

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med Egbert Herting

Androgenresistenz - Funktion und Phänotyp
In-vitro Charakterisierung definierter Mutationen
des Androgenrezeptors

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Julia Katharina Gesing

aus Achim

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med Olaf Hiort
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Tobias Restle

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.05.2010

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis	i
Tabellenverzeichnis und Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
I Einleitung	1
1. Physiologie der männlichen Geschlechtsentwicklung	1
2. Androgenresistenz.....	4
2.1 Komplette Androgenresistenz	5
2.2 Partielle Androgenresistenz	6
3. Der Androgenrezeptor	7
3.1 Aufbau des Androgenrezeptorgens.....	7
3.2 Molekulare Wirkungsweise des AR.....	8
3.3 Funktionelle Domänen des AR	9
3.3.1 Die DNA-Bindungsdomäne	10
3.3.2 Die Liganden-Bindungsdomäne.....	10
3.3.3 Die N-terminale Domäne des AR.....	11
3.4 Die N/C-terminale Interaktion.....	13
3.5 Mutationen des AR	14
4. Zielsetzung und Fragestellungen	15
4.1 Vorstellung der zu untersuchenden Mutationen	15
4.2 Fragestellungen	17
II Material und Methoden.....	20
1. Materialien	20
1.1 Mammalia-Zellen	20
1.1.1 Chinesische-Hamstero-var-Zellen	20
1.1.2 HeLa-Zellen	20
1.2 Bakterienzellen	20
1.3 Plasmide	21
1.3.1 Der Androgenrezeptor Expressionsvektor pSVAR0	21
1.3.2 Reportergene.....	21
1.3.3 Renilla-Luziferase	23
1.3.4 Two-Hybrid-Plasmide.....	24
1.3.5 Kofaktoren des Androgenrezeptors.....	25
1.3.6 Andere Plasmide	25
2. Methoden	26
2.1 Bakterienkultur	26
2.1.1 Agarplatten für die Anzucht von Bakterienkulturen.....	26

2.1.2	Bakterienflüssigkulturen	26
2.1.3	Glyzerolstocks zur Lagerung der Bakterienstämme	26
2.1.4	Herstellung von DH5 α F' kompetenten <i>E. coli</i>	27
2.1.5	DNA-Minipräparation	27
2.1.6	Herstellung Endotoxin-freier Plasmid-DNA	28
2.1.7	Photometrische Bestimmung der DNA	28
2.2	Sequenzierung der Plasmid-DNA	28
2.2.1	Sequenzierung nach der Didesoxymethode	28
2.2.2	Fällung der DNA	29
2.2.3	Analyse der Sequenz	29
2.3	Klonierung der Plasmid-Vektoren	30
2.3.1	PCR-Mutagenese	30
2.3.2	Restriktion und Auftrennung im Agarose-Gel	30
2.3.3	Ligation	31
2.3.4	Transformation in DH5 α F' kompetente <i>E. coli</i>	31
2.4	Klonierungsstrategien	32
2.4.1	pSVAR Konstrukte	32
2.4.2	AR-NTD-Konstrukte	33
2.4.3	AR-LBD-Konstrukte	34
2.5	Zellkultur für CHO- und HeLa-Zellen	34
2.5.1	Medien für die Zellkultur	34
2.5.2	Herstellung von steroidfreiem fetalen Kälberserum	34
2.5.3	Auftauen und Anziehen der Säugerzellen	35
2.5.4	Trypsinieren und Zählen der Säugerzellen	35
2.5.5	Einfrieren der Säugerzellen	35
2.6	Transfektionen	36
2.6.1	Das Prinzip der transienten Transfektion	36
2.6.2	Bestimmung der Transaktivität des Androgenrezeptors	36
2.6.3	Transfektion und Detektion der Luziferaseaktivität	37
2.6.4	Bestimmung der N/C-terminalen Interaktion	38
2.6.5	Bestimmung der Kofaktorinteraktion der LBD	39
2.7	Western Blot	40
2.7.1	Herstellung der Proteinlysate	40
2.7.2	Normalisierung der Lysatmengen	41
2.7.3	Acrylamid-Gel-Elektrophorese und Western Blot	41
2.7.4	Immundetektion	42
2.8	Konzentrations-Wirkungs-Kurven	43

III Ergebnisse	44
1. Sequenzierung der Plasmid-DNA	44
2. LBD-Mutationen.....	44
2.1 Transaktivität des AR am (ARE) ₂ -TATA-Promotor	44
2.2 N/C-terminale Interaktion.....	47
2.3 Interaktion mit Kofaktoren.....	50
2.4 N/C-Abhängigkeit verschiedener Promotoren.....	53
3. NTD-Mutationen	58
3.1 N/C-terminale Interaktion bei NTD-Mutationen.....	58
3.2 Transaktivität der N-terminalen Mutationen am Pem-Promotor	60
IV Diskussion.....	62
V Zusammenfassung.....	76
VI Literaturverzeichnis.....	77
VII Anhang	86
VIII Danksagung	100
IX Lebenslauf und Publikationen.....	101

Tabellenverzeichnis

Tbl. 1	Klassifikation des AIS nach Sinnecker 1997.....	5
Tbl. 2	SOB-Medium.....	27
Tbl. 3	Acrylamid-Gele für SDS-PAGE	41
Tbl. 4	Primärantikörper.....	43
Tbl. 5	Sekundärantikörper	43
Tbl. 6	T-Test zum Beweis der Signifikanz der Abweichung der N/C-Interaktion zwischen N-terminalen Mutationen und WT	59
Tbl. 7	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der LBD-Mutationen.....	71

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der embryonalen Geschlechtsentwicklung.....	3
Abb. 2	Schemazeichnung zur klinischen Einteilung des AIS.....	5
Abb. 3	Gen-Lokus, Gen-Aufbau, cDNA und Proteinstruktur des AR	7
Abb. 4	Schema des molekularen Wirkmechanismus des AR.....	8
Abb. 5	Kristallstruktur der AR-DBD gebunden an ein ARE	9
Abb. 6	Dreidimensionale Struktur der AR-LBD	11
Abb. 7	Funktionelle Untereinheiten des AR-Proteins	12
Abb. 8	Verteilung der acht zu untersuchenden Mutationen im AR-Protein	16
Abb. 9	Überblick über die Promotorregion der verwendeten Reportergene	23
Abb. 10	Schematische Darstellung der Basen-Detektion im Kapillarsequenzierer	29
Abb. 11	Restriktion und Ligation	31
Abb. 12	Prinzip der Transformation und Amplifikation in Bakterien.....	32
Abb. 13	Luziferase-Reaktionen	38
Abb. 14	Aufbau der Gene der Two-Hybrid-Fusionsproteine.....	39
Abb. 15	Prinzip der Immundetektion.....	42
Abb. 16	Sequenzanalyse des pSVAR WT und pSVAR L712F.....	44
Abb. 17	Transaktivität des AR am (ARE) ₂ -TATA-Promotor.....	46
Abb. 18	Two-Hybrid-Assay zur Detektion der N/C-terminalen Interaktion	48
Abb. 19	Interaktion der AR LBD mit SRC1e	51
Abb. 20	Interaktion der AR LBD mit BAG1L	52
Abb. 21	Transaktivität des AR an verschiedenen Promotoren	55
Abb. 22	N/C-terminale Interaktion der NTD-Mutationen.....	58
Abb. 23	N/C-Interaktion der NTD-Mutationen mit ²³ FQNAA ²⁷ -Motiv.....	60
Abb. 24	Transaktivität des AR mit NTD-Mutationen am Pem-Promotor	61

Abkürzungsverzeichnis

AIS	Androgenresistenz-Syndrom (Androgen Insensitivity Syndrome)
AMH	Anti-Müller-Hormon
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen-responsives Element
AS	Aminosäure
AV	Arbeitsverdünnung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine)
bzw.	Beziehungsweise
CAIS	Komplette Androgenresistenz (Complete AIS)
CI	Konfidenzintervall (Confidence Interval)
CHO-Zellen	Chinesische Hamsterovar-Zellen
CMV	Cytomegalie-Virus
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCC-FCS	Steroidfreies fetales Kälberserum (dextran-coated charcoal-FCS)
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dest.	Destilliert
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EtOH	Ethanol
f.c.	Endkonzentration (Final concentration)
FCS	Fetales Kälberserum

FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
h	Stunde (Hour)
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HeLa	Henrietta Lacks
HRE	Hormon-responsives Element
HRP	Meerrettich Peroxidase (Horseradish Peroxidase)
HSP	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
Kd	Dissoziationskonstante
LB	Luria-Bertani
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LH	Luteinisierendes Hormon
m	Milli
M	Molar
MAIS	Minimale Androgenresistenz (Minimal AIS)
min	Minute
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NLS	Kernlokalisierungssequenz (Nuclear localization sequence)
NTD	N-terminale Domäne
OD	Optische Dichte
p	Pico
pAD-NTD	Two-Hybrid-Plasmid, das für ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne (AD) des Maus NF- κ B Gens und der N-terminalen Domäne (NTD) des Androgenrezeptors kodiert
PAIS	Partielle Androgenresistenz (Partial AIS)
pBD-LBD	Two-Hybrid-Plasmid, das für ein Fusionsprotein aus der DNA-Bindungsdomäne (BD) des Hefeproteins GAL4 und der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des Androgenrezeptors kodiert
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)
pSVAR	Expressionsvektor des Androgenrezeptors
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SOB-Medium	optimales Nährmedium (Super Optimal Broth Medium)
Tau	Transkriptions-Aktivierungs-Einheit (Transcription Activation Unit)
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Umdrehungen
u.a.	Und andere
V	Volt
WT	Wildtyp

I Einleitung

Die Geschlechtsentwicklung ist ein komplexer Vorgang der Embryogenese, in dessen Regulation eine Vielzahl von Genen, Hormonen und zugehörigen Hormonrezeptoren eingreifen. Ausgehend von einem intersexuellen Stadium entwickelt sich ein Embryo zu einem Mädchen oder einem Jungen. Der Ausfall einzelner, hieran beteiligter Komponenten kann in einer Störung der Geschlechtsentwicklung resultieren.

Die männlichen Sexualhormone entfalten ihre biologische Wirkung über den Androgenrezeptor. Liegt eine Funktionseinschränkung dieses Rezeptors vor, kommt es bei männlichen Embryos zu einer verminderten bis fehlenden Virilisierung. Diese Störung der Geschlechtsentwicklung wird als Androgenresistenz oder Androgeninsensitivitätssyndrom bezeichnet. In der Literatur sind mehr als 500 verschiedene Mutationen des Androgenrezeptors bekannt, die den Rezeptor in seiner Funktion einschränken. Es wird zwischen der kompletten Androgenresistenz mit vollständigem Funktionsverlust des Androgenrezeptors, der partiellen Androgenresistenz mit verminderter Rezeptorfunktion und einer minimalen Einschränkung unterschieden. Die phänotypische Ausprägung, vor allem der partiellen Resistenz, ist individuell sehr variabel. So reicht das Spektrum bei Vorliegen derselben Mutation, L712F, innerhalb einer Familie von einer leicht verminderten Virilisierung mit Mikropenis bei einem Sohn bis zu einem intersexuellen Genital bei einem zweiten Sohn (Holterhus *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurden definierte Mutationen von betroffenen Patienten *in-vitro* funktionell untersucht. Durch die gewonnenen Ergebnisse soll ein besseres Verständnis in die Pathophysiologie der Androgenresistenz ermöglicht werden, insbesondere im Hinblick auf Genotyp-Phänotyp-Korrelation und die prognostische Einschätzung von Therapiemöglichkeiten.

1. Physiologie der männlichen Geschlechtsentwicklung

Die Geschlechtsentwicklung des Menschen läuft in verschiedenen Phasen ab. Es wird zwischen dem genetischen, dem gonadalen und dem phänotypischen Geschlecht unterschieden. Das genetische Geschlecht wird über den Chromosomensatz der befruchteten Eizelle bestimmt. Dabei ist der weibliche Chromosomensatz typischerweise 46,XX und der männliche 46,XY. Unterschiede in der Entwicklung zwischen männlichen und weiblichen Keimzellen sind schon am 2. Tag nach der Befruchtung festzustellen. So zeigen männliche Embryos eine höhere Zellzahl und höhere metabolische Aktivität als vergleichbare weibliche Embryos (Mittwoch *et al.*, 2000). Zunächst bilden sich bei beiden Geschlechtern aus dem Mesoderm undifferenzierte bipotente Gonadenanlagen (siehe Abb. 1). Dieser Vorgang wird durch die Expression verschiedener Gene (u.a. WT1 (Wilms-

Tumor-1 Gen), SF1 (steroidogenic-factor-1 Gen), später auch GATA4 (GATA-binding-protein-4 Gen), LHX9 (LIM-Homeobox-9 Gen), LIM1 (LIM-Homeobox-1 Gen) gesteuert (Miyamoto *et al.*, 2008; Shimamura *et al.*, 1997; Wilson und Davies, 2007). Unabhängig vom Geschlecht entwickeln sich aus dem Urnierengang die Wolff'schen Gänge und aus der Urogenitalleiste die Müller'schen Gänge (Überblick in Hannema *et al.*, 2007).

Die Entwicklung der bipotenten Gonadenanlage zu den männlichen Keimdrüsen, den Hoden, ist der entscheidende Schritt der Geschlechtsdeterminierung (siehe Abb. 1). Die Ausdifferenzierung der Hoden mit Hodensträngen, Keim-, Leydig- und Sertoli-Zellen wird durch die Expression vor allem Y-chromosomaler Gene gesteuert. Eine Vielzahl dieser Gene, die für verschiedene Transkriptionsfaktoren kodieren, konnte bereits identifiziert werden (Überblick in Wilson und Davies, 2007).

Das SRY (sex-determining region of the Y-Chromosome) -Gen wurde 1990 als lange gesuchter Testis-determinierender Faktor von Berta *et al.* identifiziert. SRY gehört zur Familie der High-Mobility-Group (HMG)-Box Proteine. Als Transkriptionsfaktor steuert SRY die Ausdifferenzierung der Hoden durch die Expression weiterer Gene. Hier ist vor allem SOX9 (SRY-related HMG box-9) zu nennen, welches zeitlich etwas nach SRY exprimiert wird und eine ähnliche Funktion wie SRY hat (Kanai *et al.*, 2005; Harley *et al.*, 2003). Das Gen DAX1 (Dosage-Reversal, Adrenal-Hypoplasia-Congenita, X-Chromosom) liegt auf dem X-Chromosom und ist im frühen Stadium für die Entwicklung der Sertoli-Zellen entscheidend. Es greift in die Proliferation und Differenzierung der Leydig-Zellen ein. In höherer Dosis wirkt es hingegen supprimierend auf die Expression von SRY und SOX9 (Meeks *et al.*, 2003; Park und Jameson, 2005). Die Zellzahl, die bei männlichen Embryos durch den Einfluss des SRY-Gens größer ist, scheint für die Ausdifferenzierung der Hoden ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen (Mittwoch *et al.* 2000).

Die weitere Ausbildung des männlichen Geschlechts wird durch unterschiedliche Hormone gesteuert (siehe Abb. 1). Ab der 6. Entwicklungswoche beginnen die Sertoli-Zellen der Hoden mit der Hormonproduktion des Anti-Müller-Hormons (AMH) (Überblick in Wilson und Davies, 2007). Park *et al.* zeigte, dass die oben erwähnten Gene SOX9 und SF1 die Expression von AMH verstärken (Park *et al.*, 2005). AMH bewirkt im Embryo eine Rückbildung der Müller'schen Gänge, aus denen sich im Zuge der normalen weiblichen Geschlechtsentwicklung Uterus, Tuben und Ovarien entwickeln. Die Leydig-Zellen des Hodens beginnen ab der 8. Woche mit der durch hCG (humanes Choriongonadotropin) und später LH (Luteinisierendes Hormon) kontrollierten Produktion des Steroidhormons Testosteron (Hannema *et al.*, 2007; Hiort *et al.*, 2000b). Die komplexe Synthese aus Cholesterin läuft in diversen Schritten vor allem über P₄₅₀-Enzyme in den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum ab (Miller, 1998).

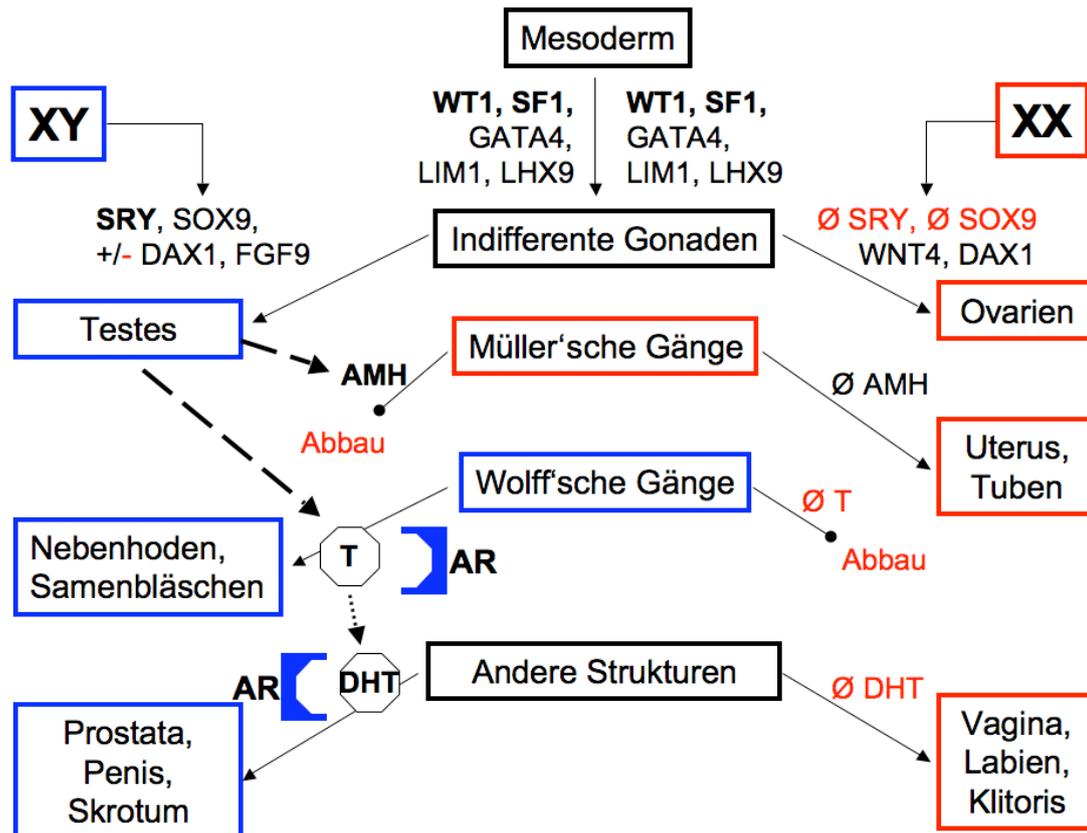


Abb. 1 Schematische Darstellung der embryonalen Geschlechtsentwicklung

WT1 und SF1 sowie später auch GATA4, LHX9 und LIM1 regulieren die Entwicklung der indifferenten Gonaden sowohl im männlichen als auch weiblichen Embryo. Unter dem Einfluss regulatorischer Gene (SRY, SOX9, DAX1, FGF9 u.a.) differenzieren sich die indifferenten Hodenanlagen des männlichen Embryos zu Hoden aus. Die Sertoli-Zellen der Hoden beginnen das Anti-Müller-Hormon (AMH) zu sezernieren, dieses führt zu einer Rückbildung der Müller'schen Gänge, die sich im weiblichen Embryo zu Uterus und Tuben ausbilden. Die Leydig-Zellen des Hodens produzieren Testosteron (T), dieses bewirkt über den Androgenrezeptor (AR) eine Differenzierung der Wolff'schen Gänge zu Samenbläschen und Nebenhoden. Testosteron wird von der 5 α -Reduktase II zu Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt (gepunkteter Pfeil). Durch die Androgenvermittelte Wirkung von DHT kommt es zur Ausbildung des äußeren männlichen Geschlechts. Ist keine Testosteron- oder DHT-Wirkung vorhanden, bilden sich äußere weibliche Genitalien aus. Auch die weibliche Geschlechtsdifferenzierung unterliegt einer komplexen Genregulation, die hier nicht weiter erörtert werden soll.

Durch die Testosteronwirkung differenzieren sich die Wolff'schen Gänge von den Hoden ausgehend zu Nebenhoden, Samengängen und Samenbläschen (Übersicht in Hannema, 2007). Durch das Enzym 5 α -Reduktase II wird Testosteron in den Zielzellen in das potentere Androgen Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. DHT bewirkt die Ausbildung des äußeren männlichen Genitals: die Entwicklung der männlichen Urethra, der Prostata, des Penis und des Skrotums (Übersicht in Wilson und Davies, 2007). Die Androgene Testosteron und DHT üben ihre biologische Wirkung in den Zielzellen über einen nukleären Hormonrezeptor, den Androgenrezeptor (AR) aus. Dieser wirkt als Androgen-abhängiger

Transkriptionsfaktor aktivierend oder supprimierend auf seine Zielgene. Die Expression des AR am Wirkort ist somit Grundlage für die Entwicklung des männlichen Phänotyps. In der Pubertät steigt, vermittelt über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse, die Testosteronproduktion der Leydig-Zellen an und vermittelt die Ausbildung der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale und die Spermatogenese. Auch im weiteren Erwachsenenleben sind Androgene für den Erhalt der Fertilität und der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale entscheidend (Übersicht in Hiort, 2002).

2. Androgenresistenz

Können die Androgene Testosteron und DHT ihre biologische Wirkung über den Androgenrezeptor auf Grund einer Rezeptormutation nicht oder nur teilweise ausüben, kommt es zu einer Störung der physiologischen Geschlechtsentwicklung, die als Androgenresistenz oder Androgen Insensitivity Syndrome (AIS, OMIM #300068) bezeichnet wird. AIS wird X-chromosomal rezessiv vererbt und tritt mit einer Prävalenz von eins pro 20 000 bis eins pro 64 000 männlichen Neugeborenen auf (Ahmed *et al.*, 2000). Betroffene haben einen normalen 46,XY Karyotyp, unvollständig deszendierte Hoden und ein äußerlich weibliches oder auch teilweise bis vollständig virilisiertes Genital. Nach Sinnecker lassen sich die Phänotypen in Grad 1 (männlich) bis 5 (weiblich) einteilen (Sinnecker *et al.*, 1997). Klinisch werden drei Formen, die komplette (CAIS), partielle (PAIS) und minimale (MAIS) Androgenresistenz unterschieden (Brinkmann, 2001). Zum Verständnis ist die Klassifikation in Tbl. 1 und Abb. 2 dargestellt. Die Hormonprofile von CAIS- und PAIS-Patienten sind vergleichbar. Serum-Testosteron- und LH-Werte sind während der ersten drei Lebensmonate am bzw. über dem oberen normalen Mittel für dieses Alter. Präpubertär werden normal niedrige LH- und Testosteron-Level gemessen. Da die Androgenresistenz auch das Hypothalamus-/ Hypophysenniveau betrifft, rufen hohe Testosteronwerte kein negatives Feedback hervor. Daher steigen in der Pubertät LH und nachfolgend Testosteron auf überhöhte Werte an (Brinkmann, 2001).

Die Diagnose einer Androgenresistenz wird durch die Detektion eines molekularen Defekts im Gen des Androgenrezeptors bestätigt. Die Sequenzierung des Leserahmens und der Exon-/Intron-Grenzen des AR Gens kann bei CAIS-Patienten in 95 % der Fälle eine genetische Ursache beweisen. Bei PAIS liegt die Detektionsrate mit ungefähr 50 % deutlich darunter, bei MAIS ist sie unbekannt (Gottlieb *et al.*, 2007).

Typ	Phänotyp	Form	Phänotyp und Funktion
1	männlich	MAIS	Gestörte Spermatogenese und/oder gestörte Virilisierung in der Pubertät
2	vorwiegend männlich	PAIS	Isolierte Hypospadie und/oder Mikropenis und höhergradige Hypospadie, Skrotum bipartitum
3	Ambivalent	PAIS	Klitorisähnlicher Mikrophallus, Labien-ähnliches Skrotum bipartitum, perineoskrotale Hypospadie oder auch Sinus urogenitalis mit kurzer blind endender Vagina
4	vorwiegend weiblich	PAIS	Klitorishypertrophie und labiale Fusion, Sinus urogenitalis mit kurzer blind-endender Vagina, oder leichte Virilisierungszeichen
5	weiblich	CAIS	Keine Virilisierungszeichen, in der Pubertät Brustentwicklung, keine Entwicklung Androgen-abhängiger Strukturen (keine Scham/Achselbehaarung)

Tbl. 1 Klassifikation des AIS nach Sinnecker 1997

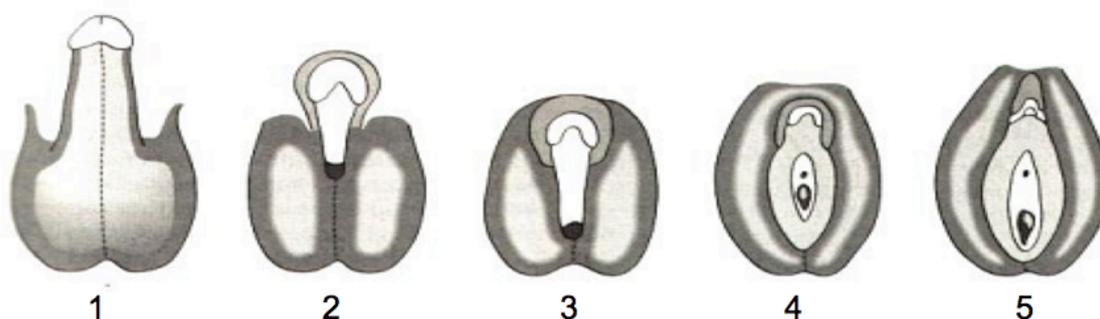


Abb. 2 Schemazeichnung zur klinischen Einteilung des AIS

Darstellung des äußeren Genitals bei den verschiedenen Formen von AIS 1) vollkommen männlich 2) vorwiegend männlich 3) intersexuell 4) vorwiegend weiblich 5) vollständig weiblich

2.1 Komplette Androgenresistenz

Die komplette Androgenresistenz ist durch einen vollständigen Funktionsverlust des Androgenrezeptors gekennzeichnet. Während der Embryonalentwicklung kommt es zur Ausbildung der Hoden mit Sekretion von AMH und Testosteron (siehe Abb. 1). AMH vermittelt die Rückbildung der Müller'schen Gänge, wodurch die Betroffenen keinen Uterus und keine Tuben ausbilden. In einigen Fällen wurde das Verbleiben von Müllerstrukturen in CAIS-Patienten beschrieben (Hannema, 2004; Ulloa-Aguirre *et al.*; 1990, Van *et al.*, 2003). Da der Androgenrezeptor funktionsuntüchtig ist, können die gebildeten Androgene ihre biologische Wirkung nicht entfalten. Die Wolff'schen Gänge bilden sich nicht zu Nebenhoden, Samengängen und Samenbläschen aus, und auch die normalerweise durch DHT vermittelte Ausbildung von Prostata, Penis und Skrotum unterbleibt. Stattdessen kommt es zu einer Rückbildung der Wolff'schen Gänge und der Ausbildung eines norma-

len weiblichen äußeren Genitals mit einer kurzen blind-endenden Vagina (siehe Abb. 1 und Abb. 2 (5), Tbl. 1; Brinkmann, 2001). Die Hoden liegen intraabdominell oder in den Leisten. In der Pubertät steigt die Testosteronproduktion an. Das Testosteron wird in den Hoden sowie peripher durch das Enzym Aromatase in Östradiol umgewandelt. Somit kommt es in der Pubertät bei den CAIS-Patienten zu einer weiblichen Brustentwicklung (MacDonald *et al.*, 1979). Typisch ist das Fehlen von Achsel- und Schambehaarung, die durch Androgene vermittelt wird (Übersicht in Papadimitriou *et al.*, 2006).

