23):e149.
268. Ruan Y, Gilmore J, Conner T. Towards Arabidopsis genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *Plant J* 1998;15(6):821-33.
269. Rubin MA, Varambally S, Beroukhi R, Tomlins SA, Rhodes DR, Paris PL, et al. Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64(11):3814-22.
270. Rubins KH, Hensley LE, Jahrling PB, Whitney AR, Geisbert TW, Huggins JW, et al. The host response to smallpox: analysis of the gene expression program in peripheral blood cells in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(42):15190-5.
271. Ruizeveld de Winter JA, Trapman J, Vermey M, Mulder E, Zegers ND, van der Kwast TH. Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 1991;39(7):927-36.

272. Sader MA, McGrath KC, Hill MD, Bradstock KF, Jimenez M, Handelsman DJ, et al. Androgen receptor gene expression in leucocytes is hormonally regulated: implications for gender differences in disease pathogenesis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62(1):56-63.
273. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
274. Sato T, Matsumoto T, Kawano H, Watanabe T, Uematsu Y, Sekine K, et al. Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(6):1673-8.
275. Schageman JJ, Basit M, Gallardo TD, Garner HR, Shohet RV. MarC-V: a spreadsheet-based tool for analysis, normalization, and visualization of single cDNA microarray experiments. *Biotechniques* 2002;32(2):338-40, 342, 344.
276. Schaner ME, Ross DT, Ciaravino G, Sorlie T, Troyanskaya O, Diehn M, et al. Gene expression patterns in ovarian carcinomas. *Mol Biol Cell* 2003;14(11):4376-86.
277. Schaupp CJ, Jiang G, Myers TG, Wilson MA. Active mixing during hybridization improves the accuracy and reproducibility of microarray results. *Biotechniques* 2005;38(1):117-9.
278. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270(5235):467-70.
279. Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(20):10614-9.
280. Scherer A, Krause A, Walker JR, Sutton SE, Seron D, Raulf F, et al. Optimized protocol for linear RNA amplification and application to gene expression profiling of human renal biopsies. *Biotechniques* 2003;34(3):546-50, 552-4, 556.
281. Schlingemann J, Thuerigen O, Itrich C, Toedt G, Kramer H, Hahn M, et al. Effective transcriptome amplification for expression profiling on sense-oriented oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res* 2005;33(3):e29.
282. Schlott T, Ahrens K, Ruschenburg I, Reimer S, Hartmann H, Droese M. Different gene expression of MDM2, GAGE-1, -2 and FHIT in hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia. *Br J Cancer* 1999;80(1-2):73-8.
283. Schuchhardt J, Beule D, Malik A, Wolski E, Eickhoff H, Lehrach H, et al. Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2000;28(10):E47.
284. Segawa T, Nau ME, Xu LL, Chilukuri RN, Makarem M, Zhang W, et al. Androgen-induced expression of endoplasmic reticulum (ER) stress response genes in prostate cancer cells. *Oncogene* 2002;21(57):8749-58.
285. Serra Diaz C, Vizoso F, Lamelas ML, Rodriguez JC, Gonzalez LO, Baltasar A, et al. Expression and clinical significance of apolipoprotein D in male breast cancer and gynaecomastia. *Br J Surg* 1999;86(9):1190-7.
286. Shaffer PL, Jivan A, Dollins DE, Claessens F, Gewirth DT. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(14):4758-63.
287. Sharov V, Kwong KY, Frank B, Chen E, Hasseman J, Gaspard R, et al. The limits of log-ratios. *BMC Biotechnol* 2004;4(1):3.
288. Shatkina L, Mink S, Rogatsch H, Klocker H, Langer G, Nestl A, et al. The cochaperone Bag-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor. *Mol Cell Biol* 2003;23(20):7189-97.
289. Shenk JL, Fisher CJ, Chen SY, Zhou XF, Tillman K, Shemshedini L. p53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction. *J Biol Chem* 2001;276(42):38472-9.
290. Sherlock G, Hernandez-Boussard T, Kasarskis A, Binkley G, Matese JC, Dwight SS, et al. The Stanford Microarray Database. *Nucleic Acids Res* 2001;29(1):152-5.
291. Sherlock G. Of fish and chips. *Nat Methods* 2005;2(5):329-30.
292. Shyamsundar R, Kim YH, Higgins JP, Montgomery K, Jordan M, Sethuraman A, et al. A DNA microarray survey of gene expression in normal human tissues. *Genome Biol* 2005;6(3):R22.
293. Simental JA, Sar M, Lane MV, French FS, Wilson EM. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 1991;266(1):510-8.
294. Sinnecker GH, Hiort O, Nitsche EM, Holterhus PM, Kruse K. Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group. *Eur J Pediatr* 1997;156(1):7-14.
295. Sood R, Zehnder JL, Druzin ML, Brown PO. Gene expression patterns in human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(14):5478-83.
296. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(19):10869-74.

297. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(14):8418-23.
298. Sotiriou C, Powles TJ, Dowsett M, Jazaeri AA, Feldman AL, Assersohn L, et al. Gene expression profiles derived from fine needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002;4(3):R3.
299. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(4):262-72.
300. Spellman PT, Miller M, Stewart J, Troup C, Sarkans U, Chervitz S, et al. Design and implementation of microarray gene expression markup language (MAGE-ML). *Genome Biol* 2002;3(9):RESEARCH0046.
301. Spruessel A, Steimann G, Jung M, Lee SA, Carr T, Fentz AK, et al. Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques* 2004;36(6):1030-7.
302. Staal YC, van Herwijnen MH, van Schooten FJ, van Delft JH. Application of four dyes in gene expression analyses by microarrays. *BMC Genomics* 2005;6:101.
303. Stahlberg A, Kubista M, Pfaffl M. Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clin Chem* 2004;50(9):1678-80.
304. Steinman L, Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2003;3(6):483-92.
305. Sterrenburg E, Turk R, Boer JM, van Ommen GB, den Dunnen JT. A common reference for cDNA microarray hybridizations. *Nucleic Acids Res* 2002;30(21):e116.
306. Sthoeger ZM, Chiorazzi N, Lahita RG. Regulation of the immune response by sex hormones. I. In vitro effects of estradiol and testosterone on pokeweed mitogen-induced human B cell differentiation. *J Immunol* 1988;141(1):91-8.
307. Sturzebecher S, Wandinger KP, Rosenwald A, Sathyamoorthy M, Tzou A, Mattar P, et al. Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 2003;126(Pt 6):1419-29.
308. Suarez-Farinas M, Noggle S, Heke M, Hemmati-Brivanlou A, Magnasco MO. Comparing independent microarray studies: the case of human embryonic stem cells. *BMC Genomics* 2005;6:99.
309. Sultan C, Paris F, Jeandel C, Lumbroso S, Galifer RB. Ambiguous genitalia in the newborn. *Semin Reprod Med* 2002;20(3):181-8.
310. Surmacz E, Bartucci M. Role of estrogen receptor alpha in modulating IGF-I receptor signaling and function in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2004;23(3):385-94.
311. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 2000;29(2):332-7.
312. t Hoen PA, de Kort F, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Fluorescent labelling of cRNA for microarray applications. *Nucleic Acids Res* 2003;31(5):e20.
313. Takahashi HK, Morichika T, Iwagaki H, Tamura R, Kubo S, Yoshino T, et al. Histamine downregulates CD14 expression via H2 receptors on human monocytes. *Clin Immunol* 2003;108(3):274-81.
314. Takeda H, Chodak G, Mutchnik S, Nakamoto T, Chang C. Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. *J Endocrinol* 1990;126(1):17-25.
315. Tan JA, Hall SH, Petrusz P, French FS. Thyroid receptor activator molecule, TRAM-1, is an androgen receptor coactivator. *Endocrinology* 2000;141(9):3440-50.
316. Tan J, Hall SH, Hamil KG, Grossman G, Petrusz P, Liao J, et al. Protein inhibitor of activated STAT-1 (signal transducer and activator of transcription-1) is a nuclear receptor coregulator expressed in human testis. *Mol Endocrinol* 2000;14(1):14-26.
317. Tarsi-Tsuk D, Levy R. Stimulation of the respiratory burst in peripheral blood monocytes by lipoteichoic acid. The involvement of calcium ions and phospholipase A2. *J Immunol* 1990;144(7):2665-70.
318. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999;75(2-3):291-5.
319. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 2003;13(9):2129-41.
320. Thyen U, Richter-Appelt H, Wiesemann C, Holterhus PM, Hiort O. Deciding on gender in children with intersex conditions: considerations and controversies. *Treat Endocrinol* 2005;4(1):1-8.

321. Trapman J, Klaassen P, Kuiper GG, van der Korput JA, Faber PW, van Rooij HC, et al. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;153(1):241-8.
322. Troyanskaya O, Cantor M, Sherlock G, Brown P, Hastie T, Tibshirani R, et al. Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics* 2001;17(6):520-5.
323. Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 1993;14(4):459-79.
324. Tsang LL, Chan LN, Liu CQ, Chan HC. Effect of phenol red and steroid hormones on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse endometrial epithelial cells. *Cell Biol Int* 2001;25(10):1021-4.
325. Tseng GC, Oh MK, Rohlin L, Liao JC, Wong WH. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res* 2001;29(12):2549-57.
326. Tu IP, Schaner M, Diehn M, Sikic BI, Brown PO, Botstein D, et al. A method for detecting and correcting feature misidentification on expression microarrays. *BMC Genomics* 2004;5(1):64.
327. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(9):5116-21.
328. Ueda HR, Matsumoto A, Kawamura M, Iino M, Tanimura T, Hashimoto S. Genome-wide transcriptional orchestration of circadian rhythms in *Drosophila*. *J Biol Chem* 2002;277(16):14048-52.
329. Ueda HR, Chen W, Minami Y, Honma S, Honma K, Iino M, et al. Molecular-timetable methods for detection of body time and rhythm disorders from single-time-point genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(31):11227-32.
330. Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Nata M, Funato T, Okamura K. Complete XY gonadal dysgenesis and aspects of the SRY genotype and gonadal tumor formation. *J Hum Genet* 2002;47(6):279-84.
331. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415(6871):530-6.
332. Van Der Pouw Kraan TC, Van Gaalen FA, Huizinga TW, Pieterman E, Breedveld FC, Verweij CL. Discovery of distinctive gene expression profiles in rheumatoid synovium using cDNA microarray technology: evidence for the existence of multiple pathways of tissue destruction and repair. *Genes Immun* 2003;4(3):187-96.
333. Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(5):1663-7.
334. van Hijum SA, de Jong A, Baerends RJ, Karsens HA, Kramer NE, Larsen R, et al. A generally applicable validation scheme for the assessment of factors involved in reproducibility and quality of DNA-microarray data. *BMC Genomics* 2005;6(1):77.
335. Vanderschueren D, Vandendput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocr Rev* 2004;25(3):389-425.
336. Vaquerizas JM, Conde L, Yankilevich P, Cabezon A, Minguez P, Diaz-Uriarte R, et al. GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2005;33(Web Server issue):W616-20.
337. Vawter MP, Evans S, Choudary P, Tomita H, Meador-Woodruff J, Molnar M, et al. Gender-specific gene expression in post-mortem human brain: localization to sex chromosomes. *Neuropsychopharmacology* 2004;29(2):373-84.
338. Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol* 2000;18(4):457-9.
339. Wang J, Hu L, Hamilton SR, Coombes KR, Zhang W. RNA amplification strategies for cDNA microarray experiments. *Biotechniques* 2003;34(2):394-400.
340. Wang J, Hoshijima M, Lam J, Zhou Z, Jokiel A, Dalton ND, et al. Cardiomyopathy associated with microcirculation dysfunction in laminin alpha 4 chain deficient mice. *J Biol Chem* 2005.
341. Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* 2000;2(3):143-7.
342. Watts JA, Morley M, Burdick JT, Fiori JL, Ewens WJ, Spielman RS, et al. Gene expression phenotype in heterozygous carriers of ataxia telangiectasia. *Am J Hum Genet* 2002;71(4):791-800.
343. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12319-24.

344. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, et al. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(4):1896-901.
345. Wildsmith SE, Archer GE, Winkley AJ, Lane PW, Bugelski PJ. Maximization of signal derived from cDNA microarrays. *Biotechniques* 2001;30(1):202-6, 208.
346. Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev* 1993;14(5):577-93.
347. Wong HY, Burghoorn JA, Van Leeuwen M, De Ruiter PE, Schippers E, Blok LJ, et al. Phosphorylation of androgen receptor isoforms. *Biochem J* 2004;383(Pt 2):267-76.
348. Xiang CC, Chen M, Ma L, Phan QN, Inman JM, Kozhich OA, et al. A new strategy to amplify degraded RNA from small tissue samples for microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2003;31(9):E53.
349. Xiang CC, Chen M, Kozhich OA, Phan QN, Inman JM, Chen Y, et al. Probe generation directly from small numbers of cells for DNA microarray studies. *Biotechniques* 2003;34(2):386-8, 390, 392-3.
350. Xu LL, Shanmugam N, Segawa T, Sesterhenn IA, McLeod DG, Moul JW, et al. A novel androgen-regulated gene, PMEPA1, located on chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate. *Genomics* 2000;66(3):257-63.
351. Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, Block GD. Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(16):10801-6.
352. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 2002;30(4):e15.
353. Yang L, Wang L, Lin HK, Kan PY, Xie S, Tsai MY, et al. Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305(3):462-9.
354. Yashiro K, Saijoh Y, Sakuma R, Tada M, Tomita N, Amano K, et al. Distinct transcriptional regulation and phylogenetic divergence of human LEFTY genes. *Genes Cells* 2000;5(5):343-57.
355. Yu J, Othman MI, Farjo R, Zareparsis S, MacNee SP, Yoshida S, et al. Evaluation and optimization of procedures for target labeling and hybridization of cDNA microarrays. *Mol Vis* 2002;8:130-7.
356. Zhang B, Schmoyer D, Kirov S, Snoddy J. GOTree Machine (GOTM): a web-based platform for interpreting sets of interesting genes using Gene Ontology hierarchies. *BMC Bioinformatics* 2004;5(1):16.
357. Zhang X, Ding L, Sandford AJ. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2005;6(1):4.
358. Zhao XY, Malloy PJ, Krishnan AV, Swami S, Navone NM, Peehl DM, et al. Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat Med* 2000;6(6):703-6.
359. Zhao H, Hastie T, Whitfield ML, Borresen-Dale AL, Jeffrey SS. Optimization and evaluation of T7 based RNA linear amplification protocols for cDNA microarray analysis. *BMC Genomics* 2002;3(1):31.

8. Anhang

8.1 Lebenslauf

Name: Jan-Hendrik Bebermeier
Geburtsdatum: 15.06.1977
Geburtsort: Hamburg

Schulbildung: von 8/1983 bis 7/1987 Grundschule (Hamburg)
von 8/1987 bis 6/1996 Gymnasium (Hamburg)
Schulabschluss: Abitur

Zivildienst: 08/1996 bis 08/1997
Pflegeabteilung vom Albertinen-Haus
Med. Geriatrische Klinik
Sellhopsweg 18
22459 Hamburg

Studium: 10/1997 bis 10/1999
Grundstudium Biologie an der Universität Hamburg
10/1999 bis 09/2001
Hauptstudium mit Schwerpunkt Molekularbiologie in HH
(+Biochemie + Mikrobiologie)
09/2001 bis 06/2002
Diplom-Arbeit in der Zellbiologie in HH bei Prof. Dr. med. Dieter Mergenhagen und Dr. rer. nat. Ralf Werner
(Etablierung der Microarray-Technologie und erste Analysen der circadian gesteuerten Genexpression bei *Chlamydomonas*)
10/2002 bis 01/2005
praktischer Teil der Promotionsarbeit zur Erlangung des Dr. rer. nat. der Biologie bei Prof. Dr. med. Olaf Hiort und Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus
Expressionsanalysen geschlechtsspezifischer Gene
DFG-Klin.-Forschergruppe „Intersex – From Gene to Gender“
Kinderklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein,
Campus Lübeck
(www.forschergruppe-intersex.de)
seit 02/2005
Anstellung bei der Eppendorf AG
Barkhausenweg 1
22339 Hamburg
Tätigkeit als Applikationsexperte für Microarrays
07/2006
Abgabe der Dissertation
16.01.2007
Disputation