Die Diagnose ist oft ein Zufallsbefund: es wird eine Diskrepanz zwischen männlichem Karyotyp bei Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie und dem im pränatalen Ultraschall oder bei der Geburt festgestellten äußerlich weiblichen Geschlecht entdeckt, oder beim Pädiater werden Leistenhoden vorgefunden. Bei beidseitiger Leistenhernie wurde die Prävalenz eines AIS mit 1 - 2 % angegeben (Galani *et al.*, 2008; Hurme *et al.*, 2009). Teilweise wird die Diagnose erst in der Pubertät bei Ausbleiben der Menstruation und sekundären Behaarung festgestellt.

2.2 Partielle Androgenresistenz

Im Gegensatz zu dem relativ einheitlichen Phänotyp des CAIS zeigt das Bild der partiellen Androgenresistenz ein breites klinisches Spektrum. Die äußeren Genitalien können vorwiegend weiblich mit leichten Zeichen der Virilisierung, intersexuell nicht einem Geschlecht klar zuzuordnen oder auch vorwiegend männlich mit leichten Virilisierungsstörungen ausgeprägt sein (Tbl. 1 und Abb. 2 (2-4)). Die Funktionalität des Androgenrezeptors ist bei PAIS zum Teil vorhanden. Die Abkömmlinge der Wolff'schen Gänge sind somit teilweise bis vollständig entwickelt (Hiort *et al.*, 2000b). PAIS-Patienten fallen durch ihr äußeres Genital meist schon direkt nach ihrer Geburt auf. In der Pubertät zeigt ein Großteil eine Gynäkomastie. In den Hoden ist eine reduzierte Zahl von Spermatogonien oder Azoospermie zu erkennen. Die Diagnose wird nach dem klinischen Bild, dem Karyogramm und einem hCG-Stimulationstest mit einer ausgeprägten bis supraphysiologischen Testosteronantwort gestellt. Es werden Testosteron, seine Vorstufen und DHT bestimmt, um differentialdiagnostisch Störungen der Testosteronbiosynthese ausschließen zu können.

Als MAIS wird die mildeste Ausprägung einer Androgenresistenz mit normalem männlichen Geschlecht, jedoch leichten Virilisierungsstörungen wie Gynäkomastie oder Infertilität, beschrieben. Bei infertilen Männern kann in 2 - 3 % eine Mutation im AR-Gen, also ein MAIS nachgewiesen werden (Hiort *et al.*, 2000a; Ferlin *et al.*, 2006).

3. Der Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor (AR, OMIM *313700) gehört zur Gruppe der Steroidhormonrezeptoren, die ihre Wirkung über die Regulation bestimmter Zielgene entfalten. Wie beschrieben, ist die Funktion des AR unabdingbar in der Entwicklung des männlichen Geschlechts. Mutationen und andere strukturelle Veränderungen des Rezeptors führen zur Androgenresistenz. Um die Pathophysiologie dieses Rezeptordefektes zu verstehen, ist die Kenntnis seiner Struktur und seines molekularen Wirkungsmechanismus wichtig.

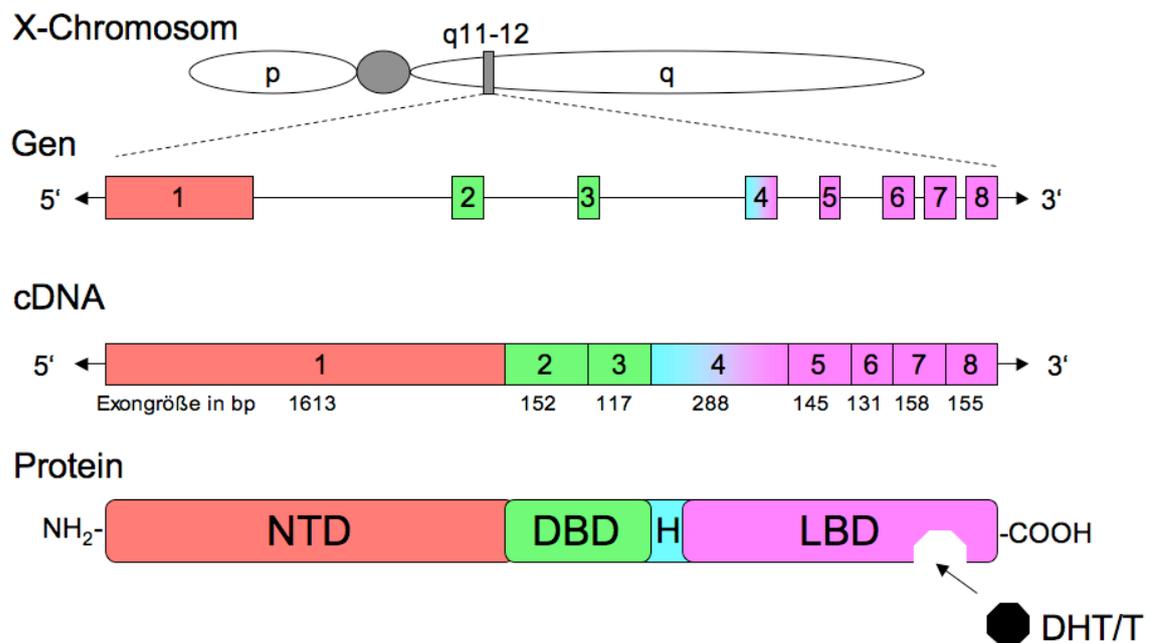


Abb. 3 Übersicht über Gen-Lokus, Gen-Aufbau, cDNA und Proteinstruktur des AR (modifiziert nach Quigley *et al.*, 1995) Oben: Das Gen des AR liegt auf dem langen Arm des X-Chromosoms an Position Xq11-12. Mitte: Das AR-Gen ist 75-90 kb lang und in 8 Exons gegliedert, die von Introns mit 0,7 bis zu 26 kb getrennt sind. Exon 1 kodiert für die N-terminale Domäne (NTD), Exon 2 und 3 kodieren für die DNA-Bindungsdomäne (DBD). Die 5'-Region von Exon 4 kodiert für die Hinge-Region (H), der übrige Teil von Exon 4 und die Exons 5-8 kodieren für die Liganden-Bindungsdomäne (LBD) des AR. Unten: das AR-Protein, gegliedert in seine drei Domänen, NTD (rot), DBD (grün), Hinge-Region (H) mit der Kernlokalisierungssequenz (blau) und LBD (violett) mit Ligandenbindungsgrube für Testosteron (T) und Dihydrotestosteron (DHT).

3.1 Aufbau des Androgenrezeptorgens

Das Gen des Androgenrezeptors ist auf dem X-Chromosom (Xq11-12) lokalisiert und umfasst ungefähr 90 Kilobasen mit 8 Exons, die mit 1-8 (Marcelli *et al.*, 1990) oder A-H (Lubahn *et al.*, 1989) bezeichnet werden (siehe Abb. 3). Exon 1 kodiert für die N-terminale Domäne (NTD), die mehr als die Hälfte des AR ausmacht. In Richtung des 5' Endes befindet sich ein Glutamin-Repeat (PolyQ) und zum 3' Ende der NTD hin liegt ein Glycin-

Repeat (PolyG). Abhängig von den Repeat-Längen variiert die Länge des AR zwischen 910 und 919 Aminosäuren. Exon 2 und 3 kodieren für die DNA-Bindungsdomäne (DBD) und die Exons 4-8 für die Hormonbindungsdomäne (LBD) des Rezeptors. Das 5' Ende von Exon 4 kodiert für die Verbindung zwischen der DBD und LBD, die als Hinge-Region bezeichnet wird. In ihr ist auch die Kernlokalisierungssequenz (NLS) des AR zu finden (Übersicht in Quigley *et al.*, 1995).

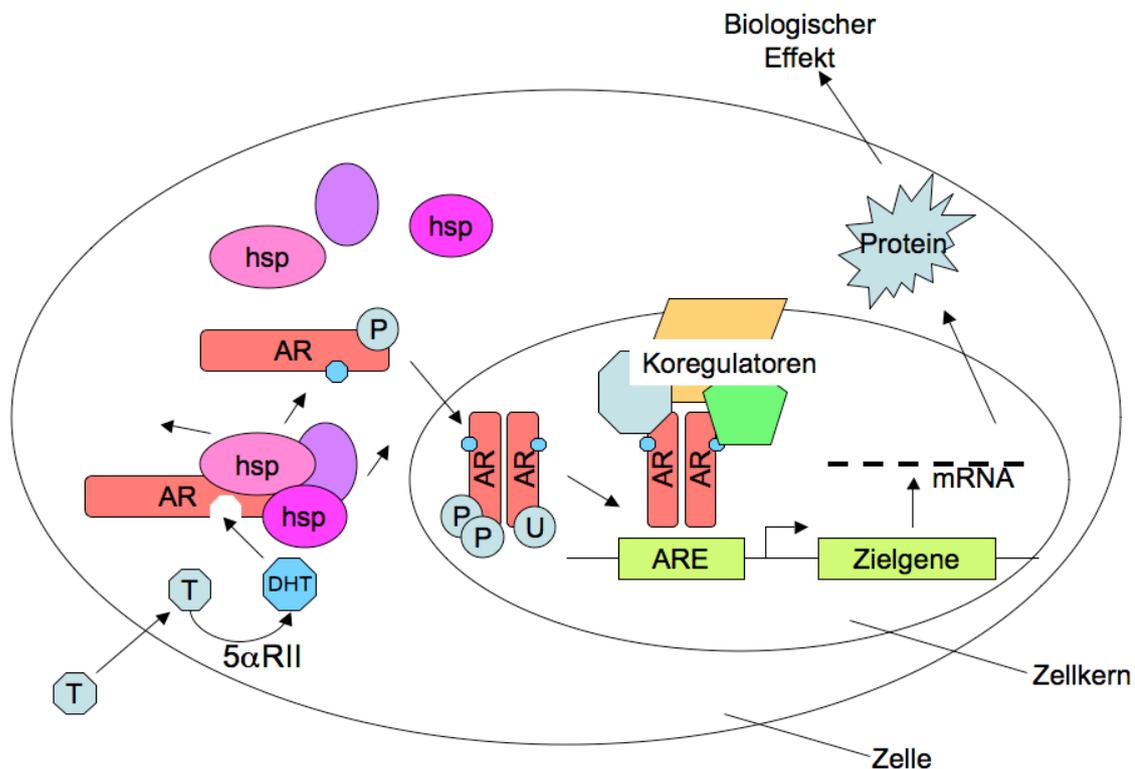


Abb. 4 Schema des molekularen Wirkmechanismus des AR (nach Lee *et al.*, 2003)

Ohne Hormon liegt der Androgenrezeptor (AR) an Hitzeschockproteine (hsp) gebunden im Zytoplasma vor. Testosteron wird intrazellulär von der 5α-Reduktase II (5αRII) in DHT umgewandelt. Die Bindung von DHT an den AR bewirkt die Dissoziation des Proteinkomplexes. Der Hormonrezeptorkomplex wird u.a. durch Phosphorylierung (P) und Ubiquitinierung (U) modifiziert. Im Zellkern findet eine Rezeptordimerisierung statt. Infolge binden die Rezeptor-Dimere an Androgen-responsive Elemente (AREs) vor Zielgenen und führen durch Koregulator-Rekrutierung zu einer Transkriptionsinitiation der Zielgene, woraus letztlich der biologische Effekt der Hormonwirkung resultiert.

3.2 Molekulare Wirkungsweise des AR

Der AR liegt in seinem inaktiven Zustand assoziiert mit Hitzeschockproteinen und hochmolekularen Immunophilinen im Zytoplasma der AR-exprimierenden Zellen vor (siehe Abb. 4; Dehm und Tindall, 2007). Erreichen Androgene, die als lipophile Moleküle in die Zelle diffundieren können, den Rezeptor, binden sie in der LBD und bewirken eine Rezeptoraktivierung. Die Hitzeschockproteine lösen sich, und der Hormon-Rezeptorkomplex

wird über seine Kernlokalisierungssequenz, vermittelt durch Importin- α , in den Zellkern transportiert (Gobinet *et al.*, 2002; Cutress *et al.*, 2008). Der AR bildet Homodimere aus und lagert sich an die Androgen-responsiven Elemente (AREs) seiner Zielgene an. Dort rekrutiert er weitere Kofaktoren und initiiert die Transkription mit Hilfe der RNA-Polymerase II (Rosenfeld und Glass, 2001). Posttranslationale Modifizierungen des Rezeptors, wie Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung, beeinflussen Struktur und Funktion des AR (Dehm und Tindall, 2007, Orphanides *et al.*, 2002, Geserick *et al.*, 2003). Die genauen Abläufe sind noch nicht vollständig bekannt. Einen Überblick über die Rezeptorfunktion ist in Abb. 4 dargestellt.

3.3 Funktionelle Domänen des AR

Die drei Domänen des AR haben unterschiedliche Funktionen und Struktureinheiten. Die zentrale DNA-Bindungsdomäne vermittelt die Translokation in den Zellkern, die AR-Dimerisierung und die DNA-Bindung. Die NTD ist die transaktivierende Domäne des AR, sie interagiert u.a. mit Kofaktoren. Die LBD ist für die Hormonbindung zuständig und ebenfalls in die Interaktion mit Kofaktoren involviert (Übersicht in Dehm und Tindall, 2007).

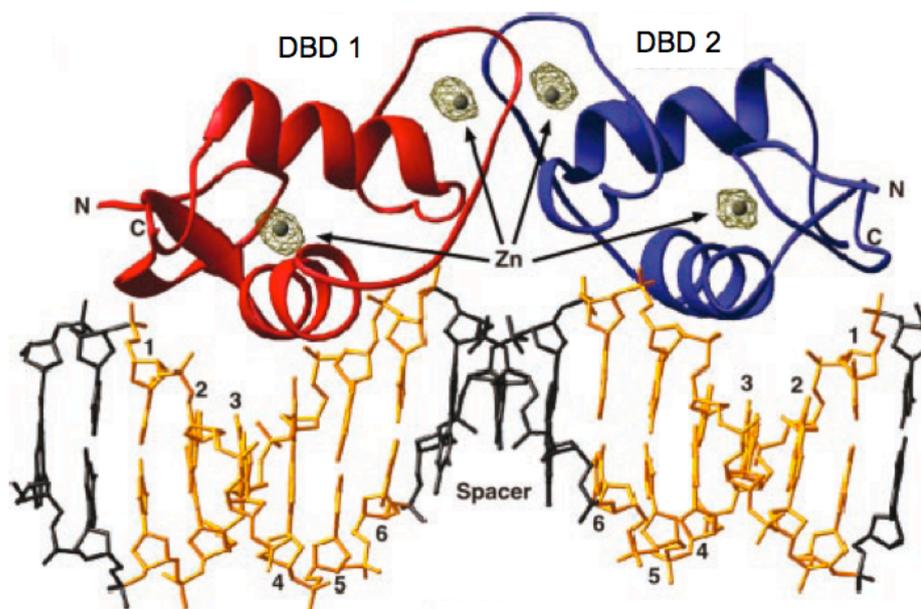


Abb. 5 Kristallstruktur der AR-DBD gebunden an ein ARE (aus Shaffer *et al.*, 2004)

In Strickleiter-Konformation ist ein idealisiertes ARE, mit der Sequenz AGAACAnnnAGAAC, dargestellt: Zwei hexamerische direkte DNA-Repeats (in gelb bp 1-6) getrennt durch drei DNA-Basen (Spacer, dargestellt in blau). Darüber sind die DBDs von zwei ARs (DBD1 in rot und DBD2 in blau) in einer Kopf-zu-Kopf-Konformation abgebildet. Zink-Atome (Zn) strukturieren die DBDs in ihre Zinkfinger, der erste Zinkfinger geht über die P-Box die Interaktion mit den AREs ein. Über die D-Boxen der zweiten Zinkfinger lagern sich die ARs zu einem Homodimer zusammen.

3.3.1 Die DNA-Bindungsdomäne

Die DBD ist ungefähr 80 Aminosäuren lang und gliedert sich strukturell in zwei Zinkfinger-Motive, in denen ein zentrales Zn^{2+} vier Cystein-Seitenketten koordiniert (Abb. 5). Das erste Zinkfinger-Motiv enthält die sogenannte P-Box, über die der Kontakt zu den Androgen-responsiven Elementen (AREs) vor Zielgenen aufgebaut wird. Die entsprechenden Aminosäuren sind innerhalb der Steroidhormon-Rezeptorfamilie konserviert. Der zweite Zinkfinger enthält die D-Box, über die sich, in Abhängigkeit von der DNA-Bindung, AR-Homodimere ausbilden (siehe Abb. 5; Dehm und Tindall, 2007; Claessens *et al.*, 2008). Am C-terminalen Ende der DBD befindet sich eine Kernlokalisierungssequenz, die nach Hormonaktivierung den Transport des AR in den Zellkern vermittelt.

Die DBD des AR kann zwei verschiedene Arten von AREs binden. Die klassischen AREs werden sowohl vom AR als auch vom Mineralokortikoid-, Glukokortikoid- und Progesteronrezeptor erkannt. Zwei Hexamere bilden eine palindromische Sequenz mit der Konsensus-Sequenz 5'-GGTACAnnnTCTTCT-3' aus (Geserick *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren kann der AR außerdem eine Sequenz aus zwei hexamerischen direkten Repeats binden. In der Promotorregion einiger Androgen-abhängiger Gene, wie dem Probasin- und sex-limited-Protein-Gen, konnten diese Sequenzen detektiert werden. Sie werden als selektive Androgen-responsive Elemente (sARE) bezeichnet (Lee und Chang, 2003). In Kristall-Struktur-Analysen wurde eine Kopf-zu-Kopf-Konformation der an ein idealisiertes sARE gebundenen DBD-Homodimere detektiert (siehe Abb. 5; Shaffer *et al.*, 2004).

3.3.2 Die Liganden-Bindungsdomäne

Die LBD hat eine konservierte Struktur, die ebenfalls mit Kristallographie-Studien dargestellt werden konnte. Sie lässt sich als ein Sandwich aus 12 α -Helices mit einer zentralen Hormonbindungsgrube beschreiben (siehe Abb. 6; Sack *et al.*, 2001; Matias *et al.*, 2000). Die physiologischen Liganden des AR sind Testosteron und Dihydrotestosteron. 18 Aminosäurereste der Helices 3, 5 und 11 bilden einen direkten Kontakt zum gebundenen Androgen aus. Die Hormonbindung löst eine Konformationsänderung des ganzen Rezeptors aus, wodurch sich Helix 12 über die Bindungsgrube legt und die Ligandenbindung stabilisiert (Moras und Gronemeyer, 1998). Die aktivierte LBD stabilisiert die Bindung der DBD an Androgen-responsive Elemente vor Zielgenen (Farla *et al.*, 2004) und ist für Protein-Proteininteraktionen entscheidend. Durch die Konformationsänderung wird eine hydrophobe Grube frei, über welche die LBD mit Kofaktoren interagieren kann. Diese Region der LBD, bestehend aus den positiv-geladenen Seitenketten K715, K718 und R724 und den negativen Seitenketten E707, E891 und E895, wird als Activation-Function-2 (AF2)

bezeichnet (He und Wilson, 2003). Im Gegensatz zu den strukturgleichen Regionen anderer Steroidhormonrezeptoren hat die LBD des AR eine geringere Affinität zu bestimmten Peptidstrukturen von p160-Koaktivatoren, die als LXXLL-Motive bezeichnet werden (L steht für Leucin, X kann jede Aminosäure sein) (Dubbink *et al.*, 2004; Hur *et al.*, 2004). Stattdessen kann die AF2 des AR mit hoher Affinität mit einer anderen Peptidstruktur, einem ²³FQNLF²⁷-Motiv, welches sich in der NTD des AR selbst befindet, interagieren. Diese für den AR spezifische Interaktion zwischen NTD und LBD wird als N/C-terminale Interaktion bezeichnet. Mit hoher Affinität werden auch Kofaktoren mit FXXMF- und FXXFF-Motiven gebunden (van de Wijngaard *et al.*, 2006). In Abb. 7 sind die funktionellen Untereinheiten und Wechselwirkungen des AR vereinfacht dargestellt.

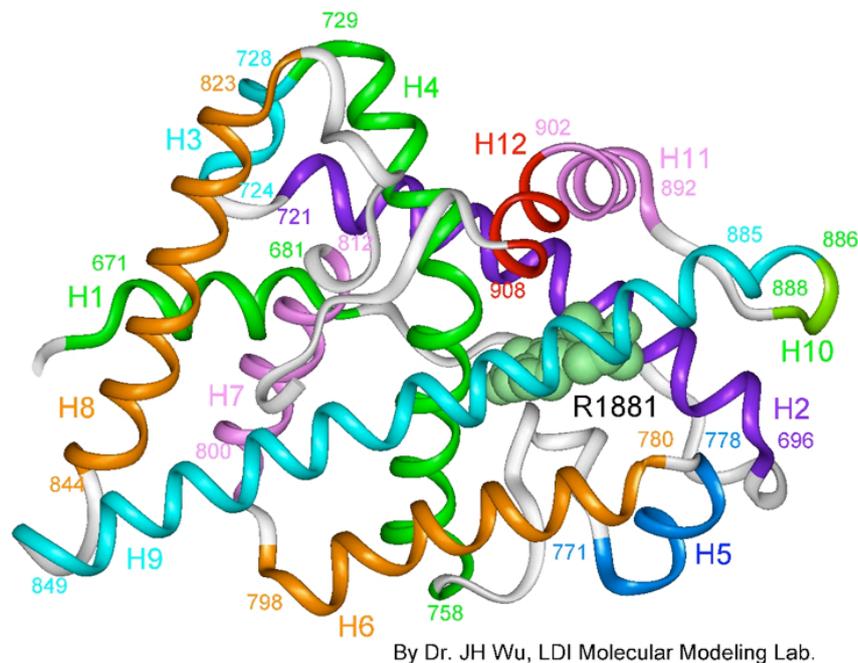


Abb. 6 Dreidimensionale Struktur der AR-LBD (Die Abbildung entstammt der AR-Database, von Dr. JH Wu, LDI Molecular Modeling Lab.) Durch Kristallographiestudien konnte die 3-dimensionale Struktur der LBD detektiert werden. Hier dargestellt mit dem künstlichen AR-Agonisten R1881, bildet die LBD 12 α -Helices (H1-H12) aus, die sich zu einem Sandwich mit zentraler Ligandenbindungsgrube zusammenlagern. Helix 12 (rot) verlagert sich nach der Hormonbindung und stabilisiert als „Deckel“ die Ligandenbindung.

3.3.3 Die N-terminale Domäne des AR

Die N-terminale Domäne der Steroidhormonrezeptoren ist am wenigsten konserviert, sie variiert in Länge, Aminosäure-Zusammensetzung und auch in ihrer Funktion (Claessens *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu den anderen Domänen existiert keine feststehende Tertiärstruktur. Auch die NTD des AR weist eine hohe Plastizität auf. In Abhängigkeit von intra- und intermolekularen Interaktionen ändert sich ihre Konformation (McEwan *et al.*, 2007). Kofaktoren und Struktur-stabilisierende Lösungen können die NTD in einen geordneteren, stabileren Zustand transformieren (Reid *et al.*, 2002). Studien des AR mit zwei Domänen

zeigten, dass die Anwesenheit der DBD und/oder die DNA-Bindung die Konformation der NTD verändern (Brodie und McEwan, 2005).

Funktionell gesehen stellt die NTD die Hauptaktivierungsdomäne des Rezeptors dar, die sogenannte Activation-Function-1 (AF1) (Mc Ewan *et al.*, 2007). Innerhalb der AF1 wurden zwei überlappende Kern-Regionen lokalisiert, die im Besonderen die Transaktivierung beeinflussen (Jenster *et al.*, 1995). Transcription-Activation-Unit-1 (Tau-1) liegt zwischen Aminosäure (AS) 101 und 370 und ist für die Transaktivierung des ganzen AR wichtig. Tau-5 erstreckt sich von AS 360 bis 529 und ist auch unabhängig von der LBD aktiv. Die Wechselwirkungen zwischen den LXXLL-Motiven von p160-Kofaktoren und der AF2 sind relativ schwach. Stattdessen können die Kofaktoren mit hoher Affinität über eine glutaminreiche Region (Qr) mit der Tau-5 der AR-NTD interagieren (siehe Abb. 7; Bevan *et al.*, 1999, Christiaens *et al.*, 2002). Für die ungestörte Funktion des AR sind sowohl Tau-1 als auch Tau-5 entscheidend (Callewaert *et al.*, 2006).

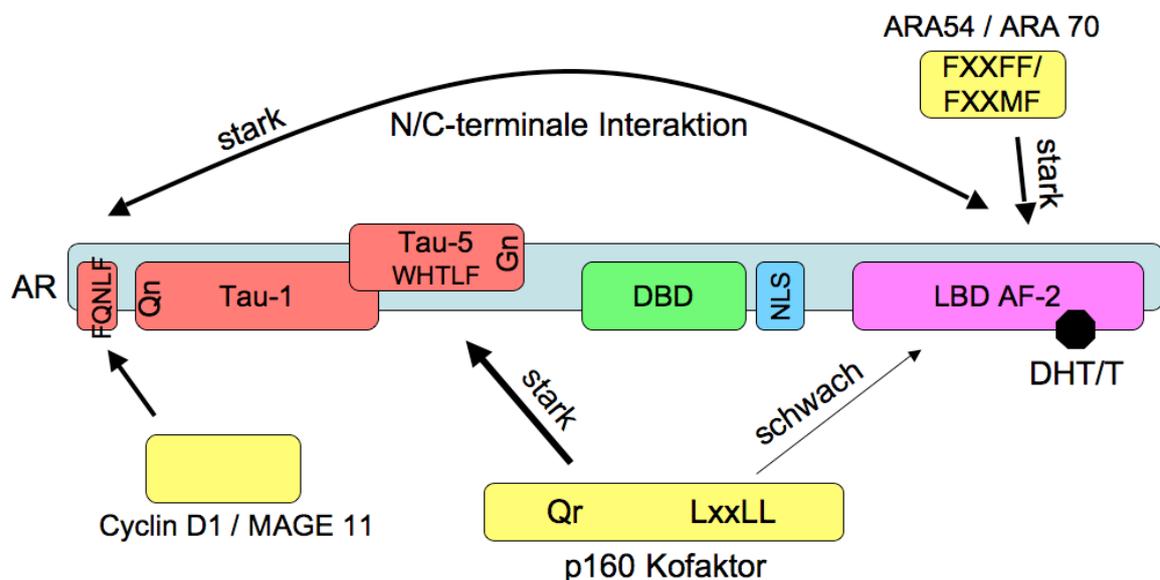


Abb. 7 Funktionelle Untereinheiten des AR-Proteins (modifiziert nach Claessens *et al.*, 2008)

Schematische Darstellung des AR mit NTD (rot), DBD (grün) und LBD (violett). Kofaktoren sind gelb dargestellt. Tau-1 mit einem Glutamin-Repeat (Qn) und Tau-5 mit einem Glycin-Repeat (Gn) stellen die beiden transaktivierenden Untereinheiten der NTD dar. Durch die Bindung von DHT/Testosteron an die LBD wird die AF2 aktiviert und kann mit Kofaktoren interagieren. Die Interaktion mit dem FQNLF-Motiv der NTD (N/C-terminale Interaktion) und FXXFF/FXXMF-Motiven von Kofaktoren ist stark (oben). LXXLL-Motive von p160-Koaktivatoren binden nur schwach an die AF2. Eine stärkere Interaktion wird über eine glutaminreiche Sequenz (Qr) und das WHTLF-Motiv der Tau-5 in der NTD ausgebildet. Cyclin D1 und MAGE 11 interagieren direkt mit dem FQNLF-Motiv der NTD.

Die ersten 25 Aminosäuren der NTD enthalten in einem α -helikalen Abschnitt das $^{23}\text{FQNLF}^{27}$ -Motiv (He *et al.*, 2004). Dieses bindet als rundliche Struktur an der Kofaktorbindungsgrube der LBD und bildet dadurch eine N/C-Interaktion aus. Für diese Interaktion

sind auch die angrenzenden Aminosäuren der NTD entscheidend (Steketee *et al.*, 2002). Einige Kofaktoren, wie z.B. MAGE-11 und Cyclin D1, interagieren mit dem AR direkt über die Bindung an das ²³FQNLF²⁷-Motiv der NTD (Bai *et al.*, 2005; Burd *et al.*, 2005).

⁴³³WHTLF⁴³⁷, ein ähnliches Motiv, befindet sich in der Tau-5 der NTD. Es wurde auch als potentielle Region für die N/C-Interaktion vermutet, zeigte allerdings im Unterschied zu ²³FQNLF²⁷ eine sehr viel geringere Affinität zur LBD (He *et al.*, 2000). In einer Studie von Dehm *et al.* (2007) wurde die Tau-5 analysiert und das ⁴³³WHTLF⁴³⁷-Motiv als wichtigstes transaktivierendes Element definiert. Studien von Need *et al.* (2009) zeigten, dass die Aminosäuren 501-535 der NTD sowie die Aminosäure E895 für die Interaktion mit Kofaktoren und die Ausbildung der N/C-Interaktion eine Rolle spielen, die sich in klassischen Reporterstudien mehr zeigte als an Promotoren, die in Chromatin integriert waren.

3.4 Die N/C-terminale Interaktion

Die N/C-terminale Interaktion ist ein komplexer dynamischer Vorgang, der wichtig für die Funktion des AR *in-vivo* ist (Claessens *et al.*, 2008). Durch die Interaktion zwischen N- und C-Terminus wird die Ligandendissoziationsrate gesenkt und der Abbau des AR-Proteins aufgehalten (Dubbink *et al.*, 2004; He *et al.*, 2001). *In-vitro* wird die Transaktivierungsfunktion des AR durch die N/C-Interaktion verstärkt. Das Ausmaß der Steigerung ist von der Art des verwendeten Promotors abhängig (Callewaert *et al.*, 2003). Schon 1998 vermuteten Langley *et al.* eine fehlende N/C-terminale Interaktion als Ursache für AIS bei den LBD-Mutationen V889M und R752Q.

Es existieren verschiedene Modelle der N/C-terminalen Interaktion. Im klassischen Fall ist, im Sinne einer direkten N/C-Interaktion, die Androgen-abhängige Interaktion zwischen der AF2 der LBD und dem ²³FQNLF²⁷-Motiv der NTD gemeint. Über die AF2 der LBD wird außerdem die Interaktion verschiedenster Kofaktoren vermittelt. Die Ergebnisse neuerer Studien sprechen dafür, dass beide Vorgänge an der AF2 kompetitiv ablaufen, sich aber von der Funktion unterstützen, indem sie zeitlich und örtlich versetzt passieren (Need *et al.*, 2009; Centenera, 2008). Ein zweites Modell geht von einer indirekten N/C-Interaktion aus, bei der Kofaktoren als „Brücke“ N- und C-Terminus des AR in räumliche Nähe bringen. Bestimmte Kofaktoren können die N/C-Interaktion steigern oder sind in der Lage bei ARs, die zunächst keine N/C-Interaktion ausbilden, durch ihre Anwesenheit *in-vitro* eine N/C-Interaktion herzustellen (Shen *et al.*, 2005).

Durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer(FRET)-Analysen konnte gezeigt werden, dass die N/C-Interaktion im Zellkern, vor der Bindung des AR an seine Zielgene stattfindet (Schaufele *et al.*, 2005; van Royen *et al.* 2007). Dabei könnte die N/C-Interaktion den AR vor unspezifischer Bindung mit Kofaktoren schützen. Es ist sowohl eine Dimerisierung von zwei Rezeptoren, über eine N/C-terminale Interaktion zwischen der NTD des einen und

der LBD des zweiten Rezeptors, als auch ein intramolekularer Ringschluss eines einzelnen AR beobachtet worden (Schaufele *et al.*, 2005). Klock *et al.* (2007) detektierten eine N/C-terminale Interaktion bei aktiven und an AREs angelagerten Androgenrezeptoren. Die intramolekulare Interaktion eines einzelnen Rezeptors war dabei erheblich stärker als intermolekulare Interaktionen. *In-vivo* Analysen von Li *et al.* (2006) zeigten, dass eine funktionierende N/C-Interaktion vor allem bei der Expression von in Chromatin integrierten Genen entscheidend ist. Die N/C-Interaktion ist nötig, um bestimmte Chromatin-modulierende Komplexe zu rekrutieren, die die Bindung des Rezeptors an seine AREs ermöglichen.

3.5 Mutationen des AR

Mutationen im AR-Gen sind mit AIS, Spinobulbärer Muskelatrophie vom Typ Kennedy oder mit Prostatakarzinomen assoziiert. In der AR-Datenbank (www.mcgill.ca/androgendb) sind bisher über 500 verschiedene Mutationen registriert. Es werden größere Strukturdefekte des Gens (wie komplette oder partielle Gen-Deletionen), Splicesite-Mutationen, (bei denen die mRNA durch Intron-Mutationen fehlerhaft gespleißt wird), kleine Basen-Deletionen, Punktmutationen und Expansionen der Trinukleotid-Repeat-Sequenzen beschrieben (Quigley *et al.*, 1995). In allen 8 Exons wurden Mutationen nachgewiesen, die zu AIS führen.

Größere Strukturänderungen des AR resultieren fast ausschließlich in einem kompletten Funktionsausfall des AR, also einem CAIS. Auch Punktmutationen, die zu einem präterminalen Stoppkodon führen, sind mit CAIS assoziiert. Missense-Mutationen, bei denen es durch Basensubstitution zum Austausch einer einzelnen Aminosäure kommt, stellen die häufigste Mutationsform dar und wurden in allen Formen von AIS gefunden. Sie finden sich am häufigsten in der LBD und DBD und seltener in der NTD des AR (Gottlieb *et al.*, 2004). Mutationen in der LBD können die Hormonbindung stören oder die Interaktion mit Kofaktoren beeinflussen (Loy *et al.*, 2001). Mutationen der DBD greifen in die Translokation des aktivierten Rezeptors in den Zellkern ein oder inhibieren die DNA-Bindung, wodurch sie zu PAIS oder CAIS führen (Kawate *et al.*, 2005). In 70 % der Fälle wird AIS über eine Keimbahnmutation von der Mutter an die betroffenen Söhne weitergegeben. In 30 % der Patienten wird eine *De-Novo*-Mutation gefunden (Hiort *et al.*, 1998; Köhler *et al.*, 2005). Möglich ist das Auftreten der Mutation in einer einzelnen mütterlichen Eizelle oder durch das Bestehen eines Keimzellmosaiks der Mutter. Findet die Mutation während der Embryonalentwicklung statt, besteht ein somatisches Mosaik. Je nachdem in welchem Stadium sich die Mutation ereignet, sind unterschiedlich viele Körperzellen betroffen. Das klinische Bild kann dadurch variieren. CAIS-Mutationen können klinisch als PAIS in Er-

scheinung treten, da der Wildtyp-Androgenrezeptor in den nicht betroffenen Zellen androgene Wirkung vermitteln kann (Holterhus *et al.*, 1997).

4. Zielsetzung und Fragestellungen

Die klinische Diagnose eines AIS in Kombination mit dem Nachweis einer Mutation im Gen des AR stellt noch keinen endgültigen Beweis für eine Funktionseinschränkung des Androgenrezeptors dar. Hierfür sind weiterführende Analysen notwendig. Bei einigen Mutationen des AR ist der molekulare Mechanismus des Rezeptordefektes eindeutig. Liegt ein präterminales Stoppkodon vor, resultiert daraus ein instabiler, durch Androgene nicht zu aktivierender Rezeptor. Viele bekannte Aminosäuresubstitutionen in der LBD zerstören die Integrität der Ligandenbindungsgrube direkt, verhindern somit ebenfalls die Hormonbindung und die Aktivierung des AR. Einige Mutationen in der DBD verändern die Konformation der Zinkfinger, sodass die Anlagerung an AREs vor Zielgenen verhindert wird. In den beschriebenen Fällen liegt ein vollständiger Funktionsverlust des AR vor, der mit CAIS assoziiert.

In vielen Fällen ist die Auswirkung einer Mutation auf die molekulare Funktion des AR jedoch nicht genau bekannt. Zu diesen Mutationen gehören CAIS-Mutationen der LBD, die eine normale Hormonbindung zulassen, und die meisten PAIS-Mutationen. Die Kenntnis der Pathologie ist im Hinblick auf den Umgang mit einzelnen Patienten, Therapieempfehlungen und Therapieaussichten entscheidend. Deshalb ist es Ziel dieser Arbeit, die Funktionalität mutierter Rezeptoren durch *in-vitro* Analysen differenziert zu untersuchen und eine Charakterisierung der Mutationen im Hinblick auf die Korrelation zwischen Funktion und Phänotyp darzustellen.

4.1 Vorstellung der zu untersuchenden Mutationen

Es wurden acht natürlich vorkommende Mutationen des Androgenrezeptors, die zum Großteil dem Lübecker Patientenkollektiv entstammen, ausgewählt (siehe Abb. 8). Im Vordergrund stand hierbei, dass die mutierten Rezeptoren eine normale maximale Hormonbindung aufwiesen.

Drei Mutationen befinden sich in der NTD und wurden in Patienten mit einem klinisch diagnostizierten PAIS entdeckt. S411N und S432F sind Missense-Mutationen und Δ 409-411 ist eine Deletion von 9 Basenpaaren, die zum Verlust von 3 Aminosäuren im AR-Protein führt. In Reportergen-Assays konnte für die Mutation S432F eine Einschränkung der Rezeptorfunktion nachgewiesen werden, während die Ursache des PAIS bei den anderen Mutationen ungeklärt blieb. Die drei Patienten wurden im männlichen Geschlecht

erzogen. Die Mutation $\Delta 409-411$ wurde auch bei dem Zwillingbruder des betroffenen Patienten festgestellt, der klinisch keinen Hinweis auf ein partielles AIS gab.

Die übrigen untersuchten Mutationen sind in der LBD des Rezeptors lokalisiert. Die Mutation L712F ist eine PAIS-Mutation mit einer auffallend großen Variationsbreite des Phänotyps, auch innerhalb derselben Familie. Sie liegt am Rand der Kofaktorbindungsgrube der AF2. Die Funktionseinschränkung des AR konnte *in-vitro* an unterschiedlichen Promotoren eindeutig nachgewiesen werden (Werner *et al.*, 2006). Während keine Einschränkung in der maximalen Hormonbindung vorliegt, ist die Dissoziationskonstante im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Holterhus *et al.*, 2000).

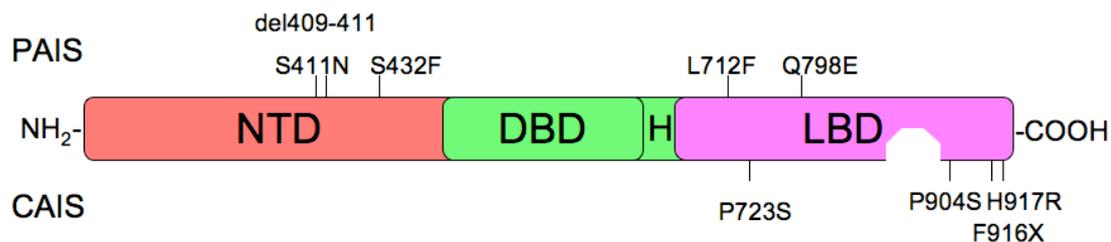


Abb. 8 Verteilung der acht zu untersuchenden Mutationen im AR-Protein

In dieser Arbeit wurden 8 natürlich vorkommende Mutationen des AR, die eine Hormonbindung zulassen, ausgewählt. Oberhalb des Proteins sind die PAIS-Mutationen abgebildet. Drei befinden sich in der NTD und zwei in der LBD des AR. Unterhalb des Proteins sind die CAIS-Mutationen gekennzeichnet. Sie befinden sich in der LBD. Die Mutation F916X diente der Negativkontrolle, da sie die Hormonbindung unterbindet.

Die Mutation Q798E wurde in unabhängigen Fällen von PAIS und MAIS nachgewiesen. In zwei Fällen mit intersexuellem Genital wurden die Patienten als Mädchen erzogen (Batch *et al.*, 1992; Quigley *et al.*, 1995). Die gleiche Mutation wurde auch bei drei Männern mit Infertilität (Wang *et al.*, 1998; Ferlin *et al.* 2006; Hiort *et al.* 2000a) und als somatische Mutation in zwei Fällen von Prostatakarzinomen detektiert (Evans *et al.*, 1996; Castagnoro *et al.*, 1993). Die Mutation befindet sich zwischen Helix 7 und 8 der LBD. In *in-vitro* Studien konnte eine normale Hormonbindung und eine ebenfalls normale Dissoziationskonstante des mutierten Rezeptors detektiert werden. Die Transaktivierungsfunktion des Rezeptors ist allerdings im Vergleich zum Wildtyp eingeschränkt (Bevan *et al.*, 1996). Jääskeläinen *et al.* (2006) untersuchte die N/C-terminale Interaktion im Androgenrezeptor der Ratte und stellte keine Einschränkung durch die Mutation Q798E fest.

Drei der untersuchten Mutationen sind mit CAIS assoziiert. Die Mutation P723S befindet sich in der Verbindung zwischen Helix 3 und 4, P904S am Ende von Helix 12 und H917R im C-Terminus des AR. Die Position P904 ist unter den Steroidhormonrezeptoren konserviert. An derselben Stelle wurden außerdem zwei weitere CAIS-Mutationen, P904V und

P904H detektiert (Melo *et al.*, 2003). Song *et al.* (2003) detektierten eine gestörte Interaktion des Rezeptors mit P904S mit einigen Kofaktoren und der AR-NTD.

Der AR mit der Mutation F916X wurde als Negativ-Kontrolle verwendet. Durch ein präterminales Stoppkodon an Position 916 fehlen die letzten 4 Aminosäuren des Rezeptors. Da das C-terminale Ende des AR für die Hormonbindung entscheidend ist (Tahiri *et al.*, 2001), kann dieser Rezeptor nicht Androgen-abhängig aktiviert werden. Verschiedene natürlich vorkommende Mutationen in dieser Region des AR führen zu CAIS (Ahmed *et al.*, 2003).

4.2 Fragestellungen

Wird klinisch eine Androgenresistenz diagnostiziert und eine Mutation im Gen des AR nachgewiesen, kann nicht automatisch auf eine eingeschränkte Rezeptorfunktion geschlossen werden. Es ist denkbar, dass eine stumme Mutation oder ein Polymorphismus vorliegt und zusätzlich eine andere Ursache für eine verminderte Virilisierung vorhanden ist. Um einen Rezeptordefekt nachzuweisen, hat es sich daher etabliert, funktionelle Analysen durchzuführen. In dieser Arbeit sollen die acht beschriebenen Mutationen in Reporter-Gen-Assays im Hinblick auf eine Einschränkung der Rezeptorfunktion untersucht und mit dem Wildtyp-Rezeptor verglichen werden.

Die biologische Funktion des Androgenrezeptors ist ein komplexes Zusammenspiel der Funktionen seiner drei Domänen. Sie gliedert sich unter anderem in Hormonbindung, DNA-Bindung und Interaktion mit regulatorischen Proteinen. In dieser Arbeit soll durch die kombinierte Analyse verschiedener Funktionen des Androgenrezeptors versucht werden, die Funktionalität der mutierten Rezeptoren in einem möglichst breiten Spektrum zu charakterisieren. Ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge wäre hilfreich im therapeutischen Management der Betroffenen und könnte Therapieentscheidungen erleichtern.

Drei funktionelle Analysen des AR wurden im Zellmodell durchgeführt:

1. Analyse der Funktion als Transkriptionsfaktor

Der AR fungiert als Androgen-abhängiger Transkriptionsfaktor, dessen Hauptaufgabe die Regulation seiner Zielgene ist. Zunächst wurde daher die Fähigkeit der mutierten Rezeptoren, die Transkription Androgen-abhängiger Gene einzuleiten, untersucht. Hierzu wurden die Mutationen in ein Androgenrezeptor-Expressionsplasmid kloniert. Durch Transfektion wurden die Plasmide der mutierten ARs in Säugerzellen gebracht und die Transaktivität an Androgen-abhängigen Promotoren in Abhängigkeit von DHT untersucht.

Da sich die Promotoren der Zielgene *in-vivo* von Gen zu Gen unterscheiden, wurde das Verhalten in den Reporter-gen-Assays ebenfalls an verschiedenen Androgen-abhängigen Promotoren analysiert. Es war zu untersuchen, ob sich eine Mutation an einem definierten Promotor stärker bemerkbar macht als an einem anderen. Dieses würde bedeuten, dass die Expression bestimmter Gene *in-vivo* stärker durch eine Mutation verändert würde, als die Expression anderer Gene. Eine solche Beobachtung könnte bestehende Schwierigkeiten in der Korrelation zwischen Mutation und Phänotyp erklären.

Die folgenden Fragen standen im Vordergrund:

- Ist der mutierte Rezeptor in der Lage, in der Anwesenheit von DHT die Transkription von Zielgenen zu initiieren?
- Ist die Transaktivierung mit der des Wildtyps vergleichbar oder abgeschwächt?
- Kann die Rezeptorfunktion durch erhöhte Hormonkonzentrationen wiederhergestellt werden?
- Sind Unterschiede zwischen verschiedenen Promotoren festzustellen, oder verhalten sich die mutierten Rezeptoren an jedem Promotor ähnlich?

2. Analyse der Interaktion zwischen N- und C-Terminus

Die für den AR typische Interaktion zwischen NTD und LBD ist, wie oben beschrieben, für die Funktion des AR entscheidend. Sie stabilisiert den AR nach der Hormonbindung und ist wichtig bei der Regulation von in Chromatin integrierten Genen. Um die Auswirkungen der acht Mutationen auf die N/C-terminale Interaktion zu untersuchen, wurde diese in einem Zellmodell isoliert untersucht. Hierzu wurde ein Mammalia-Two-Hybrid-Assay eingesetzt. Die Mutationen wurden in die Expressionsplasmide von Two-Hybrid-Vektoren kloniert. Nach der Transfektion in Säugerzellen wurde durch die Interaktion zwischen N- und C-Terminus die Transkription eines Reportergens initiiert.

Es stellten sich die folgenden Fragen:

- Ist eine Interaktion zwischen mutierter LBD und Wildtyp-NTD oder mutierter NTD und Wildtyp-LBD nachweisbar?
- Ist diese im Vergleich zum Wildtyp verändert?
- Können höhere Hormonkonzentrationen die Interaktion zwischen NTD und LBD verbessern?

3. Interaktion mit Kofaktoren

Kofaktoren sind direkt an der Funktion des AR beteiligt, indem sie in allen Zuständen direkt oder indirekt auf ihn einwirken. Sie stabilisieren beispielsweise den inaktiven Rezeptor oder rekrutieren über Protein-Protein-Komplexe die RNA-Polymerase II. Um festzustellen, ob die in der LBD befindlichen Mutationen Unterschiede in der Kofaktorinteraktion aufweisen, wurde im Zellmodell exemplarisch die Interaktion mit zwei strukturell unterschiedlichen Kofaktoren, SRC1e und BAG1L, untersucht. SRC1e gehört zur Familie der p160 Koaktivatoren. Es interagiert über ein LXXLL-Motiv mit der AF2 der LBD und verstärkt dadurch die Transaktivierungsfunktion des AR (Ma *et al.*, 1999; Dubbink *et al.*, 2004). BAG1L gehört zu einer Gruppe von Kochaperonen, die die Funktion von Steroidrezeptoren regulieren (Froesch *et al.*, 1998). Der AR kann sowohl über die NTD als auch über die LBD mit BAG1L interagieren und steigert durch seine Interaktion die Transaktivierungsfunktion des AR (Shatkina *et al.* 2003). Im Unterschied zu SRC1e besitzt BAG1L kein klassisches LXXLL-Motiv. Im Zellmodell wurde die Interaktion zwischen isolierter LBD mit Mutation und jeweils einem der beiden Kofaktoren untersucht.

Die folgenden Fragen sollten beantwortet werden:

- Findet eine Interaktion zwischen mutierter LBD und Kofaktor statt?
- Können erhöhte DHT-Konzentrationen die Kofaktorinteraktion der mutierten LBDs stabilisieren?

II Material und Methoden

1. Materialien

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Apparaturen sowie ihrer zugehörigen Bezugsquellen mit Standorten befindet sich im Anhang (Anhang 1.). Von der Aufzählung ausgenommen sind Verbrauchsmaterialien, Geräte, Apparaturen und sonstige Hilfsmittel, die zur Standardausrüstung eines Labors gehören.

Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von New England BioLabs (USA) bezogen und nach den Empfehlungen des Herstellers mit den zugehörigen Puffern eingesetzt. Die in Sequenzierung und PCR verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Aus der Stocklösung (100 pmol/ μ l) wurden mit Aqua dest. im Verhältnis 1:5 Arbeitsverdünnungen mit 20 pmol/ μ l hergestellt.

1.1 Mammalia-Zellen

1.1.1 Chinesische-Hamsterovar-Zellen

In den Transfektionsversuchen wurde die Zelllinie CHO-K1 verwendet, die freundlicherweise von Dr. A. O. Brinkmann von der Erasmus Universität Rotterdam zur Verfügung gestellt wurde. Die Zelllinie ist ein Subklon der CHO-Zelllinie, die 1957 bei der Ovarbiopsie eines adulten Chinesischen Hamsters gewonnen wurde. Die Zellen wachsen adhären, ihre Verdopplungszeit beträgt 24 h. Sie lassen sich unter einfachen Bedingungen kultivieren (siehe 2.5.1).

1.1.2 HeLa-Zellen

HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen aus einem Zervixkarzinom, das 1951 bei einer 31-jährigen afroamerikanischen Frau (Henrietta Lacks) biopsiert wurde. Es ist die erste aneuploide permanent kultivierte menschliche Zelllinie. Die HeLa-Zellen wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) erworben. Sie vermehren sich mit einer Verdopplungszeit von 48h und wurden in den Transfektionsversuchen unter einfachen Kulturbedingungen angezogen (siehe 2.5.1).

1.2 Bakterienzellen

Für die Klonierungen wurden DH5 α F' *E. coli* (Genotyp: F'/endA1 hsdR17 ($r_k^- m_k^+$) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF) U169 deoR (ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15)) und One Shot[®] Top10 Chemically Competent *E. coli* (Genotyp: F' *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*))

$\phi 80/lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$ der Firma Invitrogen Life Technologies (USA) verwendet.

1.3 Plasmide

1.3.1 Der Androgenrezeptor Expressionsvektor pSVAR0

Die cDNA des Androgenrezeptors mit 20 Glutamin (Q) und 16 Glycin (G) Wiederholungen wird über einen vorgeschalteten frühen Promotor des Simianen Virus 40 (SV40) in Säugerzellen stark exprimiert. Ein Ampicillin-Resistenzgen ermöglicht die Selektion der Plasmid-herstellenden *E. coli* und somit die Bereitstellung der Plasmide für die Transfektionen. Der pSVAR0 Vektor wurde freundlicherweise von Brinkmann *et al.* zur Verfügung gestellt, die diesen 1989 beschrieben hatten.

Auf der Grundlage des Wildtyp-Vektors, pSVAR0 (Q20, G16), wurden Vektoren mit verschiedenen Mutationen im Leserahmen des Androgenrezeptors konstruiert. Die Namen beziehen sich auf den Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren (Anhang 8.), und die Nummerierung der Aminosäuren lehnt sich an die 1989 von Lubahn *et al.* vorgestellte Sequenz des Androgenrezeptors an. In den Versuchen fanden die folgenden Vektoren Verwendung: pSVAR mit den N-terminalen Mutationen ²³FQNAA²⁷, $\Delta 409-411$, S411N, S432F, pSVAR mit zwei N-terminalen Mutationen: pSVAR ²³FQNAA²⁷ in Kombination mit den drei anderen N-terminalen Mutationen, pSVAR mit den C-terminalen Mutationen L712F, L723S, Q798E, P904S, F916X, H917R und die Doppelmutante pSVAR ²³FQNAA²⁷ + L712F. Eine Plasmidkarte des pSVAR0(Q20, G16)-Vektors mit Kennzeichnung der Mutationsstellen und eine tabellarische Auflistung der verwendeten pSVAR-Varianten ist im Anhang zu finden (Anhang 3.1 und 4.1).

1.3.2 Reporter Gene

Reporter Gene werden verwendet, um bestimmte koregulatorische Eigenschaften von Proteinen aufzuzeigen. Durch Transfektion werden die cDNA der zu untersuchenden Proteine und die Reporter Gene in eukaryotische Zellen eingebracht. Je nach Versuchsaufbau ermöglicht letztendlich die Quantifizierung der Transkription des Reportergens eine Interpretation der untersuchten Proteineigenschaften. Die in den beschriebenen Versuchen eingesetzten Reporter Gene besitzen jeweils eine spezifische Promotorregion, die durch den Androgenrezeptor aktiviert werden kann. Hinter dieser Promotorregion liegt das Luziferasegen des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (luc, 2387bp). Luziferasen sind Enzyme, die die Oxidation von Substraten, sogenannten Luziferinen, katalysieren. Die Leuchtkäfer-Luziferase benötigt für diese Reaktion den Kofaktor ATP. Das entstehende Produkt ist instabil. Beim Zerfall wird Licht emittiert, das mit Hilfe eines Lumino-

meters detektiert werden kann (Greer *et al.*, 2002). Da der Androgenrezeptor die Expression und damit die Biosynthese der Luziferase aktiviert, ermöglicht die nach Substratzugabe gemessene Lichtmenge einen Rückschluss auf die Höhe der Rezeptoraktivität. Eine Übersicht der Promotorregion der nachfolgend beschriebenen Reportergene stellt Abb. 9 dar.

(ARE)₂-TATA-Luc

Die Promotorregion von diesem Vektor besteht aus zwei Androgen-responsiven Elementen (AREs) und einer TATA-Box. Über diesen Promotor wird die cDNA der Leuchtkäfer-Luziferase androgen-abhängig exprimiert. Der (ARE)₂-TATA-Luc Vektor wurde uns von G. Jenster *et. al.* zur Verfügung gestellt und war 1997 von diesen beschrieben worden.

MMTV-Luc

Der MMTV-Luc Vektor wurde von Organon (West-Orange, NJ, USA) bezogen. Die Promotorregion aus dem Mouse-Mammary-Tumor-Virus (MMTV) ist wie folgt aufgebaut: Am weitesten distal liegen vier Hormon-responsive Elemente, es folgen Bindungsstellen bestimmter Kofaktoren (NF-1, Oct-1) sowie eine TATA-Box (Truss und Beato, 1993). Über diesen Promotor kann das Gen der Leuchtkäfer-Luziferase durch verschiedene intrazelluläre Rezeptoren, wie auch den AR, aktiviert werden.

PB-Luc

Das Reportergen PB-Luc exprimiert das Gen der Leuchtkäfer-Luziferase über den Ratten-Probasin-Promotor. Probasin ist ein nukleäres und sekretorisches Protein, das in der dorsolateralen Prostata der Ratte Androgen-abhängig exprimiert wird. Der Promotor besteht aus zwei AREs, die zusammen die Anlagerung des AR und damit die Androgen-kontrollierte Expression des Leuchtkäfer-Luziferasegens ermöglichen (Rennie *et al.*, 1993). Der 454 bp umfassende Promotorbereich wurde durch PCR amplifiziert und über einen partiellen Verdau mit *KpnI/HindIII* in den pGL3-Classic Vektor von Promega integriert.

Pem-Luc

Pem-Luc ist ein Reportergen, das uns freundlicherweise von F. Claessens (Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellt wurde. Der proximale Promotor des Pem-Homeobox-Transkriptionsfaktors der Maus war über die Schnittstellen *NheI* und *HindIII* in den pGL3-Basic-Vektor von Promega integriert worden. Die Expression des Pem-Homeobox-Transkriptionsfaktors findet vor allem im Reproduktionstrakt der Maus, in den Sertolizellen des Hodens und den Nebenhoden, aber auch im Muskel und in der Plazenta statt (Barbu-

lesco *et al.*, 2001, Lindsey und Wilkinson, 1996). Der Promotor enthält zwei Androgen-responsive Elemente, ARE1 und ARE2, und wird durch den AR selektiv aktiviert (Denolet *et al.*, 2006).