Zusatzqualifikation: Sachkundenachweis nach §5 der Chemikalien-Verbots-VO
(Hamburg, 04.12.2000)
Fortbildungsveranstaltung „Scientific Writing“
(München, 10/2003)
Projektleiter/ Beauftragter für biologische Sicherheit nach §15
Gentechniksicherheitsverordnung
(Lübeck, 14.10.2003)
Schulung „GxP- und CFR 21 Part 11 für Lieferanten der

Pharmaindustrie“
(Hamburg, 17.11.2005)
Seminar „Presentation & Communication Methods in English“
(Hamburg, 28.09.2006)

Publikationen/ Poster:

Pfarr, N; Endeley, S; Schlickum, S; Steglich, C; Oswald, M; Zabel, BU; Bebermeier, JH; Winterpacht, A; Complete transcript map of the Wolf - Hirschhorn syndrome critical region (WHSCR) by comparative sequence analysis between man and mouse, expression analysis and functional studies. (2001) American Journal of Human Genetics. 69, No. 4 Supplement, 465

Ipsen, A; Bebermeier, JH; Mergenhagen, D; Werner, R. „Erste Untersuchungen zur circadianen Genexpression in *Chlamydomonas reinhardtii* mittels Microarray-Hybridisierung“. Poster auf 15. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“ vom 26.02. – 01.03.2002 in Dabringhausen

Ipsen, A; Bebermeier, JH; Mergenhagen, D; Werner, R. „Identifizierung zirkadian regulierter Gene von *Chlamydomonas reinhardtii* durch Microarray-Hybridisierung“. Poster auf 16. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen" vom 25. – 28.02.2003 in Dabringhausen

STEPS-AWARD 2003 der APE/ SPE (Köln 11-2003)
„Identification of Global Androgen Receptor Coregulator
Expression Patterns in Cultures Derived from Human Urogenital
Tissues Based on Microarray-Analysis“

Bebermeier, JH; DePrimo, SE; Brooks, JD; Hiort, O; Holterhus, PM. Microarray-analysis of global androgen receptor coregulator expression patterns in cultures derived from human urogenital tissues. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2004, 112:S2 (Vortrag auf 48. Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) in Dresden März 2004)

Bebermeier, JH; DePrimo, SE; Brooks, JD; Hiort, O; Holterhus, PM. Identification of global androgen receptor coregulator expression patterns in human urogenital tissues based on microarray analyses. (Poster auf International symposium "Intersex – from Gene to Gender", Lübeck, 1.4.-3.4.2004)

Deppe, U; Bebermeier, JH; Richter-Unruh, A; Wunsch, L; Körner, I; Meinicke, E; Hiort, O; Holterhus, P-M. Characterization of genital skin fibroblasts from AIS patients and normal male controls by cDNA-microarrays. (Poster auf 49. Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) in Münster 2005)

Bebermeier, JH; Brooks, JD; Werner, R; Deppe, U; DePrimo, SE; Demeter, J; Hiort, O; Holterhus, PM. Cell-line and tissue specific signatures of androgen receptor coregulator transcription. Manuskript accepted by Journal of Molecular Medicine in march 2006

de Longueville, F; Michiels, C; Evrard, S; Rahier, P; Bebermeier, JH; Mueller-Ibeler, J. DualChip® human RNAi side effect: Determination of

siRNA Specificity through Gene Expression Profiling. Eppendorf Application Note 110. April 2005

de Longueville, F; Michiels, C; Brasseur, M; Vanbellinghen, B; Wille, T; Bebermeier, JH. Expression profiling of Etoposide-induced Apoptosis by DualChip® human apoptosis. Eppendorf Application Note 113. April 2005

Bebermeier, JH und Pavlovic, N; Breast Cancer Microarrays – A Step towards individualized medicine; Medical Post. Vol 4. 5/2005; Git Verlag Darmstadt

Holterhus, PM; Bebermeier, JH; Werner, R; Hiort, O. Cell-line and tissue specific expression of androgen receptor coregulator transcripts; (2006) ExpClinEndocrinolDiabetes. 114