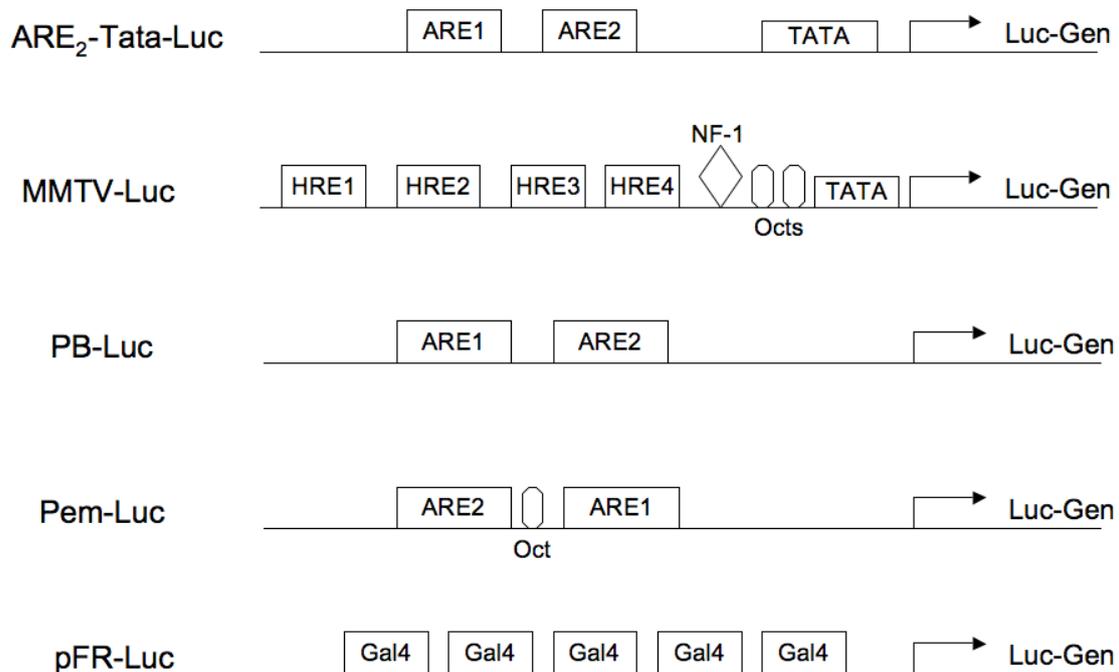


Abb. 9 Überblick über die Promotorregion der verwendeten Reporter Gene

(ARE)₂-TATA-luc, PB-Luc und Pem-Luc haben in ihrer Promotorregion spezielle Androgen-responsive Elemente (AREs), an die sich die DBD des AR anlagert und dadurch die Expression des nachfolgenden Luziferasegens (luc-Gen) in Gang setzt. Der MMTV-Luc (dargestellt nach Beato und Truss, 1993) besteht aus Hormon-responsiven Elementen, an die Glukokortikoid-, Progesteron-, Mineralokortikoid- und Androgenrezeptoren binden können. Der Promotor von pFR-Luc setzt sich aus fünf Hefe-Gal4-responsiven Elementen zusammen. Die DBD-LBD Two-Hybrid-Proteine können mit der DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Proteins Gal4 an den Promotor binden und durch Protein-Protein-Interaktionen die Expressionskaskade des Luziferasegens starten.

1.3.3 Renilla-Luziferase

Der phRG-TK Vektor von Promega (USA) kodiert für ein Luziferasegen (ruc, 1196bp) aus dem Nesseltier *Renilla reniformis*. Das Luziferasegen wird über einen Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase(HSV-TK)-Promotor konstitutiv exprimiert. Diese Luziferase wird somit, im Gegensatz zu den Reporter Genen, unabhängig von Hormon und Androgenrezeptor synthetisiert. Die Kotransfektion mit diesem Vektor ermöglicht daher eine Normalisierung nach der Transfektionseffizienz.

1.3.4 Two-Hybrid-Plasmide

Die verwendeten Two-Hybrid-Plasmide basieren auf den Vektoren des Mammalian-Assay-Kits von Stratagene (La Jolla, USA). Im Anhang befinden sich Plasmidkarten des pAD-NTD- und pBD-LBD-Vektors (Anhang 3.2 und 3.3) und eine tabellarische Auflistung der verwendeten Vektoren (Anhang 4.2. und 4.3).

pAD-NTD-Vektoren

Der pAD-NTD-Vektor enthält die Transkriptionsaktivierungsdomäne des Maus NF- κ B Gens (AS 364-550) und konsekutiv im Leseraster die N-terminale Domäne des AR (AS 1-536). Ein konstitutiv aktiver CMV-Promotor bedingt eine starke Expression dieses Fusionsgens nach Transfektion in Säugerzellen. Eine SV40 poly A-Sequenz signalisiert die Beendigung der Transkription und ist für die Polyadenylierung der mRNA wichtig. Durch Proteinbiosynthese entsteht ein Fusionsprotein aus der Transkriptionsaktivierungsdomäne von NF- κ B und der AR-NTD. Die nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) des großen T-Antigens (PKKKRKV) von SV40 ermöglicht den Transport des Fusionsproteins in den Zellkern. Ein pUC Replikationsursprung und ein Ampicillin-Resistenzgen ermöglichen die Vervielfältigung des pAD-NTD-Plasmids in *E. coli*. In den Versuchen finden die folgenden Vektoren Verwendung: pAD-NTD Wildtyp (Q20, G16; AR 1-536) und pAD-NTD mit den Mutationen Δ 409-411, S411N und S432F sowie die Doppelmutanten pAD-NTD FQNAA (23-27) in Kombination mit den Mutationen Δ 409-411, S411N und S432F.

pBD-LBD-Vektoren

Der pBD-LBD-Vektor kodiert ebenfalls für ein Fusionsprotein, das in Säugerzellen synthetisiert wird. Ein konstitutiv aktiver CMV-Promotor kontrolliert die Expression des Fusionsgens aus der DNA-Bindungsdomäne des Gal4-Hefeproteins (AS 1-147) und der Liganden-Bindungsdomäne des AR (AS 644-919). Eine SV-40-poly-A-Sequenz liefert das Signal für die Beendigung der Transkription des Fusionsproteins und ist für die Polyadenylierung der mRNA wichtig. Ein Kanamycin-Resistenzgen ermöglicht die selektive Vervielfältigung der Vektoren in *E. coli*. In den Versuchen finden die folgenden Vektoren Verwendung: pBD-LBD Wildtyp und pBD-LBD mit den folgenden Mutationen: L712F, L723S, Q798E, P904S, F916X und H917R.

Reportergen pFR-Luc

Der Vektor enthält einen synthetischen Promotor, der sich aus fünf hinter einander angeordneten Hefe-Gal4-Bindungsstellen zusammensetzt. Über diesen Promotor wird die Ex-

pression des dahinter liegenden Luziferasegens von *Photinus pyralis* kontrolliert (luc, 2387 bp; siehe Abb. 9).

Kontrollplasmide pBD-P53 und pAD-SV40T

Die Transfektion des pBD-P53-Vektors in Säugerzellen führt zur Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und den AS 72-390 des murinen p53-Proteins. Das pAD-SV40T-Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus der Transaktivierungsdomäne von NF- κ B und den Aminosäuren 84-708 des großen-T-Antigens von SV40. Werden beide Plasmide kotransfiziert, interagieren die beiden Fusionsproteine in den Säugerzellen miteinander und führen durch Anlagerung an die Gal4-responsiven Elemente des pFR-Luc-Reportergens zu einer Transkription der Leuchtkäfer-Luziferase. Für die Expression der Luziferase sind die in jeder Säugerzelle vorhandenen Transkriptionsfaktoren ausreichend, daher werden die Plasmide pBD-P53 und pAD-SV40T als Positivkontrolle verwendet. Die Kotransfektion von pBD-LBD mit pAD-SV40T, bzw. pBD-P53 mit pAD-NTD wurde in dieser Arbeit als Negativkontrolle verwendet. Diese Fusionsproteine können *in-vivo* nicht miteinander interagieren. Erst die spezifische Proteininteraktion zwischen Wildtyp-LBD und Wildtyp-NTD, oder auch P53 und SV40T, führt zu einer relevanten Expression des Reportergens.

1.3.5 Kofaktoren des Androgenrezeptors

BAG1L in pcDNA3

Der Vektor BAG1L in pcDNA3 wurde uns freundlicherweise von G. Packham (Southampton, UK) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung wurde in der Veröffentlichung von Cutress *et al.* (2003) beschrieben. In den Vektor ist die cDNA des Kofaktors BAG1L integriert. Dieser wird über einen CMV-Promotor nach Transfektion in Säugetierzellen stark exprimiert.

SRC1e in pSG5

Dieser Expressionsvektor von Dr. F. Claessens (Leuven, Belgien), beschrieben in Kalkhoven *et al.* (1998), enthält die vollständige Sequenz des Kofaktors SRC1e. Die Expression von SRC1e wird über einen SV40-Promotor reguliert.

1.3.6 Andere Plasmide

Füllplasmid pTZ 19

pTZ 19 ist ein synthetischer Klonierungsvektor der Firma GE Healthcare (Großbritannien). In den Transfektionsversuchen wurde er als Füllplasmid eingesetzt, da er in seiner hier

verwendeten Rohform in Säugetierzellen keine Genexpression initiiert. Ein Ampicillin-Resistenzgen ermöglicht die selektive Bakterienanzucht zur Vervielfältigung des Vektors.

Klonierungsvektor pCR[®] 4Blunt-TOPO[®]

Der pCR[®] 4Blunt-TOPO[®] Vektor wurde von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die Vektoren liegen in linearisierter Form vor. Jeweils das 3' Ende ist durch eine kovalent gebundene Topoisomerase I für die Ligation vorbereitet. Durch Ligation wurden PCR-Amplifikate ohne überhängende Enden in den Vektor integriert. Der Vektor enthält das für *E. coli* letale Gen *ccdB* in Fusion mit dem C-Terminus des LacZ α -Gens. Durch Einfügen eines PCR-Amplifikats wird die Expression des letalen Gens unterdrückt. Hierdurch wird eine direkte Selektion rekombinanter Vektoren erreicht. Eine Plasmidkarte dieses Vektors befindet sich im Anhang (Anhang 3.4).

2. Methoden

2.1 Bakterienkultur

2.1.1 Agarplatten für die Anzucht von Bakterienkulturen

Für die Bakterienanzucht wurden Agarplatten verwendet. Hierzu wurden 13 Kapseln LB Medium (QBiogene, USA) mit 7,5 g Select Agar (Invitrogen, USA) in 500 ml Aqua dest. bei 121 °C autoklaviert. Bevor der Agar in Petrischalen gegossen wurde, wurde er entweder mit 150 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin versetzt. Nach Abkühlen und Aushärten erfolgte die weitere Lagerung bei 4 °C.

2.1.2 Bakterienflüssigkulturen

Die Anzucht der Bakterien in Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium. Hierfür wurden 13 Kapseln (QBiogene, USA) mit 500ml Aqua dest. in einer Flasche bei 121 °C autoklaviert und nach dem Abkühlen verwendet. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C in einem Schüttelinkubator in Volumina von 10 ml mit 100 µg/ml Ampicillin, bzw. 50µg/ml Kanamycin, je nach Resistenz des Bakterienstammes. Wurde eine höhere Bakterienzahl benötigt, wurden die 10 ml Kulturen nach ungefähr sechs Stunden in Maxikulturen mit 250 ml LB-Medium mit der entsprechenden Menge Antibiotikum überführt.

2.1.3 Glycerolstocks zur Lagerung der Bakterienstämme

Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte in Glycerolstocks. Hierzu wurden zunächst 900 µl 60 %-iges Glycerol in 2 ml CryoTubes (Nunc) vorgelegt und bei 121 °C autokla-

viert. Bakterien wurden über Nacht in Flüssigkultur inkubiert. Am Folgetag wurden 900µl der Bakteriensuspension entnommen und mit dem vorgelegten Glycerol gut gemischt. Die Tubes wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.1.4 Herstellung von DH5αF' kompetenten *E. coli*

Kompetente *E. coli* wurden nach der „simple and efficient method“ (einfache und effiziente Methode) von Inoue *et al.*, 1990 hergestellt. Hierzu wurden DH5αF' *E. coli* aus den Glycerolstocks auf Agar ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht im Wärmeschrank (37 °C) inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde in eine 10 ml Vorkultur mit LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert (200rpm). 8 ml der Vorkultur wurden in 250 ml auf 37 °C erwärmtes SOB-Medium inklusive 20 mM Mg²⁺ (siehe Tbl. 2) für 1,5 bis 3 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6.

Nachdem sie für 10 min auf Eis gekühlt worden waren, wurden die Bakterien im vorgekühlten GS3 Rotor in der RC-5B-Superspeed-Zentrifuge (Sorvall, Fisher Scientific) bei 2700xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet mit 80 ml kaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6,7) auf Eis resuspendiert und wieder wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 20 ml kaltem TB-Puffer resuspendiert. Tropfenweise wurde 1,4 ml DMSO als Gefrierschutz (f.c. 7 %) zugegeben und die Suspension für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Jeweils 200 µl der Bakteriensuspension wurden in 1,5 ml Tubes gegeben. Die Tubes wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Folge bei -80 °C gelagert.

SOB-Medium (pH 7) für die Transformation von Bakterien	
Select Peptone / Tryptone	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Natriumchlorid	10 mM (0,5 g/l)
Kaliumchlorid	2,5 mM (0,2g/l)
2 M MgCl ₂ Lösung	20 mM (erst direkt vor Gebrauch zugeben)

Tbl. 2 SOB-Medium

2.1.5 DNA-Minipräparation

Dieses Verfahren wurde zur Isolation kleinerer Mengen Plasmid-DNA verwendet und kam zum Einsatz, um neue Plasmide durch anschließende Sequenzierung auf Fehler zu überprüfen. Die Bakterien wurden aus den Glycerolstocks oder nach Transformation auf Agar-

platten ausgestrichen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde dann in eine Flüssigkultur überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator angezüchtet. 1800 µl der Flüssigkultur wurden in ein 2 ml Tube pipettiert und in der Zentrifuge 5417R (Eppendorf) für eine Minute bei 20000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Plasmid DNA wurde, nach den Empfehlungen des Herstellers, mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) aus dem Pellet extrahiert. Mit diesem Verfahren konnten durchschnittlich ungefähr 3 µg Plasmid-DNA in 50 µl EB Puffer (10mM TrisCl, pH 8,5) isoliert werden.

2.1.6 Herstellung Endotoxin-freier Plasmid-DNA

Die durch Sequenzierung kontrollierte Plasmid-DNA wurde nun für die Transfektionen in größerer Menge und möglichst hoher Reinheit benötigt. Hierzu wurde das EndoFree-Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen) verwendet, bei dem die extrahierte DNA keine Endotoxine enthält. Die Bakterienanzucht auf Agarplatten und in Flüssigkultur erfolgte wie bereits beschrieben (siehe 2.1.1 bis 2.1.2). Die Maxikulturen wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 200 rpm inkubiert. In der RC-5B-Refrigerated-Superspeed-Zentrifuge mit GS3 Rotor von Sorvall® wurden die Maxikulturen für 20 Minuten bei 4 °C und 6000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das weitere Vorgehen erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Bei diesem Verfahren konnten durchschnittlich 500 µg Plasmid-DNA in 200 µl TE-Puffer extrahiert werden. Die in den Versuchen verwendete Plasmid-Arbeitsverdünnung wurde mit TE-Puffer aus dem EndoFree-Plasmid-Maxi-Kit hergestellt. Die Lagerung der Endotoxin-freien Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.1.7 Photometrische Bestimmung der DNA

Die DNA-Konzentration sowie der Reinheitsgrad der Mini- und Maxipreps wurde in Verdünnung mit TE-Puffer (EndoFree-Maxi-Kit, Qiagen) mit dem Bio-Photometer (Eppendorf) bestimmt. Die Absorption von DNA, RNA, Oligo- und Mononukleotiden wird bei 260 nm detektiert. Bezogen auf eine Küvettenschichtdicke von 1 cm entspricht eine Absorption von 1 OD bei 260 nm ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Da Proteine bei 280 nm absorbieren, können Verunreinigungen durch die Ratio E_{260}/E_{280} abgeschätzt werden. Bei reiner DNA sollte der Quotient 1,8 betragen.

2.2 Sequenzierung der Plasmid-DNA

2.2.1 Sequenzierung nach der Didesoxymethode

Die Didesoxymethode nach Sanger ist ein Verfahren zur Analyse von DNA-Sequenzen, das auf dem Prinzip des Kettenabbruchs beruht. Im Puffer liegen dNTPs und je nach Ba-

se unterschiedlich fluoreszenzmarkierte ddNTPs in einem bestimmten Verhältnis vor. Wird in den neu synthetisierten Strang ein ddNTP, das keine 3'OH-Gruppe besitzt, eingebaut, bewirkt dies den Kettenabbruch. Nach der Fällung kann die DNA über die fluoreszierenden Farbstoffe der abgebrochenen Stränge analysiert werden. Die Sequenzierungen wurden mit dem BigDye®-Terminator-v1.1-Cycle-Sequencing-Kit (ABI, USA) nach den Empfehlungen des Herstellers, durchgeführt. Das verwendete PCR-Programm ist im Anhang (Anhang 7.) dargestellt. In einem Thermocycler erfolgte die Strangsynthese zyklisch ausgehend von einem Primer.

2.2.2 Fällung der DNA

Zum 20 µl Sequenzierungsansatz wurden 80 µl Aqua dest., 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 5) und 250 µl Ethanol (100 %) zugegeben und gemischt. Die Probe wurde für 10 min bei 18000xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden nun 180 µl Ethanol (70 %) pipettiert, das Pellet resuspendiert und wieder 10 min bei 17949 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde die DNA bei 37 °C getrocknet.

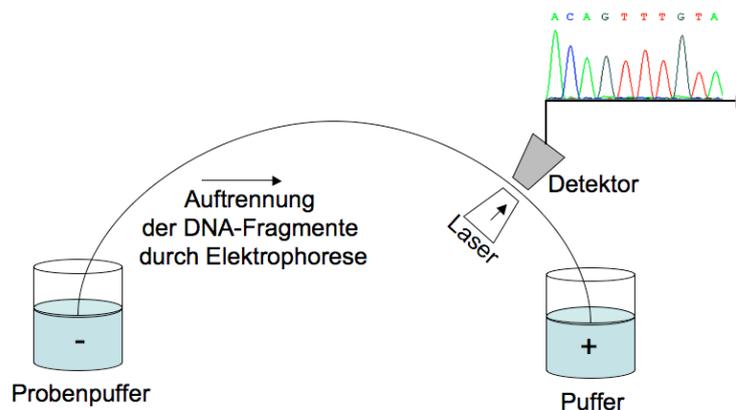


Abb. 10 Schematische Darstellung der Basen-Detektion im Kapillarsequenzierer

Die DNA-Fragmente aus der Sequenzierungsreaktion werden in der Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Laser detektiert. Jedes Fragment schließt mit einem ddNTP ab, das den Kettenabbruch bewirkt. Je nach Base sind die ddNTPs mit vier verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Somit kann die Farbinformation in die Basensequenz übersetzt werden. Im Chromatogramm (rechts oben) lassen sich die verschiedenen Basen zuordnen, die Höhe der Peaks korreliert mit der Signalstärke.

2.2.3 Analyse der Sequenz

Die Analyse der DNA erfolgte im 4-Kapillarsequenzierer 3130-Genetic-Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi). In diesem wurden die unterschiedlich langen DNA-Stränge elektrophoretisch aufgetrennt und der Fluoreszenzfarbstoff durch einen Laser detektiert (Abb. 10). Diese Informationen wurden in ein Chromatogramm übersetzt, das anschließend mit

der Software Sequence-Analysis 5.2 (ABI, USA) und SeqManager, Lasergene 6.0 (DNASTar, USA) ausgewertet wurde.

2.3 Klonierung der Plasmid-Vektoren

Die Klonierung stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, mit dem DNA-Sequenzen, zum Beispiel die cDNA des AR, in einen Vektor integriert werden. Dieser Vektor wird in bestimmte Bakterien transformiert und in diesen selektiv vermehrt. In den hier vorgenommenen Klonierungsarbeiten wurden Plasmid-Vektoren, Derivate natürlicher Resistenz-Plasmide, eingesetzt und in kompetente *E. coli* Stämme transformiert. Im Folgenden sind zunächst die grundlegenden Verfahren geschildert.

2.3.1 PCR-Mutagenese

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) besteht darin, mit Hilfe eines definierten Primer-Paares und einer hitzebeständigen Polymerase ein bestimmtes DNA-Segment *in-vitro* zu amplifizieren. Hierbei werden mit Hilfe eines Thermocyclers die Phasen der Denaturierung, der Primer-Anlagerung und der Elongation zyklisch durchlaufen, wodurch sich das Amplifikat exponentiell vervielfältigt.

Mit Hilfe dieser Methode wurden die Two-Hybrid-Vektoren der LBD hergestellt. Die proof-reading Phusion-High-Fidelity-DNA-Polymerase (Finnzymes, Finnland) wurde verwendet, um Fehler in der Strangsynthese zu vermeiden. Nach der PCR im Mastercycler-Gradient (Eppendorf) wurde das Amplifikat im Agarose-Gel überprüft und dann mit Hilfe des Cloning-Kits-for-Sequencing (Invitrogen, USA) in den Zero-Blunt-TOPO-pCR4-Vektor (Invitrogen, USA) eingebracht. Die Plasmide wurden in One-Shot-TOP10- *E. coli* transformiert, vervielfältigt und abschließend sequenziert. Aus dem Zero-Blunt-TOPO-pCR4-Vektor erfolgte dann die weitere Umklonierung durch Restriktion und gerichtete Klonierung. Das verwendete PCR-Programm und eine Auflistung der Primer ist im Anhang zu finden (Anhang 2. und 5.).

2.3.2 Restriktion und Auftrennung im Agarose-Gel

Die Restriktion wird in der Molekularbiologie eingesetzt, um DNA-Stränge an definierten Stellen zu schneiden. Hierfür werden Restriktionsenzyme verwendet, die bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und die DNA dort durchtrennen (Abb. 11).

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England BioLabs (USA) bezogen und nach den Empfehlungen des Herstellers mit den zugehörigen Puffern verwendet. Es wurden solche Enzyme ausgewählt, deren Schnittstellen im Vektor nur einmalig vorkamen und die überhängende Enden produzierten. Dadurch konnten die DNA-Stränge im nächsten Schritt wieder gerichtet mit einer Ligase verbunden werden. Es wurde ein Restrikti-

onsatz von 50 μl nach den Empfehlungen des Herstellers angesetzt. Nach der Restriktion wurde der Ansatz mit 10 μl 6x Ladepuffer (30 % Glycerol, 0,25 % Bromphenolblau) auf ein präparatives Agarose-Gel auf TBE-Basis (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 25 mM EDTA+Na; pH 8) aufgetragen und für eine Stunde bei 8-10 V/cm der Größe nach aufgetrennt. Insert und Vektorbanden wurden einzeln aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem High-Pure-PCR-Product-Purification-Kit (Roche, USA) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

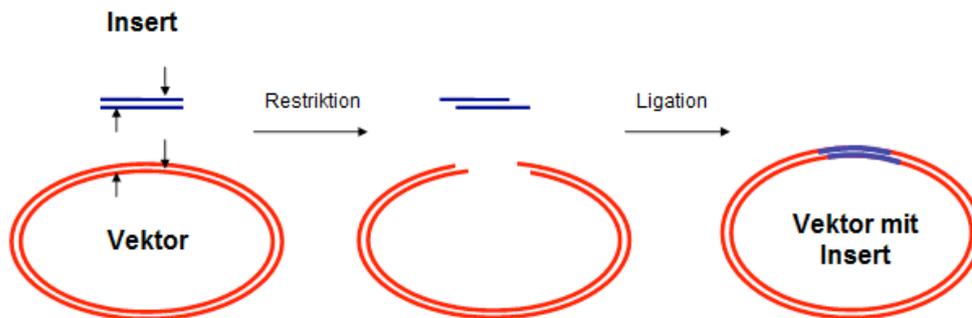


Abb. 11 Restriktion und Ligation

Die Restriktionsenzyme schneiden doppelsträngige DNA an definierter Stelle (Pfeile). Vektor und Insert können durch Agarose-Gel-Elektrophorese in zwei Banden aufgetrennt und einzeln eluiert werden. Für die Ligation kann nun ein Insert, das dieselben überhängenden Enden besitzt, durch eine Ligase mit dem Vektor verbunden werden. Es entsteht ein rekombinanter Vektor.

2.3.3 Ligation

Bei der Ligation werden zwei DNA-Enden über eine Phosphodiesterbindung vom 3' OH-Ende zum 5' Phosphat-Ende mit Hilfe einer Ligase verbunden (Abb. 11). Im Ligationsansatz wurde die Vektor-DNA mit dem „neuen“ Insert in einem molaren Verhältnis von Insert zu Vektor von 5:1 bis 3:1 angesetzt und über Nacht bei 16 °C mit der T4-DNA Ligase (NEB, USA) nach Angaben des Herstellers ligiert.

2.3.4 Transformation in DH5 α F' kompetente *E. coli*

Transformation bezeichnet das Einbringen von Vektor DNA in Wirtszellen. Die durch Restriktion und Ligation neu konstruierten Plasmide wurden mit diesem Verfahren in kompetente *E. coli* Zellen eingebracht. Dies ermöglichte die Lagerung in Glycerolstocks und die selektive Vervielfältigung durch Bakterienanzucht. Hierzu wurden 10 μl des Ligationsansatzes auf 200 μl kompetente *E. coli* Bakterien gegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock von 30 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C führte zum Eindringen der Plasmide in die Bakterien. Im Anschluss wurde der Ansatz wieder für 2 min auf Eis gekühlt und dann mit 800 μl SOB-Medium (siehe Tbl. 2) für eine Stunde mit

dem Thermomixer-Comfort (Eppendorf) schüttelnd inkubiert. Die Bakterienkultur wurde nun auf LB-Agarplatten mit Ampicillin oder Kanamycin ausgestrichen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Durch den Antibiotikazusatz wurden die nicht transformierten *E. coli* am Wachstum gehindert (Abb. 12). Einige der transformierten Einzelkolonien wurden anschließend in Flüssigkulturen einen weiteren Tag angezogen. Aus diesen wurden Glyzerolstocks angelegt, die im -80 °C Schrank gelagert wurden und Minipräparationen für die Sequenzierung durchgeführt.

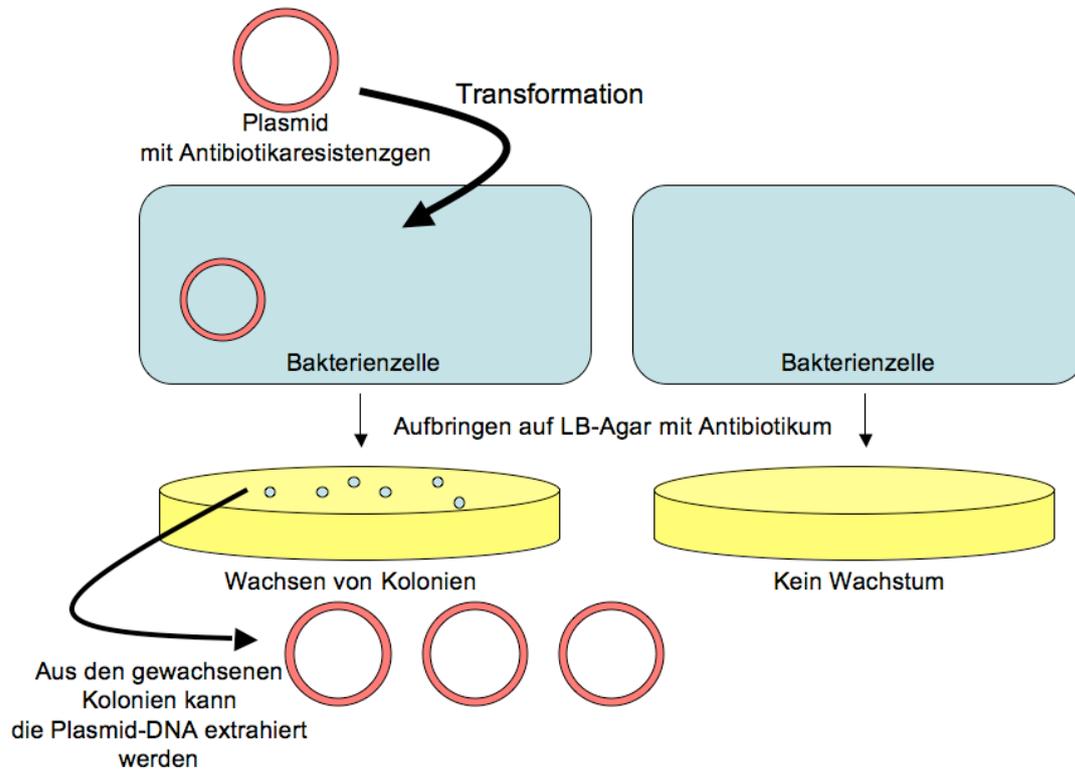


Abb. 12 Prinzip der Transformation und Amplifikation in Bakterien

Plasmide (rot) werden durch Transformation in Bakterienzellen (*E. coli*) eingeschleust (oben). Dieser Vorgang gelingt nicht bei allen vorhandenen Bakterienzellen (rechts). Zur Selektion werden die Bakterien auf LB-Agar mit einem Antibiotikum ausgestrichen. Nur die Bakterien mit Plasmid haben eine Resistenz und können Kolonien bilden (Mitte). Werden die gewachsenen Bakterien weiter kultiviert kann die Plasmid-DNA aus ihnen extrahiert werden (unten).

2.4 Klonierungsstrategien

Im Folgenden werden die Klonierungsstrategien der in den Transfektionsversuchen verwendeten Plasmide dargestellt.

2.4.1 pSVAR Konstrukte

Die Mutationen P723S und P904S wurden durch PCR-Mutagenese mit dem Quick-change-site-directed-mutageneses-Kit (Stratagene, USA) nach den Angaben des Herstellers in den pSVAR0 Vektor eingebracht. Hierfür wurden die Mutagenese-Primer P723S-up

+ P723S-low sowie P904S-up und P904S-low und pSVAR0 als Template verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang zu finden (Anhang 2.). Durch Sequenzierung wurden die entstandenen Klone überprüft. Um weitere Mutationen ausschließen zu können, wurde eine Restriktion mit *Tth1111* und *Bam*HI durchgeführt und das so entstandene Insert in den Wildtyp-Vektor umkloniert. Insert und die Vektorübergänge wurden durch Sequenzierung auf Mutationen untersucht.

Die Herstellung der C-terminalen Mutationen F916X und H917R erfolgte ebenfalls mittels PCR. Als Template diente der pSVAR0. Über die Primer-Paare AR-Kpn_fw + F916X-BamHI und AR-Kpn_fw + H917R-BamHI wurde die Mutation in das Amplifikat eingebracht. Das entstandene DNA Fragment wurde mit dem Zero-Blunt-TOPO-pCR4-Cloning-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) in den pCR4-TOPO-Vektor subkloniert und durch Sequenzierung überprüft. Die Reklonierung in den pSVAR0 erfolgte gerichtet über die Schnittstellen von *Tth1111* und *Bam*HI.

2.4.2 AR-NTD-Konstrukte

Der Vektor pAD-NTD wurde mittels PCR-Mutagenese konstruiert. Es wurden die Primer *Hind*III-AR1 und AR536-TAG-*Bam*HI und der pSVAR0 als Template verwendet, um die NTD selektiv zu amplifizieren. Das entstandene Amplifikat wurde in den Zero-Blunt-TOPO-pCR4-Cloning-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) nach Anleitung des Herstellers kloniert. Über die *Hind*III und *Bam*HI Schnittstellen wurde die NTD im Leseraster mit der NF κ B-Domäne in den pCMV-AD-Vektor (Stratagene, USA) integriert.

Die Mutationen S411N und Δ 409-411 wurden mittels Restriktion mit *Bst*EII und *Rsr*II im Doppelverdau aus ihren AR-Expressionsvektoren isoliert und in den pAD-NTD-Vektor eingebracht. Die Sequenzen wurden mit den Primern GGN5up und T7 verifiziert.

Die Mutation S432F wurde über eine zweischrittige Klonierung aus dem pSVAR-S432F in den pAD-NTD-Vektor überführt. Über die *Bst*EII und *Kpn*I Schnittstellen wurde die Mutation in den Vektor pSV02-AR-NTD subkloniert. Der pSV02-AR-NTD Vektor ist eine Variante von pSVAR0; statt des AR ist die NTD (AS 1-536) eingefügt. Über die *Hind*III + *Xba*I Schnittstellen wurde die Mutation S432F in den pAD-NTD-Vektor eingebracht. Die Umklonierung in den pSV02-AR-NTD war nötig, da der pSVAR0 mehrere *Hind*III Schnittstellen besitzt. Mit den Primern hAR-GGN1s und T7 wurde die Klonierung auf Fehler überprüft.

Die drei N-terminalen Mutationen wurden in einigen Versuchen mit dem FQNAA-Motiv (AS 23-27 des AR) kombiniert. Durch Doppelverdau des pAD-NTD-FQNAA-Vektors mit *Hind*III und *Kas*I wurde die FQNAA-Sequenz isoliert und konnte über dieselben Schnittstellen in die pAD-NTD-Vektoren mit N-terminaler Mutation integriert werden. Mit den Primern hARseq2 und T7 wurden die Vektoren zur Kontrolle sequenziert.

2.4.3 AR-LBD-Konstrukte

Die ursprüngliche oder mutierte AR-LBD wurde über das Primer-Paar *HindIII*-LBD644 und pSV02-seq-as amplifiziert. Als Template diente die jeweilige pSVAR-Vektor-DNA. Das Amplifikat wurde anschließend in den Zero-Blunt-TOPO-pCR4-Cloning-Vektor (Invitrogen, USA) subkloniert. Die Vektoren wurden mittels Sequenzierung verifiziert. Über einen Doppelverdau mit *HindIII* und *PstI* wurde die LBD in Fusion mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne in den pCMV-BD-Vektor (Stratagene, USA) eingebracht. Auf diese Weise wurden pBD-LBD Wildtyp sowie die Mutanten L712F, P723S, Q798E und P904S konstruiert und mit den Primern pBD-5'-seq und T7 auf Fehler untersucht.

Für die Klonierung der LBD H917R und F916X wurden spezielle Primer verwendet. So wurde die PCR-Mutagenese mit den Primern *HindIII*-LBD644 und LBD_H917R bzw. LBD_F916X durchgeführt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie bei den anderen LBD-Konstrukten.

2.5 Zellkultur für CHO- und HeLa-Zellen

Zunächst wird die Herstellung der verwendeten Kulturmedien beschrieben. Danach folgen die Methoden der Zellaussaat, der Anzucht und des Einfrierens. Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Bei beiden Zelllinien konnten die gleichen Methoden verwendet werden.

2.5.1 Medien für die Zellkultur

Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) von Sigma wurde nach den Anleitungen des Herstellers hergestellt (DMEM-Pulver für 5 l mit 6 g NaHCO₃ (MG 84,01 g) in 5 l Aqua dest., pH 7,3), steril filtriert und bei 4 °C gelagert. Um ein gutes Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurden zu 500 ml DMEM 50 ml steroidfreies fetales Kälberserum (DCC-FCS) zugegeben. Das Kulturmedium wurde bei 4 °C gelagert und vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Zum Einfrieren der Zellen wurde DMEM mit 10 % DMSO (Einfriermedium) versetzt.

2.5.2 Herstellung von steroidfreiem fetalen Kälberserum

Um fetales Kälberserum (FCS) von seinen hormonellen Bestandteilen zu befreien, wurde das folgende Verfahren verwendet. Aus 200 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer, 5 g Aktivkohle und 0,5 g Dextran wurde eine Suspension hergestellt. Diese wurde bei 4 °C über Nacht gerührt, wodurch die Aktivkohle das Dextran adsorbierte. Am Folgetag wurde die Suspension in vier 50 ml Röhrchen aliquotiert, für 10 min bei 2704 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zwei Kohle-Pellets wurden nun mit 500 ml FCS resuspendiert. Die Mischung wurde für 2 h bei 0 °C langsam gerührt. Während dieser Zeit adsorbierte die mit Dextran umhüllte Aktivkohle selektiv die hormonellen Bestandteile und kleineren Verunreinigungen des FCS. Die Kohle wurde durch das Absaugen durch einen Filter entfernt. Die zweistündige Inkubation wurde mit den beiden übrigen Kohle-Pellets wiederholt und die Kohle durch einen Filter zweimal abgesaugt. Das nun steroidfreie FCS (DCC-FCS) wurde dreimal steril filtriert und in 50 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.3 Auftauen und Anziehen der Säugerzellen

Säugerzellen wurden, aus flüssigem Stickstoff, im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend in 10 ml 37 °C warmes Kulturmedium (DMEM^{10% DCC-FCS}) aufgenommen. Für 10 min wurden sie bei 1500 rpm abzentrifugiert und in frisches Kulturmedium überführt, um Reste des DMSO-haltigen Einfriermediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 30 ml Kulturmedium auf Zellkulturflaschen der Größe 175 cm² verteilt. Das Nährmedium wurde 3 Mal wöchentlich gewechselt. Die Zellkulturflaschen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.5.4 Trypsinieren und Zählen der Säugerzellen

Sowohl HeLa-, als auch CHO-Zellen haben eine hohe Teilungsrate, so waren die 175 cm² Flaschen beim Aussäen von 2 Millionen Zellen nach 2-4 Tagen zu 90 % konfluent. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, und die Zellen wurden zunächst mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Danach wurden sie kurz mit 3 ml 0,05 % Trypsin-EDTA inkubiert, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Mit 10 ml Serum-haltigem Kulturmedium wurde diese Reaktion abgestoppt, und die Zellen wurden in ein Harre-Röhrchen überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm wurden die Zellen in frisches Kulturmedium aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Für die Transfektionen, bei denen die Aussaat einer definierten Zellzahl wichtig war, wurden die Zellen 1:1 mit Trypanblau verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

2.5.5 Einfrieren der Säugerzellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben trypsiniert. Ungefähr 2 Millionen Zellen wurden nach der Zentrifugation in 1,5 ml kühles Einfriermedium (DMEM^{10% DMSO}) aufgenommen und mit dem Nalgene-Cryo-Einfriergerät im -80 °C Gefrierschrank um 1 °C pro Minute heruntergekühlt. Nach 24 Stunden wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196 °C gelagert.

2.6 Transfektionen

Transfektionen wurden durchgeführt, um die Transaktivität des AR, die N/C-terminale Interaktion und die Interaktion des AR mit Kofaktoren zu untersuchen. Dieses Unterkapitel beginnt mit der Beschreibung des Verfahrens an sich. Es folgen Beschreibungen zum Aufbau der einzelnen Versuche. Der genaue Ablauf einer Transfektion wird beispielhaft anhand des Versuches zur Transaktivität dargestellt.

2.6.1 Das Prinzip der transienten Transfektion

Als transiente Transfektion bezeichnet man das zeitweilige Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Es gibt verschiedene Verfahren, die das Übertreten von DNA durch die Zellmembran ermöglichen. In den durchgeführten Versuchen wurde das lipidbasierte Multikomponenten Transfektionsreagenz FuGene HD (Roche) eingesetzt. Das Transfektionsreagenz bildet mit der Plasmid-DNA Lipid-DNA-Komplexe aus, die mit der Zellmembran fusionieren, wodurch die Fremd-DNA in das Zellinnere gelangt. Durch dieses Verfahren wird eine hohe Transfektionseffizienz erreicht, ohne größeren physikalischen Stress auf die Zellen auszuüben.

2.6.2 Bestimmung der Transaktivität des Androgenrezeptors

Um Einschränkungen in der Funktion des Androgenrezeptors durch die verschiedenen Mutationen aufzuzeigen, wurden Reporter-Gen-Modelle eingesetzt. Hierzu wurde das Gen des AR (pSVAR) mit einem Reporter-Gen in CHO- oder HeLa-Zellen kotransfiziert. Über den SV40-Promotor wurde der AR stark exprimiert und synthetisiert. Durch die Zugabe von DHT wurde der AR aktiviert und bewirkte durch Rekrutierung weiterer Kofaktoren die Transkription des vorliegenden Luziferase-Reporter-Gens (aus *Photinus pyralis*). Die Aktivität dieser Luziferase zeigte somit an, inwieweit das Reporter-Gen vom AR aktiviert werden konnte.

Um verschiedene Versuche vergleichbar machen zu können, wurde die konstitutiv exprimierte Luziferase der *Renilla reniformis* (phRG-TK) kotransfiziert. Nach Lysieren der Zellen wurde mit dem Dual-Luciferase[®]-Reporter-Assay-System von Promega die Aktivität der beiden Luziferasen getrennt detektiert. Indem der Quotient aus der Aktivität der *Photinus*-Luziferase und der Aktivität der *Renilla*-Luziferase gebildet wurde, konnten die Ergebnisse nach der Transfektionseffizienz normalisiert werden.

Das Hormon DHT wurde in aufsteigenden Konzentrationen zugegeben, um differenziert die Hormonbindung des AR, die durch Mutationen verändert sein kann, aufzeigen zu können. Hierzu wurden die folgenden Endkonzentrationen eingesetzt: kein DHT, 0,001 nM DHT, 0,01 nM DHT, 0,1 nM DHT, 1 nM DHT, 10 nM DHT und 100 nM DHT. Mit die-

sem Spektrum wurde der Bereich von keinem Hormon bis zu supraphysiologischen Mengen abgedeckt.

Die Versuche wurden jeweils in Triplikaten mit mindestens 3 unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Excel (Microsoft, USA). Dabei wurde der Mittelwert der bei 10 nM DHT gemessenen Werte des Wildtyp AR als 100 % angesetzt. Die übrigen Messwerte wurden im entsprechenden Verhältnis dazu angegeben.

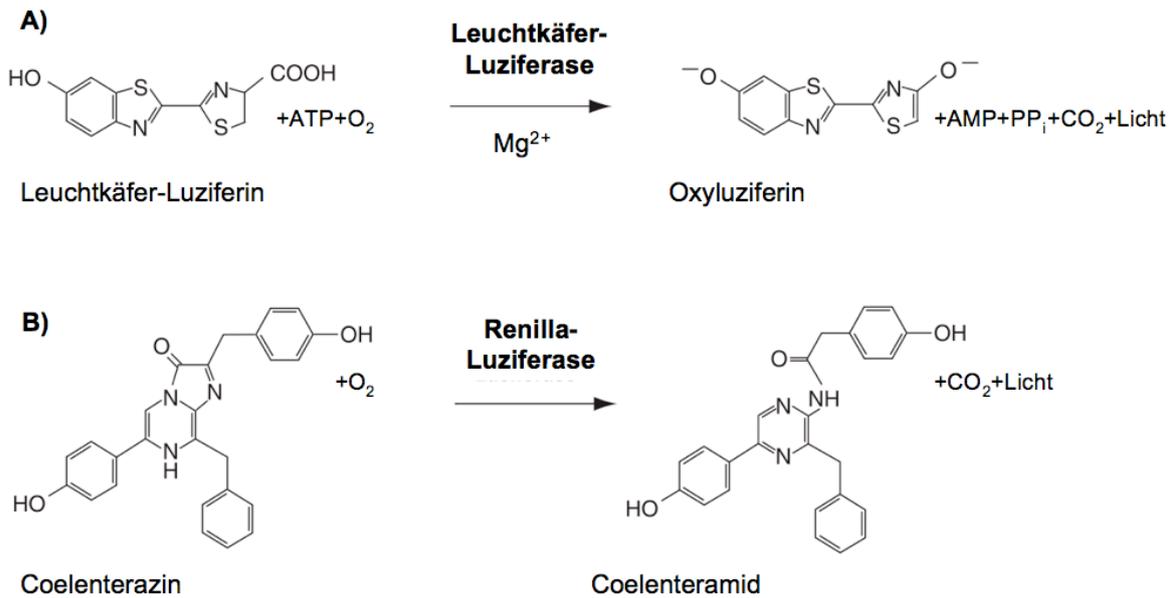
2.6.3 Transfektion und Detektion der Luziferaseaktivität

In Greiner bio-one-CELLSTAR-24-Well-Platten wurden 80 000 CHO-Zellen oder 50 000 HeLa-Zellen in 500 μ l Kulturmedium (DMEM + DCC-FCS) pro Well ausgesät. Über Nacht wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Transfektion wurde am nächsten Tag vorgenommen. Pro Well wurden 30 ng pSVAR (mit oder ohne Mutation), 200 ng Reportergerne ((ARE)₂-TATA-, MMTV-, Pem- oder PB-Luc) und 5 ng phRG-TK in 100 μ l DMEM mit 0,5 μ l FuGene HD (Roche) transfektiert. Um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, wurde zunächst das FuGene bei Raumtemperatur für 5 min in DMEM inkubiert und dann die DNA zugegeben. Nach weiteren 20 min wurde das DMEM-FuGene-DNA-Gemisch, in dem sich inzwischen Lipid-DNA-Komplexe ausgebildet hatten, auf die Wells gegeben. Die Komplexe fusionierten nun mit den Zelloberflächen, und die Plasmid-DNA wurde in das Zellinnere aufgenommen. Es folgte eine fünfstündige Inkubation im Brutschrank. Anschließend wurde durch Zugabe von DHT-Ethanol-Lösungen eine Hormonreihe mit ansteigenden DHT-Konzentrationen (siehe 2.6.2) hergestellt. Um toxische Zellschäden durch Ethanol zu vermeiden, wurden die Lösungen mit DMEM soweit verdünnt, dass in den Wells eine Ethanolendkonzentration von 0,1 Promille vorlag. Nach Hormonzugabe wurden die Zellen für weitere 18 h bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert.

Für die Zellyse wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt, und die Wells wurden zwei Mal mit je 1 ml PBS gespült. Pro Well wurden 100 μ l Passive-Lysis-Puffer (Promega) zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler wurden je 25 μ l der Lysate in eine Costar-Assay-Plate (96-Well; Corning, USA) überführt.

Die Messung im Luminometer-Lucy-3 (Anthos Mikrosysteme, Krefeld) wurde mit dem Dual-Luziferase-Reporter-Assay-System (Promega) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Das Substrat Luziferase-Assay-Reagenz-II ermöglichte die Erfassung der Leuchtkäfer-Luziferase-Aktivität (Abb. 13A). Das Stop&Glow-Reagenz detektierte nachfolgend die Aktivität der Renilla-Luziferase, die Androgen-unabhängig, konstitutiv, exprimiert wird (Abb. 13B). Das Messprogramm ist im Anhang zu finden (Anhang 6.).

**Abb. 13 Luziferase-Reaktionen**

Die Aktivitäten der Luziferasen werden mit Hilfe von zwei Reagenzien im Luminometer detektiert. Das Luziferase-Assay-Reagenz-II enthält das Leuchtkäfer-Luziferin sowie Adenosintriphosphat (ATP) und Mg^{2+} . Die Leuchtkäfer-Luziferase katalysiert die unter A) dargestellte Oxidation, das dabei entstehende Licht wird im Luminometer gemessen und korreliert mit der Expression der Reportergene. Das Stop&Glow-Reagenz enthält Coelenterazin, das von der Renilla-Luziferase ebenfalls oxidiert wird B). Auch bei dieser Reaktion wird Licht emittiert. Die Renilla-Luziferase wurde konstitutiv über einen HSV-TK-Promotor exprimiert. Die gemessene Aktivität der Renilla-Luziferase wurde für die Normalisierung nach Transfektionseffizienz verwendet.

2.6.4 Bestimmung der N/C-terminalen Interaktion

Auf die Interaktion zwischen der NTD und LBD des Androgenrezeptors wurde bereits im ersten Teil dieser Arbeit eingegangen. Um genauer zu analysieren, ob einige der Mutationen sich auf die N/C-terminale Interaktion auswirken, wurde das Mammalian-Two-Hybrid-Assay-Kit von Stratagene eingesetzt. Die Vektoren pAD-NTD und pBD-LBD wurden wie in 2.4 beschrieben konstruiert.

Nach Kotransfektion von pAD-NTD und pBD-LBD entstehen in Säugerzellen zwei verschiedene Fusionsproteine. Durch die Expression des Fusionsgens im pAD-NTD-Vektor wird die transkriptionsaktivierende Domäne des Maus Proteins NF- κ B in Fusion mit der AR-NTD synthetisiert. Das Fusionsgen im pBD-LBD-Vektor kodiert für ein Protein aus der Hefe-Gal4-DNA-Bindungsdomäne in Fusion mit der AR-LBD (Abb. 13). Wird die LBD durch DHT aktiviert und interagiert daraufhin über das ²³FXXLF²⁷-Motiv mit der NTD, entsteht ein funktioneller Transkriptionsfaktor aus den beiden Fusionsproteinen. Dieser Transkriptionsfaktor lagert sich über seine Gal4-DNA-Bindungsdomäne an die Gal4-responsiven Elemente der Promotorregion strangaufwärts des Leuchtkäfer-Luziferasegens (pFR-Luc) an. Über die NF- κ B Komponente werden weitere Transkriptionsaktivatoren rekrutiert und die Transkription des Luziferasegens initiiert. Das Maß der

Expression der Luziferase korreliert mit der Interaktion zwischen N- und C-Terminus des AR.

Die Transfektionen wurden entsprechend 2.6.3 durchgeführt. Pro Well wurden 100 ng pAD-NTD, 100 ng pBD-LBD (mit oder ohne Mutation), 250 ng pFR-Luc und 10 ng pHRTK (zur Messung der Transkriptionseffizienz) transfektiert. Es wurden vier aufsteigende Hormonkonzentrationen, kein DHT, 1 nM DHT, 10 nM DHT und 100 nM DHT, verwendet. Auch diese Versuchsreihe wurde in Triplikaten mit drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Der Mittelwert der Messung von Wildtyp NTD und Wildtyp LBD wurde als 100 % angesetzt. Als Positivkontrolle wurde die Interaktion der Kontrollplasmide pBD-P53 und pAD-SV40T aus dem Kit verwendet. Die Kotransfektion von pBD-LBD mit pAD-SV40T sowie pAD-NTD mit pBD-p53 diente der Negativkontrolle.

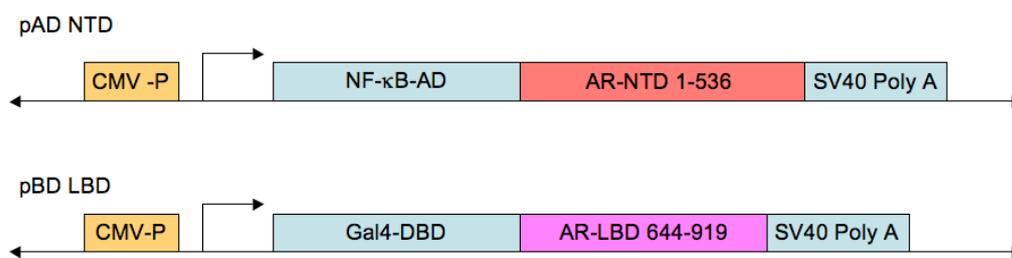


Abb. 14 Aufbau der Gene der Two-Hybrid-Fusionsproteine

Der pAD-NTD-Vektor enthält einen CMV-Promotor (CMV-P), der eine starke Expression in Mammalia-Zellen auslöst. Das Gen der Aktivierungsdomäne von NF- κ B (NF- κ B-AD) ist im Leseraster mit dem Gen der NTD des Androgenrezeptors verbunden. Nach Transkription entsteht eine Fusions-mRNA, aus der ein Fusionsprotein translatiert wird. Durch den SV40PolyA-Schwanz wird die mRNA stabilisiert. Der pBD-LBD-Vektor ist vergleichbar aufgebaut. Durch Proteinbiosynthese entsteht das Fusionsprotein aus der DNA-Bindungsdomäne des Hefeproteins Gal4 und der LBD des AR.

2.6.5 Bestimmung der Kofaktorinteraktion der LBD

Zur differenzierten Beurteilung der Kofaktorbindung, beim Vorliegen von Mutationen in der LBD, wurde die Interaktion anhand von zwei bekannten Kofaktoren des AR, BAG1L und SRC1e, in einem Zellmodell untersucht. Hierzu wurden die Vektoren pBD-LBD und pFR-Luc des Mammalian-Two-Hybrid-Assay-Kit (Stratagene) mit den Expressionsvektoren der Kofaktoren kotransfektiert. Wie beschrieben lagert sich die Gal4-Bindungsdomäne des Fusionsproteins aus pBD-LBD (AR-LBD und Gal4-DNA-Bindungsdomäne) an die Gal4-Bindungsstellen stromaufwärts des Luziferasegens an. Interagieren die Kofaktoren SRC1e und BAG1L mit der LBD des AR, können sie weitere Kofaktoren rekrutieren und die Ausbildung eines Transkriptionskomplexes initiieren. Die Interaktion zwischen Kofaktor und LBD-Fusionsprotein führt zur Expression des Luziferasegens, die im Luminometer detektierbar ist.

Für die Versuche mit BAG1L wurden pro Well 100 ng pBD-LBD, 100 ng BAG1L in pcDNA3, 250 ng pFR-Luc und 10 ng phRG-TK Plasmid-DNA eingesetzt. Da die LBD auch selbst in der Lage ist, Kofaktoren zu rekrutieren, allerdings in schwächerem Maße, wurde eine Kontrolltransfektion ohne BAG1L in pcDNA3 durchgeführt. Hierzu wurden statt des Kofaktor-Plasmids 80 ng pcDNA3 (ohne BAG1L) und 16 ng pTZ19 als Füllplasmid eingesetzt, um die DNA-Menge und Promotor-Anzahl konstant zu halten. Für den Kofaktor SRC1e wurden 200ng SRC1e in pSG5 bzw. in der Kontrolle 100ng pSG5 und 100ng pTZ19 Plasmid-DNA eingesetzt.

DHT wurde in den Endkonzentrationen von kein DHT, 1 nM DHT, 10 nM DHT und 100 nM DHT zugegeben. Auch die Kofaktorversuche wurden in Triplikaten und mindestens drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Der Mittelwert der Transfektionen des Wild-typ pBD-LBD mit leerem Vektor wurde gleich 100 % gesetzt.

2.7 Western Blot

Mit dem Western Blot können Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung nachgewiesen und quantifiziert werden. Dieses Verfahren wurde eingesetzt, um zu zeigen, dass eine Funktionseinschränkung in den Reporter-Gen-Assays sich nicht auf eine verminderte Proteinbiosynthese mutierter Rezeptoren, sondern auf eine veränderte Funktion der mutierten Rezeptoren selbst zurückführen lässt.

2.7.1 Herstellung der Proteinlysate

In 6-Well-Platten wurden 300 000 CHO Zellen in 2,5 ml Kulturmedium pro Well ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Pro Well wurden 1000 ng pSVAR, pBD-LBD oder pAD-NTD sowie 30 ng phRG-TK Plasmid-DNA in 500µl DMEM mit 2,2 µl Fu-Gene HD wie oben beschrieben transfektiert. Die Inkubation erfolgte für 24 h ohne Hormonzugabe.

Vor der Lyse wurden die Zellen zweimal mit je 3 ml PBS pro Well gewaschen. In 7 ml Mammalian-Protein-Extraction-Reagent (M-PER, Pierce, USA) wurde eine Tablette Proteasen-Inhibitor-Cocktail (complete, Mini, EDTA-free von Roche, USA) gelöst. Mit 250 µl M-PER pro Well wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert und dann mit einem Zell-scraper vom Boden gelöst. Die Lysate wurden über eine QiaShredder-Säule (Qiagen, Hilden) abzentrifugiert. 25µl des Lysats wurden direkt für die Detektion der Transfektionseffizienz im Luminometer entnommen. Der übrige Teil wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Mit dem Bio-Rad-Microassay wurde die Proteinkonzentration der Lysate im Bio-photometer (Eppendorf) bestimmt.