Dos Santos, S; Gancarek, E; Dufey, N; Materne, C; Bebermeier, JH; Raes, M; de Longueville, F. Inflammation-specific expression profiling of LPS-stimulated macrophages. Eppendorf Application Note 134. April 2006

Arnould, T; de Longueville, F; Marcq, L; Tejerina, S; Dufey, N; Gancarek, E; Bebermeier, JH. Gene Expression Profiling for Apoptosis Markers in Differentiated 3T3-L1 Mouse Cells Treated with TNFalpha. Eppendorf Application Note 135. Mai 2006

de Longueville, F; Bertholet, V; Brasseur, M; Marcq, L; Bebermeier, JH; Wille, T. Concordance Analysis of two Microarray Platforms: Eppendorf DualChip® and Affymetrix GeneChip®. Poster auf 5. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Chipdiagnostik in Tutzing/ Starnberger See. 11./12. Mai 2006

Marcq, L; Gastellier, M ;Bebermeier, JH ; de Longueville, F. RNA Amplification for DualChip® Gene Expression Analysis. Eppendorf Application Note 139. Dezember 2006

Bebermeier, JH; Bertholet, V, Herzer, P. Data normalization for low-density microarrays. Eppendorf Application Note. Manuskript in Endphase

Hamburg,

(Jan-Hendrik Bebermeier)

8.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 2002 bis Januar 2006 in der Kinderklinik der Universität Schleswig-Holstein/ Campus Lübeck in der von der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) geförderten Forschergruppe „Intersexualität – vom Gen zum Geschlecht“ durchgeführt. Hiermit danke ich allen Personen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus, der durch seine Vorarbeiten in der Brooks-Gruppe der Stanford University und dem daraus entstandenen DFG-Antrag sowohl den organisatorischen als vor allem auch den finanziellen Rahmen dieser Arbeit erst ermöglichte. Ich danke ihm für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die Betreuung der Arbeit in Lübeck und anschließend von Kiel aus.

Ich danke PD Dr. rer. nat. Kalies für die biologisch-naturwissenschaftliche Supervision dieser Arbeit.

Prof. Dr. med. Olaf Hiort danke ich in seiner Rolle als Sprecher und Leiter der Forschergruppe.

Insbesondere danke ich Dr. rer. nat. Ralf Werner für seine ständige Anwesenheit, die sofortige Unterstützung bei Problemen jeglicher Größenordnung und für die vielen aufbauenden Worte und Diskussionen zwischendurch. Es waren insgesamt knapp 5 Jahre einer sehr produktiven, äußerst interessanten und sehr freundschaftlichen Zusammenarbeit im Biozentrum Hamburg und in der Kinderklinik Lübeck, auf der ein Großteil meiner wissenschaftlichen Erfahrung basiert. Danke!

Dr. rer. nat. Uta Deppe gilt der besondere Dank für die ausführlichen Korrekturen, die vielen Ideen und Anregungen sowie die überaus herzliche Arbeitsatmosphäre. Zusammen haben wir in Lübeck trotz vieler Probleme ein gut funktionierendes Microarray-Core-Lab aufgebaut.

Vielen Dank an Dr. med. Annette Richter-Unruh, die mir während zwei Aufenthalten an der Universitätsklinik Essen einen erheblichen Teil der in dieser Arbeit eingesetzten Blutproben verschaffte und mir zudem ihr Labor für die RNA-Aufarbeitung zur Verfügung stellte.

Dank auch an Sim van Zijverden, der den Arrayprojekten den nötigen Speicherplatz auf dem Server der Kinderklinik freiräumte und uns die sftp-Verbindungen nach Stanford freihielt.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hiort/ Holterhus danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre. Die Zeit hat viel Spaß gemacht.

Dr. med. Sven Pischke sei für die mehrfache Durchsicht der vorliegenden Arbeit und die Anregungen gedankt.

Dr. rer. nat. Birgit Schreiber und Dr. rer. nat. Thomas Kolzau sowie der Firma Eppendorf danke ich für die Anstellung meiner Person bereits während des Zusammenschreibens dieser Arbeit und das damit entgegengebrachte Vertrauen.

8.3 Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hamburg,

(Jan-Hendrik Bebermeier)