2.7.2 Normalisierung der Lysatmengen

Um die Proteinmenge der verschiedenen AR-Mutanten in den transfektierten Zellen miteinander vergleichen zu können, wurde die eingesetzte Lysatmenge nach der Transfektionseffizienz normalisiert. Dazu diente der im Luminometer bestimmte Wert der kotransfektierten Renilla-Luziferase.

2.7.3 Acrylamid-Gel-Elektrophorese und Western Blot

In den durchgeführten Versuchen wurde das diskontinuierliche SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) Puffersystem nach Laemmli (1970) verwendet. Im Gel- und Elektrodenpuffer liegen jeweils unterschiedliche Ionen vor. Das Sammelgel dient zunächst dem Einbringen der Proteine in die Gelphase. Anschließend erfolgt im Trenngel die Auftrennung in die Einzelbanden.

Die Proteinlysate wurden zunächst 1:1 mit einem SDS-haltigen Probenpuffer (100 mM Tris, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 0,002 % Bromphenolblau, 10 nM DTT, pH 6,8) für 3 min bei 99 °C denaturiert. Dies ermöglichte die nachfolgende elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. In einem Acrylamid-Gel, bestehend aus einem 4-prozentigen Sammel-Gel und einem 7-prozentigen Trenn-Gel (siehe Tbl. 3), wurden die Lysate unter Verwendung eines SDS-haltigen Tris-Glycin-Elektrodenpuffers (0,1 % SDS, 25 mM Tris, 192 mM Glycine, pH 8,3) in einer Mini-PROTEAN-3-Cell (Bio-Rad) bei einer Spannung von 100 V für 1,5h aufgetrennt. Als Marker wurden 15 µl Kaleidoskopmarker (BioRad) verwendet.

	Sammel-Gel (4 %)	Trenn-Gel (7 %)
Acrylamid (Rotiphoresegel 30)	0,71 ml	3 ml
5x Sammel-Gel-Puffer (625 mM Tris, 0,5 % SDS, pH 6,8)	1,1 ml	
5x Trenn-Gel-Puffer (1,875 M Tris, 0,05 % SDS, pH 8,8)		2,7 ml
Aqua dest.	3,5 ml	7,2 ml
TEMED	10 µl	10 µl
10 % APS	15 µl	28,8 µl

Tbl. 3 Acrylamid-Gele für SDS-PAGE

Als das eigentliche „Blotting“ wird das Übertragen der im Gel vorliegenden Proteine auf eine Membran durch Elektrophorese bezeichnet. Unter Verwendung der Ready-Gel-Blotting-Sandwiches (BioRad) wurde das Gel in eine Mini-Trans-Blot-Electrophoretic-

Transfer-Cell (BioRad) eingespannt. Die elektrophoretische Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte für 1 h 20 min bei 100 V in Blotting-Puffer (20 % Methanol, 16,5 mM Tris, 150 mM Glycin, pH 8,3). Das elektrische Feld war dabei senkrecht zur Laufrichtung der Acrylamid-Gel-Elektrophorese angelegt. Durch den Methanol-haltigen Puffer wurde das SDS aus den Proteinen gelöst. Durch die nun wieder mögliche Ausbildung von Proteinsekundär- und Tertiärstruktur konnten die Proteine besser an der Membran haften. Aus PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mM KH_2PO_4), versetzt mit 0,1 % Tween 20 und 5 %-igem Magermilchpulver (Difco, Becton & Dickinson), wurde eine Block-Milch hergestellt. In dieser wurde die Membran bei 4 °C über Nacht schüttelnd blockiert.

2.7.4 Immundetektion

Bei der Immundetektion werden Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper markiert und sichtbar gemacht. In einem zweistufigen Verfahren bindet zunächst ein Erstantikörper direkt das nachzuweisende Protein. In einem zweiten Schritt bindet ein Zweitantikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, den Erstantikörper über sein Fc-Fragment (Abb. 15). Nach Substrat Zugabe katalysiert die HRP die Oxidation von Luminol. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, das mit einer Kamera oder einem Film optisch fixiert werden kann. Der Film wird dort, wo das nachzuweisende Antigen vorliegt, belichtet. Durch wiederholtes Spülen werden vorher ungebundene Antikörper entfernt.

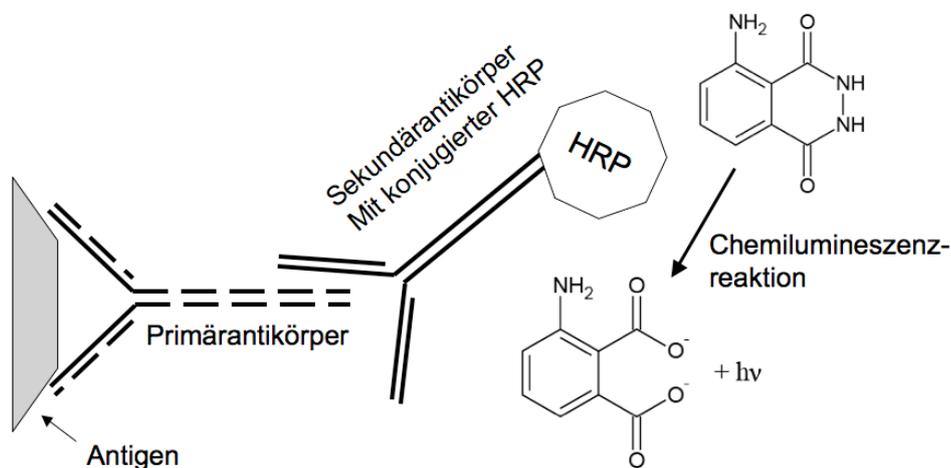


Abb. 15 Prinzip der Immundetektion

Der Primärantikörper bindet das Antigen, der Sekundärantikörper mit gebundener HRP bindet den Primärantikörper. Nach Zugabe des Substrats Luminol katalysiert die HRP eine Chemilumineszenzreaktion, bei der Licht emittiert ($h\nu$) wird.

In den durchgeführten Immunoblots wurde die blockierte Membran für eine Stunde mit der jeweiligen Primärantikörper-Arbeitsverdünnung (siehe Tbl. 4) inkubiert. In der nächsten Stunde wurden die Membranen 4 Mal für 15 min in PBS mit 0,1 % Tween gewaschen. Dann erfolgte, wiederum für eine Stunde, die Inkubation mit der Arbeitsverdünnung des Sekundärantikörpers (siehe Tbl. 5). Die Membran wurde wieder 4 Mal mit PBS und 0,1 % Tween gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem Western-Lightning-Chemiluminescence-Reagent-Plus (PerkinElmer) im Molecular-Imager-Chemidoc-XRS sowie in der Dunkelkammer mit Hyperfilm (Amersham).

Kaninchen Anti-Aktin Antikörper Lagerung bei -20 °C Arbeitsverdünnung 1:1000 in Block Milch	Sigma, Deisenhofen
Anti-Androgen Receptor (F39.4.1) monoklonaler Maus-Antikörper Lagerung bei +4 °C Arbeitsverdünnung: 1:600 in Block Milch	Biogenex, USA
Anti-Gal4 (DBD): sc-577 Antikörper polyklonaler Kaninchen-Antikörper erkennt die Aminosäuren 1-147 in der N-terminalen DNA Bindungsdomäne von Gal4 Lagerung bei +4 °C Arbeitsverdünnung: 1:200 in Block Milch	Santa Cruz, USA

Tbl. 4 Primärantikörper

Anti-Kaninchen IgG Antikörper HRP konjugierter Ziegen-Antikörper Lagerung bei -20 °C Arbeitsverdünnung: 1:4000 in Block Milch	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
ECL™ Anti-Maus IgG Antikörper HRP konjugierter Schaf-Antikörper Lagerung bei -20 °C Arbeitsverdünnung: 1:2000 in Block Milch	Amersham, Freiburg

Tbl. 5 Sekundärantikörper

2.8 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Konzentrations-Wirkungs-Kurven und EC₅₀-Werte wurden mit Hilfe des Software-Paketes GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) berechnet.

III Ergebnisse

1. Sequenzierung der Plasmid-DNA

Um die Plasmide auf Fehlerlosigkeit zu prüfen und die einzelnen Mutationen vor ihrem Einsatz in Reporter-Gen-Assays zu verifizieren, wurde die Plasmid-DNA nach der Dideoxymethode sequenziert. Die gewonnenen Sequenzen wurden mit dem Programm Sequence-Analysis-5.2 (ABI, USA) auf ihre Qualität geprüft. Mit dem SequenceManager aus Lasergene 6.0 (DNASTar, USA) wurden die Sequenzen der Plasmid-DNA mit der Originalsequenz verglichen und die Mutationen gesondert überprüft (Abb. 15). Alle verwendeten Plasmide wurden auf diese Weise kontrolliert bevor sie für die Transfektionen verwendet wurden.

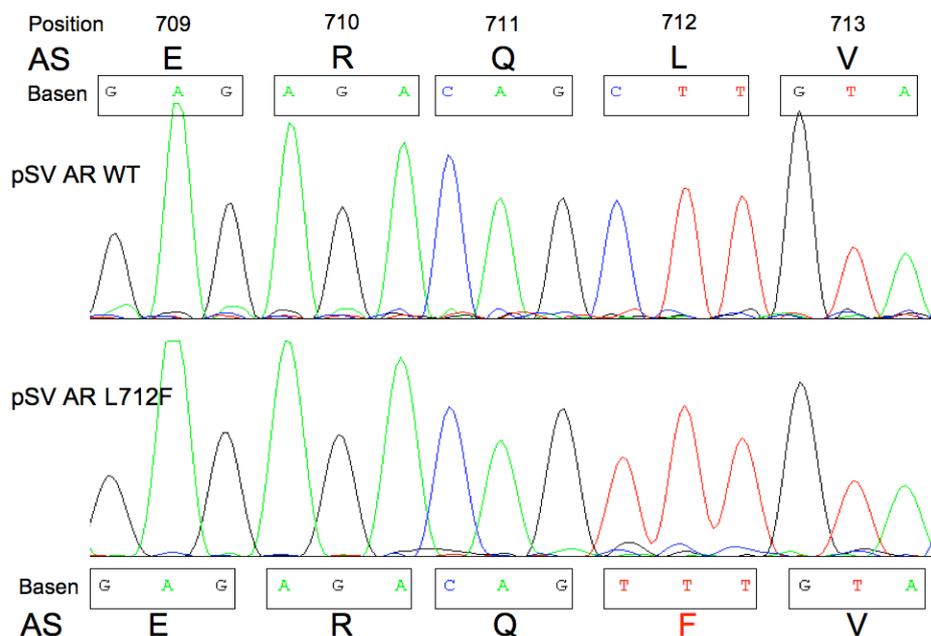


Abb. 16 Sequenzanalyse des pSVAR WT und pSVAR L712F

Vergleich von Wildtyp und mutierter Sequenz der pSVAR Plasmide. Die einzelnen Basenpeaks sind farblich kodiert, Guanin schwarz, Thymin rot, Cytosin blau und Adenin grün. Die jeweiligen Aminosäuren (AS) des AR sind im Einbuchstabencode (siehe Anhang 8.) mit zugehörigem Leseraster und ihrer Position nach der Sequenz von Lubahn *et al.* (1989) dargestellt.

2. LBD-Mutationen

2.1 Transaktivität des AR am (ARE)₂-TATA-Promotor

Um funktionelle Unterschiede in der Transaktivität zwischen dem Wildtyp (WT) und den mutierten Rezeptoren aufzuzeigen, wurden die pSVAR-Plasmide mit einem Androgen-

responsiven Leuchtkäfer-Luziferase-Reportergen ((ARE)₂-TATA-Luc) und einem konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase-Plasmid (phRGTK) kotransfiziert. Durch die Zugabe ansteigender Hormonkonzentrationen (0-100 nM DHT) wurde die konzentrationsabhängige Transaktivierung des Reportergens durch den AR in CHO-Zellen differenziert dargestellt (Abb. 17 A). Bei 0,1 nM DHT lag die detektierte Transaktivierung durch den WT AR bei 40 % des Maximalwerts. Bei 1 nM DHT erreichte sie ungefähr 90 %. Mit Prism 5 (GraphPad) wurde aus den Messwerten eine mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) von $1,55 \times 10^{-10}$ (CI: $1,4 \times 10^{-10} - 1,7 \times 10^{-10}$) berechnet (Abb. 17 B).

Im Vergleich zum Wildtyp führten die mutierten Rezeptoren zu einer verminderten Transaktivierung. Eine Ausnahme stellte der AR mit der PAIS-Mutation Q798E dar. Dieser Rezeptor erreichte bei Hormonkonzentrationen von 10 und 100 nM DHT eine dem Wildtyp vergleichbare Transaktivierung (Abb. 17 A). Die EC₅₀ lag mit $3,691 \times 10^{-10}$ (CI: $3,324 \times 10^{-10} - 4,099 \times 10^{-10}$) etwas unter dem Wert des Wildtyps (Abb. 17 B).

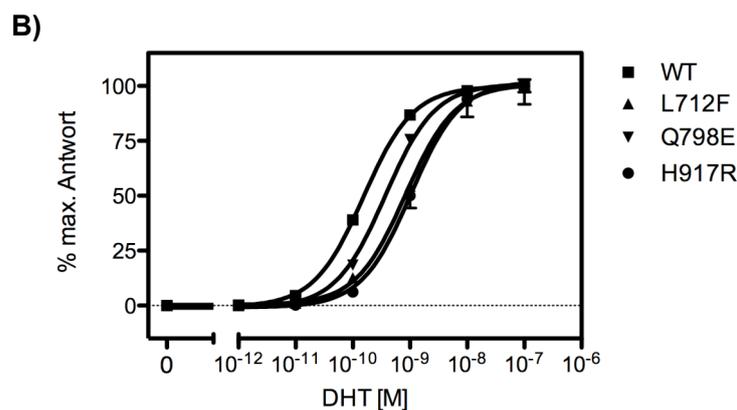
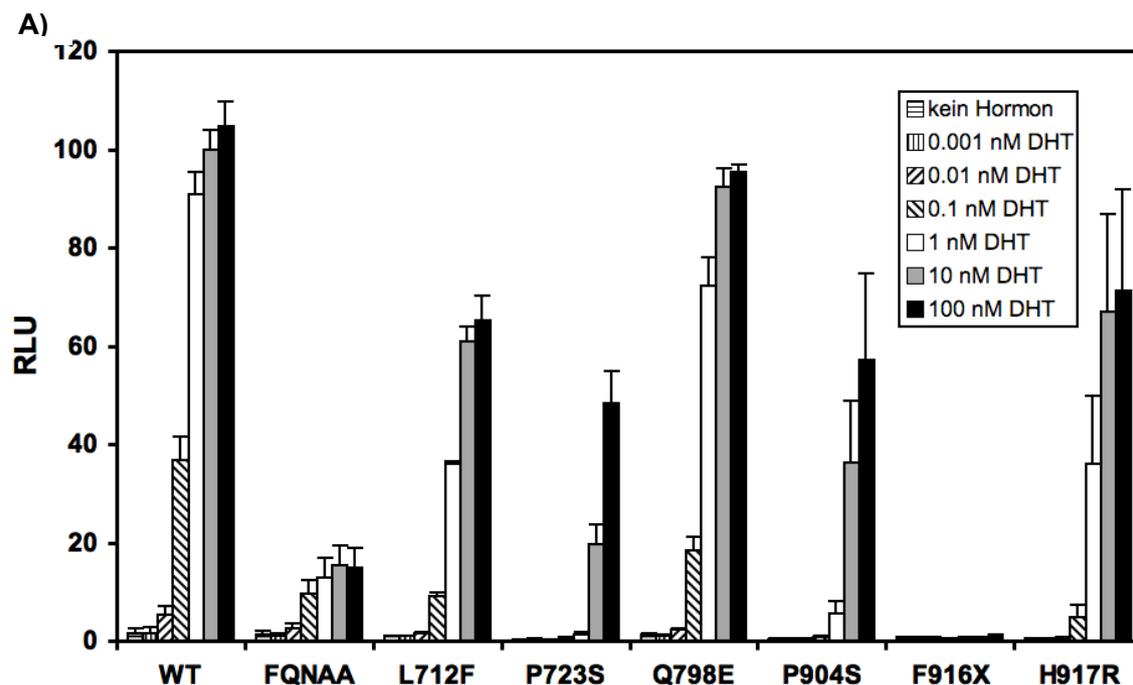
Die PAIS-Mutation L712F reduzierte die maximale Transaktivität auf 70 % des Wildtyprezeptors. Bei 0,1 nM DHT erreichte der mutierte Rezeptor eine Transaktivierung von knapp 10 % und bei 1 nM von unter 40 % (Abb. 17 A). Aus den gemessenen Werten berechnete sich eine EC₅₀ von $8,358 \times 10^{-10}$ (CI: $7,316 \times 10^{-10} - 9,548 \times 10^{-10}$) (Abb. 17 B).

Die Mutationen P723S und P904S, die beide mit CAIS assoziiert sind, führten zu einer stark verringerten Transaktivierung des Reportergens (Abb. 17 A). Hormonkonzentrationen von 1 nM DHT konnten die mutierten Rezeptoren nicht aktivieren. Bei 10 nM DHT wurde eine Aktivierung von 20 - 35 % erreicht. Der supraphysiologische Wert von 100 nM DHT bewirkte eine Steigerung der Transaktivierung auf 50 - 60 % des Wildtyps. Da diese beiden Mutationen dazu führten, dass erst sehr hohe Hormonkonzentrationen eine Transkription des Reportergens auslösen, kann von einer stark erhöhten EC₅₀ ausgegangen werden. Diese ließ sich jedoch aus den vorhandenen Messwerten nicht berechnen.

Bei der AR-Variante ²³FQNAA²⁷ ist die Sequenz ²³FQNLF²⁷ durch den Austausch von zwei AS verändert. Der Rezeptor ist nicht mehr in der Lage, eine N/C-terminale Interaktion über dieses Motiv auszubilden (Shen *et al.*, 2005). Im Reportergen-Assay war die maximale Transaktivität des AR mit FQNAA auf 20 % des Wildtyps reduziert (Abb. 17 A). Für eine Aktivierung waren relativ geringe Hormondosen ausreichend. Eine halbmaximale Aktivierung fand bereits bei 0,1 nM DHT statt. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Hormonbindung und die dadurch initiierte primäre Aktivierung des Rezeptors durch den N-terminalen Basenaustausch nicht moduliert wird.

Die Stoppkodon-Mutation F916X hob die Transaktivierungsfähigkeit des Rezeptors vollständig auf (Abb. 17 A). Der AR mit H917R zeigte von den CAIS-Mutationen die höchste maximale Transaktivierung. Bei 1 nM DHT erreichte der mutierte Rezeptor 35 % und bei 10 nM DHT 60 - 70 % der Wildtyp-Transaktivität (Abb. 17 A). Aus den Messwerten er-

rechnete sich eine EC_{50} von $1,03 \times 10^{-9}$ (CI: $6,7 \times 10^{-10}$ - $1,59 \times 10^{-9}$) (Abb. 17 B). Die ARs mit den Mutationen P723S, P904S und F916X konnten bei der physiologischen DHT-Konzentration von 1 nM DHT kaum eine Transaktivierung des Reportergens bewirken. Dieses Ergebnis korreliert mit dem CAIS-Phänotyp der beschriebenen Patienten. Im Unterschied hierzu zeigte der Rezeptor mit H917R ein Transaktivierungsprofil wie der AR mit der PAIS-Mutation L712F. Bei hoch-physiologischen DHT Werten (10 nM) erreichte der AR mit H917R eine Transaktivierung von fast 70 % des Wildtyps (Abb. 17 A). In der Literatur war beschrieben worden, dass diese Mutation mit einem CAIS-Phänotyp einhergeht. Eine Überprüfung der AR-Expression durch Western-Blot-Analysen zeigte, dass sich die unterschiedliche Transaktivierungsfunktion der AR-Varianten nicht auf unterschiedliche Proteinexpression in CHO-Zellen zurückführen lässt (Abb. 16 C).



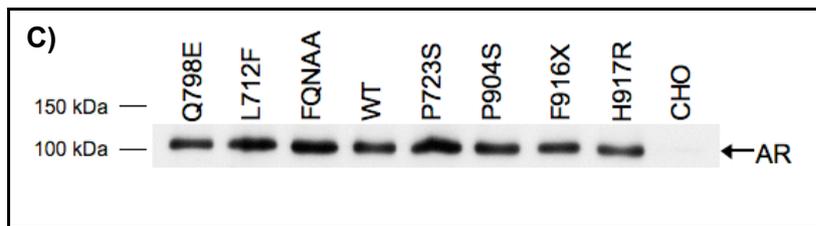


Abb. 17 Transaktivität des AR am (ARE)₂-TATA-Promotor

A) CHO-Zellen wurden mit dem Reporter gen (ARE)₂-TATA-Luc (Leuchtkäfer-Luziferase), der konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase, pHRGTK, und Varianten des AR in ganzer Länge (pSVAR) transfiziert. Es wurden der Wildtyp-Rezeptor, die PAIS-Mutationen L712F und Q798E, die CAIS-Mutationen P723S, P904S und H917R und zwei artifizielle Mutationen, ²³FQNAA²⁷ und F916X, untersucht. Um die hormonvermittelte Aktivierung des Reporter gens detektieren zu können, wurde 5 Stunden nach Transfektion DHT in der jeweils angegebenen Konzentration zugegeben. Nach weiteren 18 Stunden Inkubation wurden die CHO-Zellen lysiert und die Aktivitäten von Leuchtkäfer- und Renilla-Luziferase im Luminometer detektiert. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Renilla-Wertes nach der Transfektionseffizienz normalisiert. Der Wert des WT AR bei der physiologischen Konzentration von 10 nM DHT wurde gleich 100 % gesetzt. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche in Triplikaten durchgeführt, die Standardabweichung ist als Fehlerbalken abgebildet. RLU: relative Luziferase Einheiten.

B) Konzentrations-Wirkungs-Kurven: Konzentrations-Wirkungs-Kurven des WT AR und des AR mit den Mutationen Q798E, L712F und H917R am (ARE)₂-TATA-Promotor. Die Einzelmesswerte wurden verwendet, um mit Prism 5 (GraphPad) die zugehörigen EC₅₀-Werte zu berechnen (siehe Text). Der WT erreicht bereits bei niedrigen Hormonkonzentrationen eine Aktivierung des Reporter gens. Die Q798E hat eine im Vergleich etwas geminderte EC₅₀. Die Kurven der Mutationen L712F und H917R überlagern sich. Um eine dem Wildtyp vergleichbare Aktivierung zu erreichen, benötigen beide AR-Varianten eine zehnfach erhöhte DHT-Konzentration.

C) Western Blot der AR-Konstrukte in ganzer Länge: CHO-Zellen wurden mit pSVAR-Konstrukten sowie dem Plasmid der konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase, pHRGTK, transfiziert. Die auf den Blot aufgetragene Proteinmenge wurde nach der Transfektionseffizienz normalisiert. Es wurden zwischen 10 und 25 µl Proteinlysate aufgetragen. Die Immundetektion erfolgte mit dem Antikörper Anti-Androgen Rezeptor (F39.4.1) von Biogenex als Primärantikörper und ECLTM Anti-Maus IgG Antikörper von Amersham als Sekundärantikörper. Das Molekulargewicht des AR beträgt ca. 110 kDa. Nicht transfizierte CHO-Zellen (CHO) dienen der Negativkontrolle.

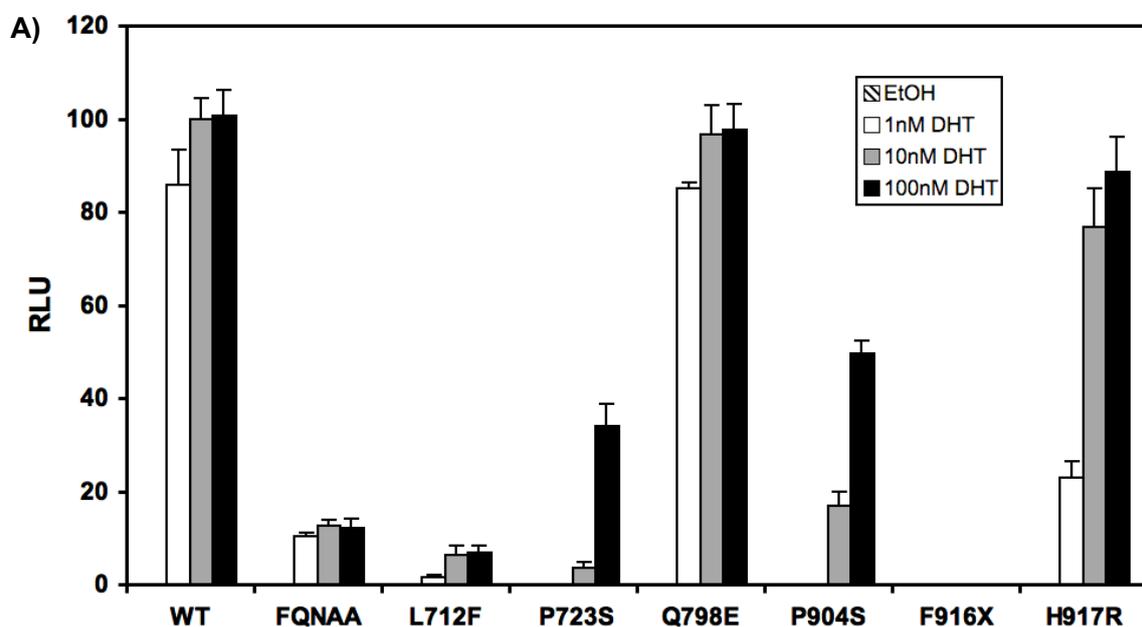
2.2 N/C-terminale Interaktion

Um die Interaktion zwischen N- und C-Terminus des Androgenrezeptors differenziert zu untersuchen, wurde ein Two-Hybrid-Assay eingesetzt, bei dem der pAD-NTD-Wildtyp-Vektor und verschiedene Varianten des pBD-LBD-Vektors zusammen mit dem Reporter gen pFR-Luc und pHRGTK in CHO-Zellen kotransfiziert wurden (Abb. 18 B).

Die Ergebnisse zeigten beim Wildtyp die erwartete Androgen-abhängige N/C-Interaktion (Abb. 18 A). Im Wildtyp-Rezeptor vermittelt das ²³FQNLF²⁷-Motiv die N/C-Interaktion (He *et al.* 2002a). Die NTD mit der Variante ²³FQNAA²⁷ zeigte keine N/C-Interaktion und wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Im Vergleich mit den oben beschriebenen Ergebnissen fallen, wie in Abb. 18 B zu sehen, wesentliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutationen auf. Während die LBD F916X bei allen eingesetzten DHT-Konzentrationen (0-100 nM) keinerlei Interaktion mit der NTD einging, übte die Mutation Q798E keinen supprimierenden Effekt auf die N/C-Interaktion aus, die mutierte LBD verhielt sich wie der Wildtyp. Die CAIS-Mutationen P723S, P904S und H917R führten zu einer verzögerten N/C-Interaktion. Bei 1 nM DHT zeigte die LBD mit H917R im Vergleich zum Wildtyp $\frac{1}{4}$ der Aktivität. Bei höheren DHT-Konzentrationen (10 nM und 100 nM) erreichte sie 80 - 90 % der Wildtyp-Interaktion. Dieses Ergebnis ist auf eine 5-10 Mal höhere EC_{50} zurückzuführen und entspricht den Ergebnissen im Versuch zur Transaktivität. Die Mutationen P723S und P904S unterdrückten bei niedrigeren DHT-Konzentrationen (≤ 10 nM) die N/C-Interaktion. Bei 100 nM wurde eine Aktivität von 30 - 50 % des Wildtyps erreicht. Diese verzögerte Reaktion zeigt, dass sich in der LBD, trotz vorliegender Mutationen, durch Hormoninduktion eine Faltung zur aktiven AF2 vollzieht. Die fehlende N/C-Interaktion bei niedrigen Hormonkonzentrationen lässt sich durch eine stark erhöhte Dissoziationskonstante (K_d) erklären. Die Mutation L712F unterbindet die für den AR spezifische Interaktion zwischen NTD und LBD vollständig. Dieses steht in Diskrepanz mit dem Versuch zur Transaktivität des vollständigen Rezeptors am $(ARE)_2$ -TATA-Promotor, bei dem die Mutation L712F die maximale Transaktivität des AR nur um 30 - 40 % reduzierte.

Durch Western-Blot-Analysen wurde die Proteinexpression der verwendeten Varianten des Fusionsproteins aus LBD und Gal4-DNA-Bindungsdomäne in CHO-Zellen untersucht. Dabei wurden keine wesentlichen quantitativen Unterschiede in der Expression der verschiedenen LBD-Fusionsproteine festgestellt (Abb. 18 C/D).



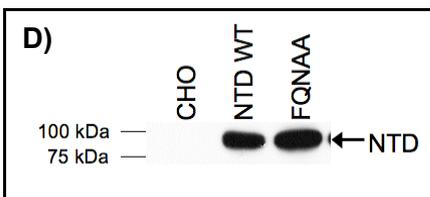
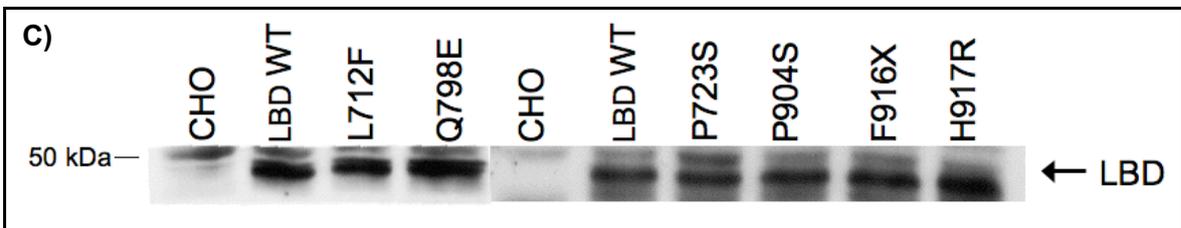
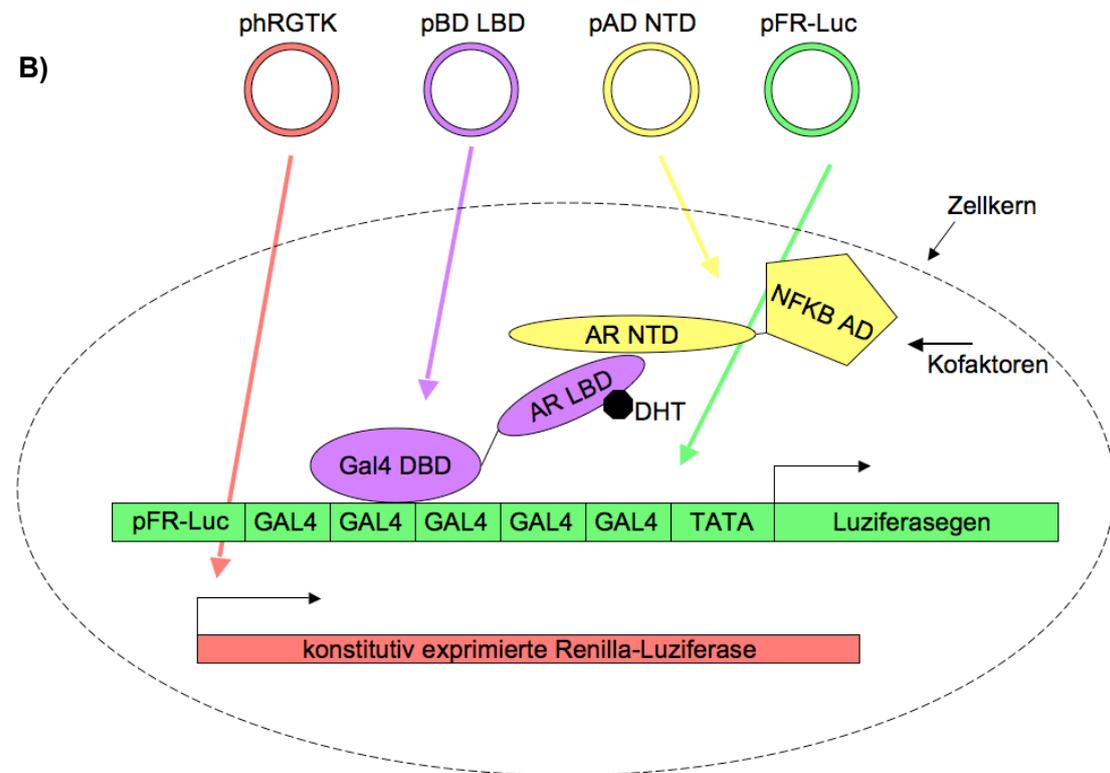


Abb. 18 Two-Hybrid-Assay zur Detektion der N/C-terminalen Interaktion

A) Balkendiagramm der N/C-Interaktion: Die Transfektion der CHO-Zellen wurde wie in Abb. 18 B beschrieben durchgeführt. 5 Stunden nach Transfektion wurde DHT in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Mit dem Dual-Luziferase-Assay wurde die Aktivität der Luziferasen nach weiteren 18 h getrennt detektiert und die Ergebnisse nach Transfektionseffizienz normalisiert. Die Werte von Wildtyp NTD und LBD bei 10 nM DHT wurde gleich 100 % gesetzt. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Es wurden mindestens 3 unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt. RLU: relative Luziferase Einheiten.

B) Schemazeichnung des Mammalian-Two-Hybrid-Assays (nach dem Handbuch von Stratagene): CHO-Zellen wurden mit den Vektoren pBD-LBD (kodiert für das Fusionsprotein aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und AR-LBD, hier violett dargestellt) und pAD-NTD (kodiert für das Fusionsprotein aus der NFKB Aktivierungsdomäne und AR-NTD, hier gelb dargestellt) sowie dem Reportergen pFR-Luc (Leuchtkäfer-Luziferase, grün dargestellt) und der konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase phRGTK (rot dargestellt) transfiziert. In den CHO-Zellen werden die beiden Fusionsproteine über ihre CMV-Promotoren exprimiert. Im

Zellkern wird nach Hormonzugabe (DHT) die Interaktion zwischen AR N- und C-Terminus ausgelöst, wodurch sich beide Fusionsproteine aneinander anlagern. Über die Gal4-DNA-Bindungsdomäne findet eine Assoziation an die Gal4-responsiven Elemente, stromaufwärts des Reportergens pFR-Luc, statt. Über die Aktivierungsdomäne von NFκB werden zelluläre Kofaktoren rekrutiert und die Expression des Luziferasegens initiiert. Die Expression von pFR-Luc ist somit von einer funktionierenden N/C-terminalen Interaktion abhängig.

C) und D) Western-Blot-Analysen der Fusionsproteine: CHO-Zellen wurden mit pBD-LBD- bzw. pAD-NTD-Konstrukten sowie dem Plasmid der konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase pHRGTK transfektiert. Die auf den Blot aufgetragene Proteinmenge wurde nach der Transfektionseffizienz normalisiert und durch Western-Blot-Analysen immunodetektiert. Die LBD-Fusionsproteine wurden mit den Antikörpern Anti-Gal4 (DBD), Santa Cruz, und Anti-Kaninchen IgG Antikörper, Sigma-Aldrich, und die NTD-Fusionsproteine mit dem Anti-Androgen Receptor (F39.4.1), Biogenex und ECL™ Anti-Maus IgG Antikörper, Amersham, immunodetektiert. Die LBD-Gal4-DBD hat ein Molekulargewicht von 58 kDa, die NTD-NFκB von 81,3 kDa. Nicht transfektierte CHO-Zellen (CHO) zeigten keine Bande.

2.3 Interaktion mit Kofaktoren

Der Androgenrezeptor benötigt für die Transaktivierung seiner Zielgene das optimale Zusammenspiel verschiedenster Koaktivatoren. Diese interagieren sowohl mit der NTD als auch der LBD des AR. Wichtig für die Kofaktorinteraktion in der LBD ist die Activation-Function-2 (AF2) (Askew *et al.* 2007). Um exemplarisch die Auswirkung der beschriebenen Mutationen auf die Kofaktorwirkung darzustellen, wurden Kotransfektionen der isolierten LBD mit zwei bekannten Kofaktoren durchgeführt.

SRC1e gehört zur Familie der p160 Koaktivatoren und interagiert mit dem AR über die AF2 der LBD (Ma *et al.*, 1999). Hierfür ist ein LXXLL-Motiv entscheidend, das, wie das ²³FQNLF²⁷-Motiv der NTD, über eine Kofaktor-Bindungsgrube der AF2 bindet, allerdings mit geringerer Affinität (Dubbink *et al.*, 2004). Um die Auswirkung der LBD-Mutationen auf die Interaktion mit SRC1e zu untersuchen, wurden Kotransfektionen mit den pBD-LBD Vektoren mit Mutation und SRC1e bzw. dem leeren Expressionsvektor pSG5, pFR-Luc als Reportergen und pHRGTK durchgeführt.

In Abb. 19 ist eine hormonabhängige Transaktivierung des Reporter-Gens durch die isolierte Wildtyp-LBD zu erkennen. Die Überexpression von SRC1e erhöhte die Transaktivierung etwa um das Zweifache. Nur die Mutation Q798E zeigte eine ähnliche Transaktivierungsfunktion wie die Wildtyp-LBD (Abb. 19). Auch hier führte die Kotransfektion von SRC1e zu einer Steigerung der Transaktivität auf mehr als 200 %. Die Mutation F916X inhibierte, wie aus den vorigen Versuchen bereits zu erwarten, die Transkriptionsinitiation vollständig (Abb. 19). Die PAIS-Mutation L712F führte ebenfalls zu einer gestörten Funktion der AF2, die auch durch die Kotransfektion mit SRC1e nicht verändert werden konnte. Die LBD mit den CAIS-Mutationen P723S und P904S konnte über die AF2 ebenfalls nicht genügend zelluläre Koaktivatoren rekrutieren. Nur bei 100 nM DHT und der Überexpression von SRC1e konnte für die LBD mit P904S eine leichte Transkriptions-

aktivierung festgestellt werden. Die CAIS-Mutation H917R verzögerte die Aktivierung der AF2. Während die Wildtyp LBD und die LBD mit Q798E ihre maximale Aktivierung schon bei 1 nM DHT erreichten, zeigte die LBD mit H917R hier noch keine Aktivierung. Bei 10 und 100 nM DHT konnte sie 50 % der Wildtyp-Aktivierung erreichen. Die Überexpression von SRC1e steigerte die Transaktivierung ebenfalls auf das Doppelte, was der Transaktivierung des Wildtyps ohne Überexpression von SRC1e entsprach (Abb. 19).

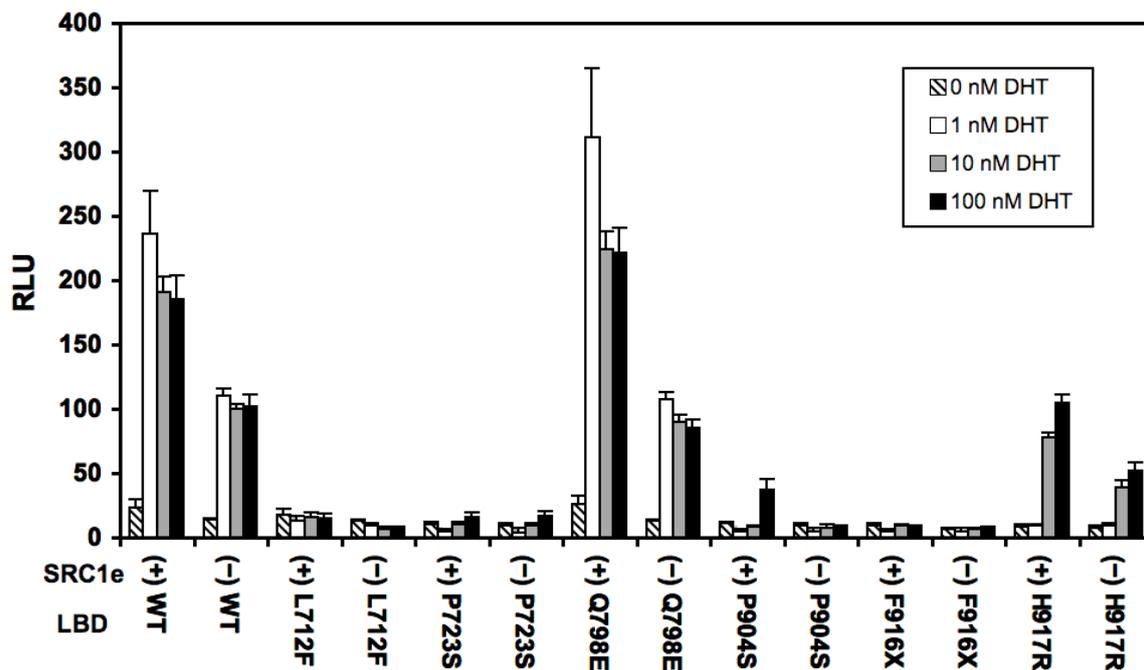


Abb. 19 Interaktion der AR LBD mit SRC1e

CHO-Zellen wurden mit pBD-LBD-Konstrukten, dem Expressionsvektor SRC1e in pSG5 (+) oder dem leeren Expressionsvektor pSG5 (-), dem Reportergen pFR-Luc und pHRTK kotransfiziert. 5 Stunden nach Transfektion wurden die angegebenen Hormonkonzentrationen durch Zugabe von DHT hergestellt. Die Luciferaseaktivitäten wurden nach weiteren 18 Stunden detektiert. Das LBD-Gal4-DBD Fusionsprotein kann durch DHT-Aktivierung der LBD und Anlagerung an die Gal4-responsiven Elemente von pFR-Luc selbst Kofaktoren aktivieren und die Expression der Luciferase initiieren (-). Durch die zusätzliche Überexpression von SRC1e (+) wird die Transaktivierungsfunktion der LBD verstärkt. Die Ergebnisse wurden nach Transfektionseffizienz normalisiert und der Mittelwert der WT pBD-LBD bei 10 nM DHT ohne Überexpression von SRC1e gleich 100 % gesetzt. Es wurden drei unabhängige Versuche in Triplikaten durchgeführt. RLU: relative Luciferase Einheiten.

In Folge wurde die Interaktion mit dem Kofaktor BAG1L genauer analysiert. BAG1L gehört zu einer Gruppe von Kochaperonen, die die Funktion von Steroidrezeptoren regulieren (Froesch *et al.*, 1998). BAG1L kann dabei seine Funktion als Kofaktor über die Interaktion mit dem Hitzeschockprotein HSP70, über eine modulierende Interaktion mit DNA oder über die direkte Interaktion mit bestimmten Proteinen vermitteln (Gehring *et al.*, 2006). Der AR kann mit dem Kofaktor sowohl über seine NTD als auch LBD interagieren. Hier-

durch wird die Transaktivierungsfunktion des AR gesteigert (Shatkina *et al.* 2003). Im Unterschied zu SRC1e besitzt BAG1L kein klassisches LXXLL-Motiv.

In diesem Versuch wurde untersucht, ob die Formation einer aktiven AF2 auch für diese Kofaktorinteraktion entscheidend ist. Hierzu wurden die pBD-LBD Vektoren mit BAG1L oder dem leeren Expressionsvektor pcDNA3, pFR-Luc als Reporter gen sowie phRGTK kotransfiziert. Die Ergebnisse sind den Ergebnissen der Kotransfektion mit SRC1e sehr ähnlich (Vergleich Abb. 19 und 20).

Die hormonabhängige Transaktivierungskapazität der Wildtyp-LBD wurde durch die Überexpression von BAG1L ebenfalls auf das Zweifache gesteigert. Die LBD mit Q798E zeigte wiederum dem Wildtyp vergleichbare Ergebnisse. Die H917R Mutante zeigte eine Transkriptionsaktivierung bei hohen DHT-Konzentrationen (10/100 nM DHT), die 50 % der Wildtyp-Aktivität entsprach und durch die Überexpression von BAG1L verdoppelt werden konnte. Die LBD mit den Mutationen L712F, P723S, P904S noch F916X konnte keinen aktiven Transkriptionskomplex rekrutieren, unabhängig von der An- oder Abwesenheit des Kofaktors BAG1L (Abb. 20).

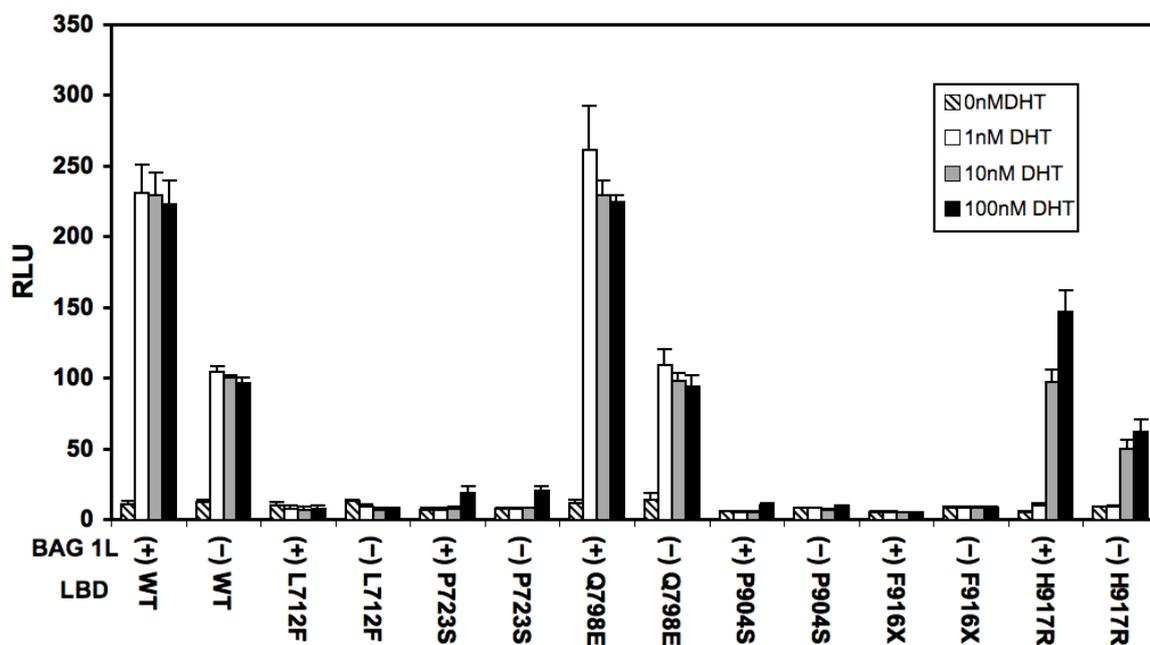


Abb. 20 Interaktion der AR LBD mit BAG1L

Entsprechend des Versuches von SRC1e wurden CHO-Zellen mit pBD-LBD Konstrukten, dem Expressionsvektor BAG1L in pcDNA3 (+) oder dem leeren Expressionsvektor pcDNA3 (-), dem Reporter gen pFR-Luc und phRGTK kotransfiziert. 5 Stunden nach Transfektion wurden die angegebenen Hormonkonzentrationen durch Zugabe von DHT hergestellt. Die Luciferaseaktivitäten wurden nach weiteren 18 Stunden detektiert. Die Ergebnisse wurden nach Transfektionseffizienz normalisiert und der Mittelwert der WT pBD-LBD bei 10 nM DHT ohne Überexpression von BAG1L gleich 100 % gesetzt. Es wurden drei unabhängige Versuche in Triplicaten durchgeführt. RLU: relative Luciferase Einheiten.

2.4 N/C-Abhängigkeit verschiedener Promotoren

In der Literatur wurden Promotoren des AR in zwei Gruppen geteilt: Promotoren, die für ihre Transaktivierung auf eine funktionierende N/C-Interaktion angewiesen sind wie der Probasin- und der PSA-Promotor und N/C-unabhängige Promotoren wie der MMTV- und Sex-limited-protein(Slp-)Promotor (He *et al.*, 2002a). Um diese Ergebnisse mit dem in unseren Versuchen verwendeten (ARE)₂-TATA-Promotor vergleichen zu können, analysierten wir die Transaktivität des AR an unterschiedlichen Promotoren. Hierzu wurde der AR mit den Mutationen ²³FQNAA²⁷, L712F sowie ihrer Kombination (²³FQNAA²⁷ und L712F) im Vergleich zum Wildtyp am MMTV-, Probasin- und (ARE)₂-TATA-Promotor in CHO und HeLa-Zellen untersucht. Die bisher beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die natürlich vorkommende Mutation L712F ebenso wie das konstruierte ²³FQNAA²⁷-Motiv die N/C-Interaktion unterbinden (Abb. 18 B).

Der Wildtyp AR erreichte in CHO-Zellen am MMTV-Promotor bereits bei Konzentrationen von 0,1 nM DHT 80 % seiner maximalen Transaktivität, während die Aktivität am (ARE)₂-TATA- und Probasin-Promotor nur bei 40 % lag (Vergleich des WT in Abb. 21 A mit Abb. 21 B/C). Bei 1 nM DHT war am MMTV-Promotor bereits die maximale Aktivität erreicht, an den beiden anderen Promotoren kam es zu einer 80 %-igen Aktivierung des Reportergens. An allen Promotoren führte die Konzentration von 10 und 100 nM DHT zu einer maximalen Aktivierung des Reportergens. Da am Probasin-Promotor in CHO-Zellen eine Basalaktivität von fast 20 % festzustellen war (Abb. 20 C), wurde dieser Versuch zum Vergleich in HeLa-Zellen durchgeführt (Abb. 21 D). Die Grundaktivität konnte hierdurch auf 5 - 10 % gesenkt werden, während die maximale Aktivität und Sättigung des Rezeptors erst bei 100 nM DHT erreicht wurde (40 % bei 1 nM, 100 % bei 10 nM, 180 % bei 100 nM DHT).

Werden die WT-Messwerte als Konzentrations-Wirkungs-Kurve aufgetragen (Abb. 21 E), zeigt sich, dass die EC₅₀ in Abhängigkeit vom verwendeten Promotor variiert. Am MMTV-Promotor in CHO-Zellen errechnet sich eine EC₅₀ von $4,29 \times 10^{-11}$ (CI: $3,47 \times 10^{-11} - 5,32 \times 10^{-11}$), damit findet an diesem Promotor schon bei geringen DHT-Konzentrationen eine Transaktivierung des Reportergens statt. Die EC₅₀ des (ARE)₂-TATA-Promotors in CHO-Zellen liegt bei $2,2 \times 10^{-10}$ ($1,95 \times 10^{-10} - 2,48 \times 10^{-10}$). Der Probasin-Promotor hat in CHO-Zellen eine vergleichbare EC₅₀ von $2,39 \times 10^{-10}$ (CI: $2,07 \times 10^{-10} - 2,82 \times 10^{-10}$). In HeLa-Zellen wurde eine erheblich höhere EC₅₀ von $6,15 \times 10^{-9}$ (CI: $4,655 \times 10^{-9} - 8,13 \times 10^{-9}$) berechnet.

Der AR mit den Einzelmutationen L712F und ²³FQNAA²⁷ zeigte am MMTV-Promotor in CHO-Zellen eine maximale Aktivität von 60 - 70 % des Wildtyps (Abb. 21 A). Der AR mit L712F reagierte dabei, wie auch in den vorigen Ergebnissen, mit einer verzögerten Akti-

vierung von nur 10 % bei 0,1 nM DHT und 60 % bei 1 nM DHT. Die Mutation ²³FQNAA²⁷, reduzierte die maximale Transaktivierung auf 60 %. Wie beim Wildtyp reichte die Konzentration von 0,1 nM DHT bereits zur Induktion der maximalen Transaktivität.

Die Kombination beider Mutationen führte zu einer stärkeren Einschränkung der Rezeptoraktivität. Die maximale Aktivierung lag bei 40 % der Wildtyp-Aktivität. Der Kurvenverlauf entsprach dem des AR mit L712F. Eine Transaktivierung war erst bei höheren Hormonkonzentrationen sichtbar (siehe Abb. 21 A).

Sowohl am Probasin- als auch am (ARE)₂-TATA-Promotor erreichte der AR mit L712F in CHO-Zelle mit 60 % der Wildtyp-Aktivität eine deutlich höhere Aktivierung als die ²³FQNAA²⁷-Variante mit 20 - 40 % (siehe Abb. 21 B/C). Durch die Kombination der beiden Mutationen wurde die maximale Transaktivität erst bei höheren Hormonkonzentrationen erreicht. Dieses Ergebnis ist kongruent mit den übrigen Ergebnissen der Mutation L712F. Mit 20 - 40 % der Wildtyp-Transaktivität entsprach die maximale Transaktivität der Doppelmutation dem Wert der Einzelmutation ²³FQNAA²⁷.

Die Mutationen zeigten an den verschiedenen Promotoren unterschiedliche Wirkungsprofile. Während der AR mit L712F an allen Promotoren 60 % der Wildtyp-Transaktivität erreicht, scheint das ²³FQNLF²⁷-Motiv für die Aktivierung über den Probasin- und (ARE)₂-TATA-Promotor essenziell zu sein (siehe Abb. 21 B/C). Eine Kombination der beiden Mutationen führte nur am MMTV-Promotor zu einer Reduktion der Transaktivität im Vergleich zu den Einzelmutationen, L712F und ²³FQNAA²⁷. Am Probasin- (Abb. 21 C/D) und (ARE)₂-TATA-Promotor (Abb. 21 B) entsprach die maximale Transaktivierung der Mutation ²³FQNAA²⁷ dem Wert der Doppelmutation. Die Wirkung von DHT wurde zum einen durch den Promotor und zum anderen durch den Zelltyp beeinflusst. Es ist fraglich, ob sich die Unterschiede in der Transaktivität an den verschiedenen Promotoren wirklich auf eine N/C-Abhängigkeit dieser zurückführen lassen. Die Mutationen L712F und ²³FQNAA²⁷, die beide keine N/C-Interaktion zulassen, wirken sich unterschiedlich auf die Rezeptorfunktion aus. Es ist davon auszugehen, dass jeder Promotor auf das Zusammenspiel spezifischer Kofaktoren angewiesen ist. Jeder Zelltyp besitzt ein spezifisches Ensemble von Kofaktoren. Hierdurch lassen sich die Unterschiede der EC₅₀ zwischen CHO- und HeLa-Zellen erklären. Mutierte Rezeptoren scheinen die Interaktion mit spezifischen Kofaktoren, je nach Mutation, in unterschiedlichem Ausmaß zu inhibieren. Dadurch können sie an verschiedenen Promotoren ein unterschiedliches Ausmaß der Funktionseinschränkung zeigen.

Western-Blot-Analysen zeigten in CHO-Zellen eine vergleichbare Expression der verwendeten AR-Varianten (Abb. 21 F). Die Unterschiede in den Reportergen-Assays lassen sich somit nicht auf eine unterschiedliche Proteinexpression zurückführen.

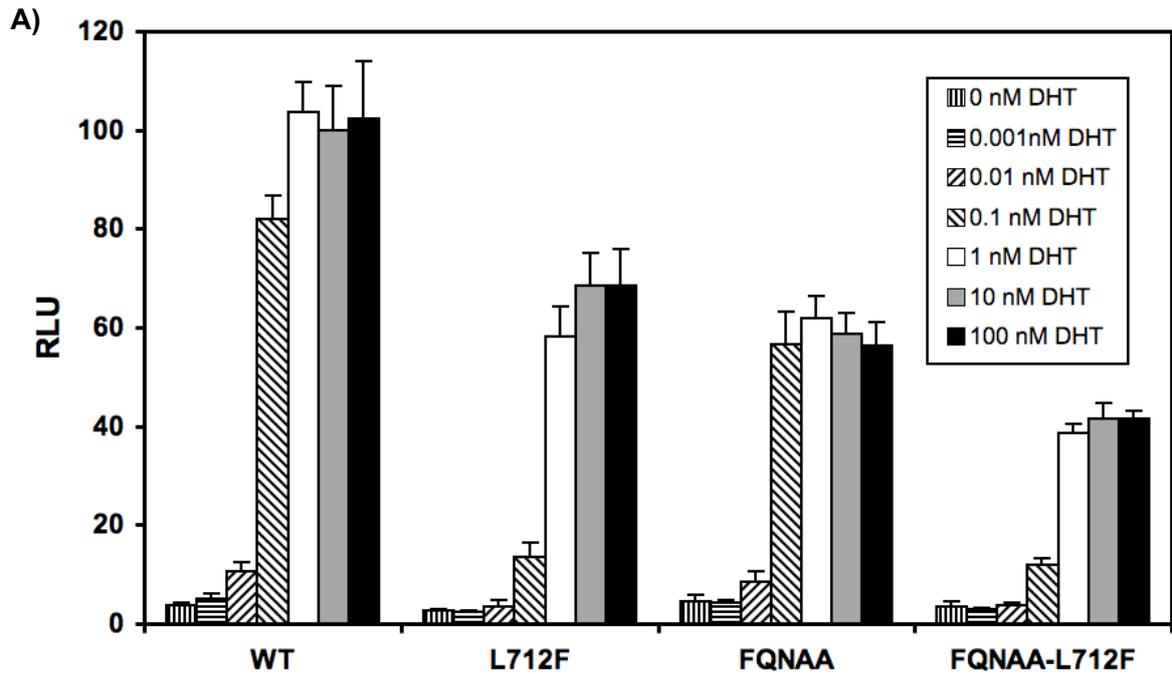
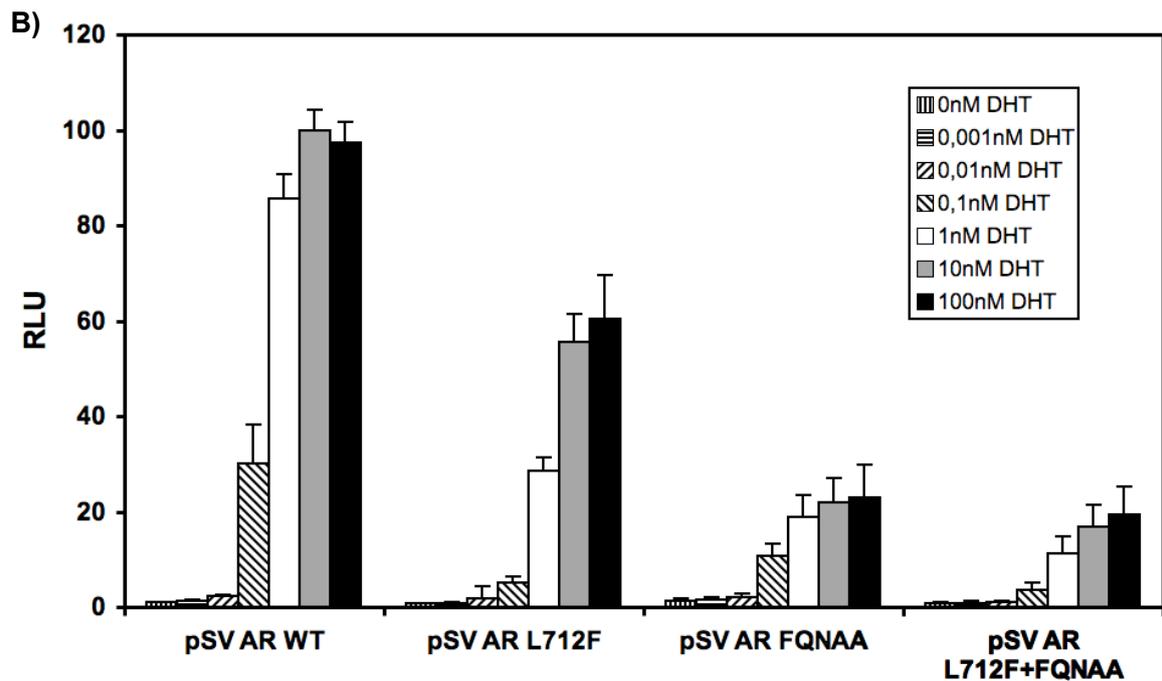


Abb. 21 A) Transaktivität am MMTV-Promotor in CHO-Zellen

Abb. 21 B) Transaktivität am (ARE)₂-TATA-Promotor (V1-V3) in CHO-Zellen

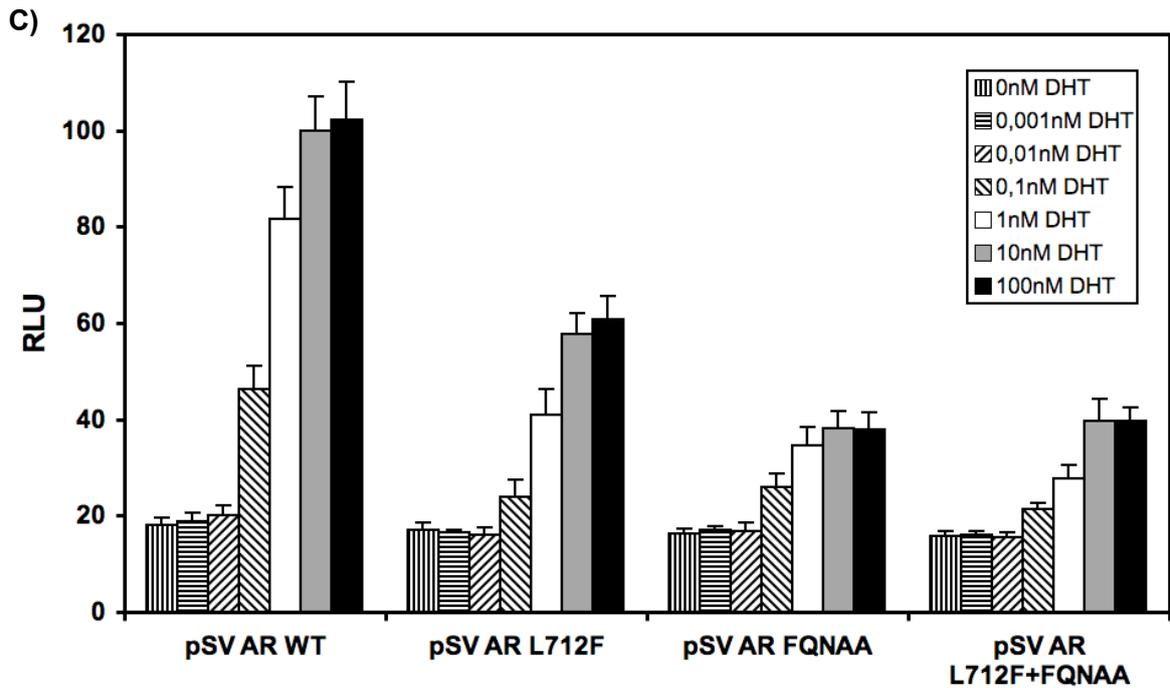


Abb. 21 C) Transaktivität am Probasin-Promotor in CHO-Zellen

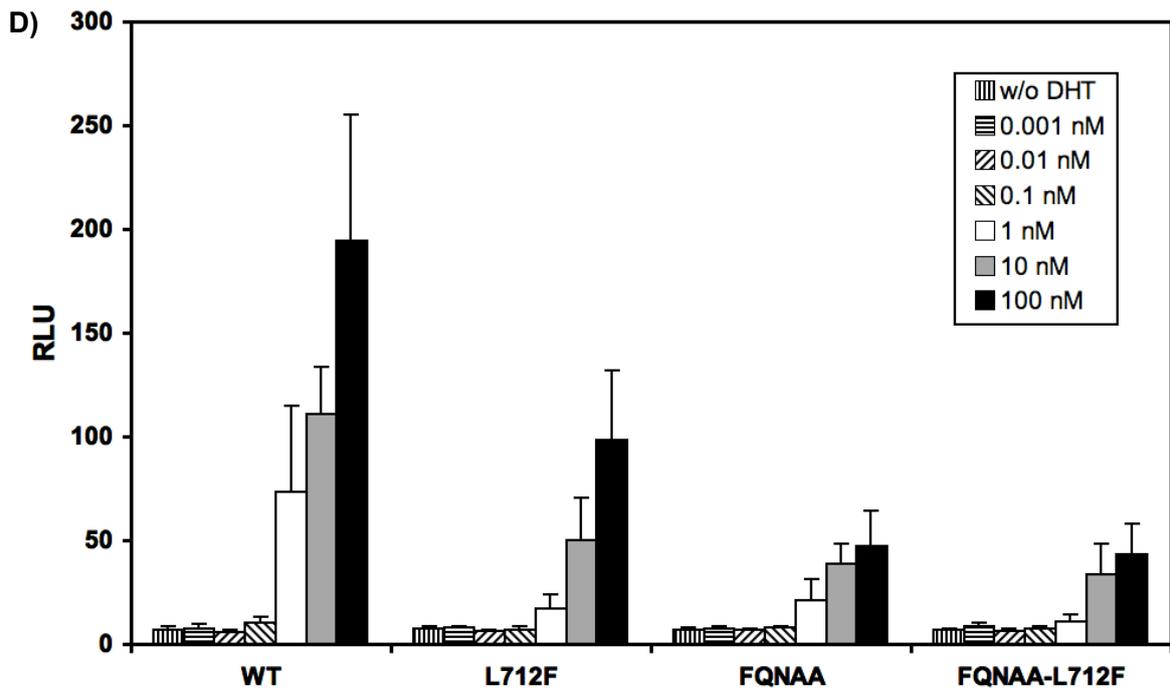
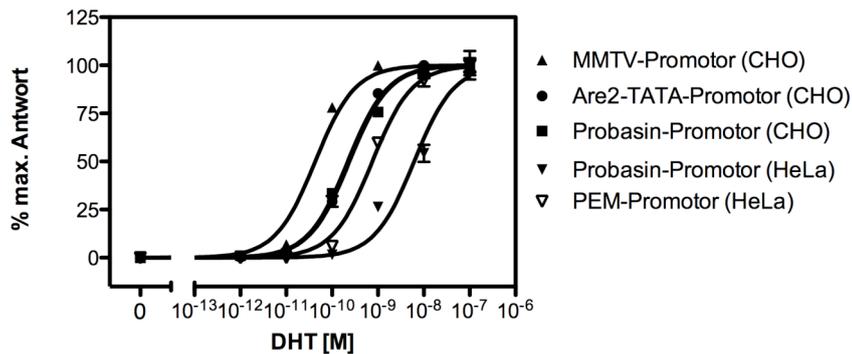


Abb. 21 D) Transaktivität am Probasin-Promotor in HeLa-Zellen

E) WT-AR an verschiedenen Promotoren



Promotor	MMTV	(ARE) ₂ -TATA	Probasin	Probasin	Pem
Zelllinie	CHO	CHO	CHO	HeLa	HeLa
EC ₅₀	4,29 x 10 ⁻¹¹	2,2 x 10 ⁻¹⁰	2,39 x 10 ⁻¹⁰	7,56 x 10 ⁻¹⁰	6,15 x 10 ⁻⁹

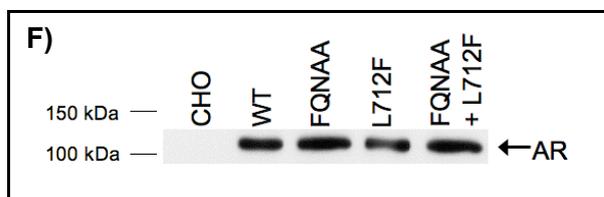


Abb. 21 Transaktivität des AR an verschiedenen Promotoren

CHO- (A-C), bzw. HeLa- (D) Zellen wurden mit pSVAR-Konstrukten (WT, L712F, ²³FQNAA²⁷ und L712F + ²³FQNAA²⁷), der konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase phRGTK und verschiedenen Reportergenen (A: MMTV-Luc B: (ARE)₂-TATA-Luc; C/D: PB-Luc) transfektiert. 5 Stunden nach Transfektion wurde DHT in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Die Ergebnisse wurden nach der Transfektionseffizienz normalisiert. Der Mittelwert des WT AR bei 10 nM DHT wurde gleich 100 % gesetzt. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Versuche in Triplikaten durchgeführt. Standardabweichungen wurden berechnet und als Fehlerbalken angegeben. RLU: relative Luziferase Einheiten.

E) Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des WT AR an verschiedenen Promotoren: Aus den WT-Werten aus A-D wurden mit Prism5 (GraphPad, USA) Konzentrations-Wirkungs-Kurven berechnet. Zu sehen sind von links nach rechts die Kurven der WT-Transaktivierung am MMTV-Promotor (in CHO-Zellen), fast deckungsgleich am (ARE)₂-TATA-Promotor und Probasin-Promotor (beide in CHO-Zellen), Pem-Promotor (in HeLa-Zellen, die Werte entstammen dem Versuch der N-terminalen Mutationen, dargestellt in Abb. 23) und am Probasin-Promotor (in HeLa-Zellen). Die zugehörigen EC₅₀-Werte sind ergänzend tabellarisch dargestellt.

F) Western Blot der AR-Mutanten in ganzer Länge: CHO-Zellen wurden mit den pSVAR-Konstrukten (WT, L712F, ²³FQNAA²⁷ und L712F + ²³FQNAA²⁷) und phRGTK transfektiert und die Zellen anschließend lysiert. Für den Western Blot wurden, normalisiert nach Transfektionseffizienz, zwischen 10 und 25 µl Proteinlysate verwendet. Die Immundetektion erfolgte mit dem Anti-Androgen Rezeptor (F39.4.1) von Biogenex als Primärantikörper und dem ECLTM Anti-Maus IgG Antikörper von Amersham als Sekundärantikörper. Das Molekulargewicht des AR beträgt ca. 110 kDa. Nicht transfektierte CHO-Zellen (CHO) dienten der Negativkontrolle.

3. NTD-Mutationen

3.1 N/C-terminale Interaktion bei NTD-Mutationen

In leichteren Formen von AIS ist der *in-vitro* Nachweis einer Funktionseinschränkung des AR, die bei CAIS meist problemlos gelingt, weitaus schwieriger (Zuccarello *et al.*, 2008). Unter unseren Patienten fanden sich drei N-terminale Mutationen, die mit PAIS assoziiert sind. In vorausgehenden Reporter-gen-Assays in CHO-Zellen konnte am (ARE)₂-TATA-Promotor für die Mutation S432F eine Minderung der Transaktivierung von 75 - 80 % gezeigt werden, während die Punktmutation S411N und die Deletion Δ 409-411 zu keiner Funktionseinschränkung des Rezeptors führten (Holterhus *et al.*, 2005b).

Um Auswirkungen der PAIS-Mutationen auf die N/C-terminale Interaktion genauer zu analysieren, wurde die mutierte pAD-NTD (mit S411N, S432F oder Δ 409-411) mit dem pBD-LBD Wildtyp-Vektor sowie dem Reporter-gen pFR-Luc und phRGTK in CHO-Zellen kotransfiziert. Die im Luminometer detektierten Messwerte der durch DHT vermittelten Interaktion zwischen NTD und LBD sind in Abb. 22 dargestellt. Die WT-Aktivität bei 10 nM DHT wurde gleich 100 % gesetzt. Die mutierten NTDs führten zu einer leichten Minderung der N/C-Interaktion auf 80 - 90 %. Da bei den Einzelmesswerten zwischen den Gruppen gleiche Varianz gegeben war, konnte ein T-Test durchgeführt werden. Die Abweichung vom Wildtyp ist bei allen drei Mutanten statistisch signifikant ($p < 0,001$ siehe Tbl. 6). Die AR-Variante ²³FQNAA²⁷, die die N/C-Interaktion unterbindet, zeigte eine maximale Aktivierung von 10 % des Wildtyps (Abb. 22).

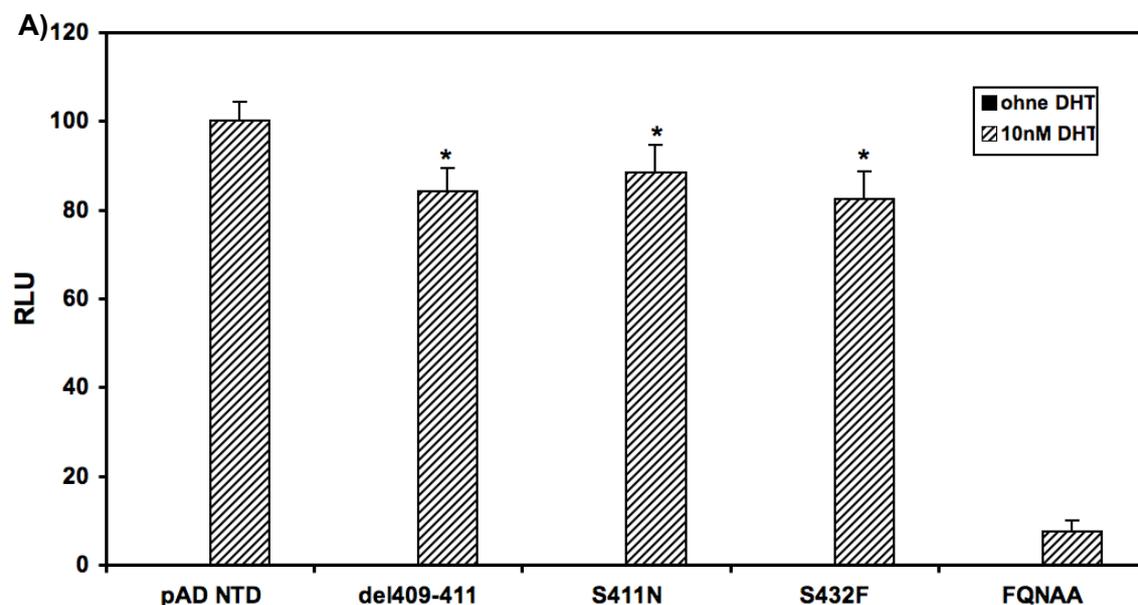




Abb. 22 N/C-terminale Interaktion der NTD-Mutationen

A) CHO-Zellen wurden mit pBD-LBD WT und pAD-NTD Mutanten (WT, Δ 409-411, S411N, S432F und $^{23}\text{FQNAA}^{27}$), dem Reporter gen pFR-Luc und pHRGTK transfektiert. Nach 5-stündiger Inkubation wurde 10 nM DHT (bzw. kein DHT) zugegeben. Die Interaktion der entstehenden Fusionsproteine führte zur Expression des Reportgens. Die Ergebnisse wurden nach Transfektionseffizienz normalisiert. Der Mittelwert der WT-Interaktion bei 10 nM DHT wurde gleich 100 % gesetzt. Es wurden drei unabhängige Versuche in Triplikaten durchgeführt. Durch einen T-Test (Tbl. 6) wurden die Einzelwerte der mutierten Rezeptoren mit den WT-Werten verglichen und ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt (*). RLU: relative Luziferase Einheiten.

B) Western Blot der AR-NTD Fusionsproteine. Für Western-Blot-Analysen wurden CHO-Zellen mit den pAD-NTD Mutanten und pHRGTK kotransfektiert und die Zellen anschließend lysiert. Auf den Western Blot wurden, normalisiert nach Transfektionseffizienz, zwischen 10 und 25 μl Proteinlysate aufgetragen. Die Immundetektion erfolgte mit dem Anti-Androgen Rezeptor (F39.4.1) von Biogenex als Primärantikörper und dem ECLTM Anti-Maus IgG Antikörper von Amersham als Sekundärantikörper. Nicht transfektierte CHO-Zellen (CHO) dienen der Negativkontrolle. Das Molekulargewicht des NTD-NFKB-Fusionsproteins beträgt 81,3 kDa.

	WT	Δ 409-411	S411N	S432F
Mittelwert \pm SD	100 \pm 4,36	84,08 \pm 5,23	88,5 \pm 6,17	82,3 \pm 6,39
t		7,019	4,567	6,743
Freiheitsgrade	16	16	15	16
P		= <0,001	= <0,001	= <0,001

Tbl. 6 T-Test zum Beweis der Signifikanz der Abweichung der N/C-Interaktion zwischen N-terminalen Mutationen und WT

Innerhalb der NTD sind zwei Motive für die N/C-Interaktion entscheidend, das stärkere $^{23}\text{FQNL}^{27}$ - und das schwächere $^{433}\text{WHTLF}^{437}$ -Motiv (He *et al.*, 2000). Die untersuchten NTD-Mutationen liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zum $^{433}\text{WHTLF}^{437}$ -Motiv. Um zu detektieren, ob diese sich direkt auf die Wirkung von $^{433}\text{WHTLF}^{437}$ auswirken, wurde das $^{23}\text{FQNAA}^{27}$ in die pAD-NTD-Vektoren integriert. Hierdurch wurde die Wechselwirkung über das $^{23}\text{FQNL}^{27}$ -Motiv unterbunden und die N/C-terminale Interaktion erneut untersucht (Abb. 23). Die maximale Aktivität mit $^{23}\text{FQNAA}^{27}$ entsprach, wie oben erwähnt, 10 % der Aktivität mit $^{23}\text{FQNL}^{27}$ -Motiv. In diesem Versuch waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der hormonvermittelten N/C-Interaktion von Wildtyp und mutierter NTD zu erkennen (Abb. 23 A). Durch Western-Blot-Analysen wurde gezeigt, dass Wildtyp und mutierte NTDs in CHO-Zellen gleich stark exprimiert wurden (Abb. 23 B).

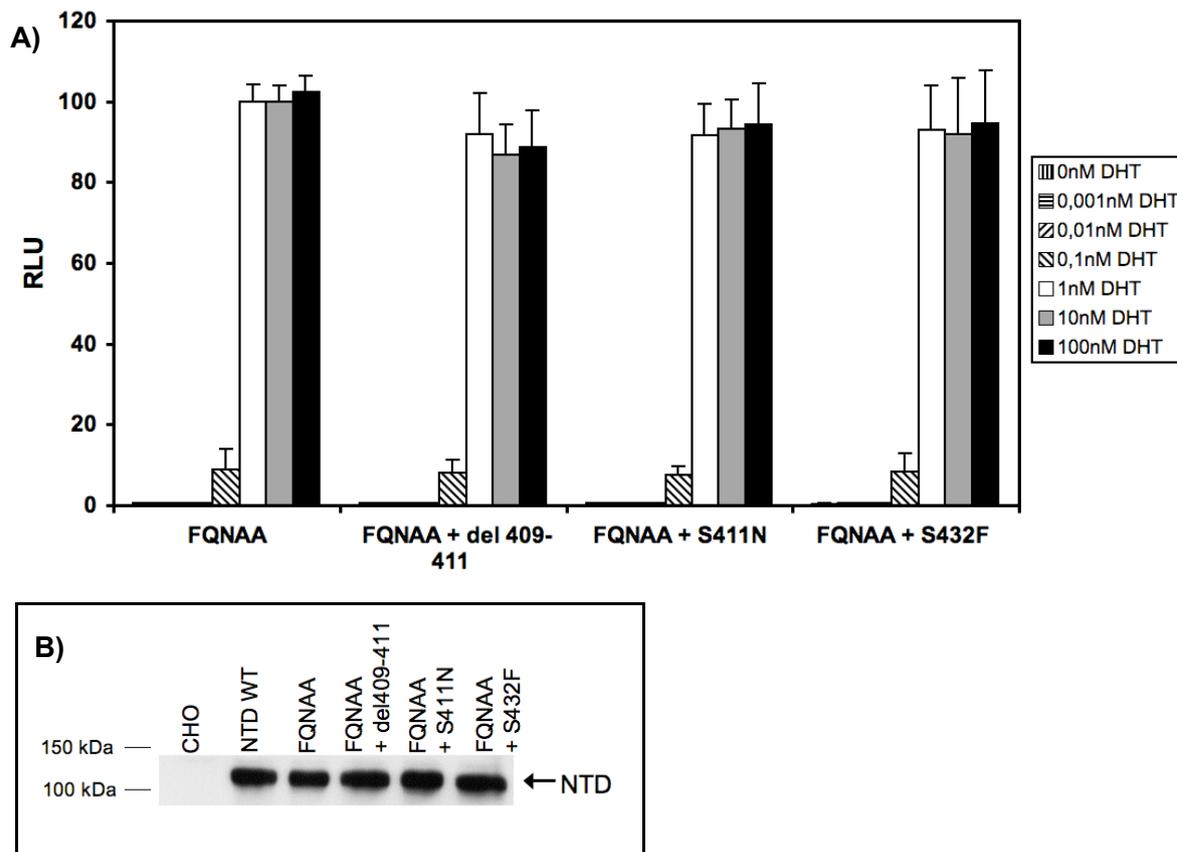


Abb. 23 N/C-Interaktion der NTD-Mutationen mit $^{23}\text{FQNAA}^{27}$ -Motiv

A) Es wurden die Two-Hybrid-Vektoren pBD-LBD WT und pAD-NTD-Varianten (mit den Mutationen $^{23}\text{FQNAA}^{27}$, $^{23}\text{FQNAA}^{27} + \Delta 409-411$, $^{23}\text{FQNAA}^{27} + \text{S411N}$ oder $^{23}\text{FQNAA}^{27} + \text{S432F}$), das Reportergen pFR-Luc und pHRGTK in CHO-Zellen transfektiert. 5 Stunden nach Transfektion wurde DHT in den angegebenen Konzentrationen zugegeben und nach weiteren 18 h die Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die Ergebnisse wurden nach Transfektionseffizienz normalisiert. Der Mittelwert der $^{23}\text{FQNAA}^{27}$ -Mutation bei 10 nM DHT wurde gleich 100 % gesetzt. Es wurden 3 unabhängige Versuche in Triplikaten durchgeführt. RLU: relative Luziferase Einheiten.

B) Western Blot der AR-NTD-Fusionsproteine: CHO-Zellen wurden mit den pAD-NTD Vektoren ($^{23}\text{FQNAA}^{27}$, $^{23}\text{FQNAA}^{27} + \Delta 409-411$, $^{23}\text{FQNAA}^{27} + \text{S411N}$ und $^{23}\text{FQNAA}^{27} + \text{S432F}$) und pHRGTK kotransfektiert und die Zellen lysiert. Die auf die Blots aufgetragene Proteinmenge (10 bis 25 μl Proteinlysate) wurde nach Transfektionseffizienz normalisiert. Die Immundetektion erfolgte mit Anti-Androgen Receptor (F39.4.1) von Biogenex und ECLTM Anti-Maus IgG Antikörper von Amersham. Nicht transfektierte CHO-Zellen (CHO) dienen der Negativkontrolle. Das Molekulargewicht des NTD-NFKB-Fusionsproteins beträgt 81,3 kDa.

3.2 Transaktivität der N-terminalen Mutationen am Pem-Promotor

Der Androgen-abhängige Pem-Promotor reguliert im Reproduktionstrakt von Mäusen die Expression des Pem-Homeobox-Transkriptionsfaktors. Zuccarello *et al.* (2008) beschrieb diesen Promotor als sehr sensitiv für den Nachweis von PAIS-Mutationen. Bei zwei der beschriebenen N-terminalen Mutationen war in bisherigen Studien keine Funktionseinschränkung *in-vitro* nachweisbar gewesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transaktivierungsfunktion des AR mit N-terminalen Mutationen am sensitiven Pem-Promotor unter-

sucht. Hierzu wurden die mutierten pSVAR-Vektoren im Vergleich zum Wildtyp mit dem Reporter gen Pem-luc und phRGTK in HeLa-Zellen transfektiert. Der Wildtyp-AR zeigte eine hormonabhängige Aktivierung des Reporter gens (Abb. 24). Bei 0,1 nM DHT war ein erster Anstieg auf etwa 10 % der Endaktivität zu sehen. Bei 1 nM DHT lag die Transaktivität bei 60 - 70 %, 10 nM DHT wurden gleich 100 % gesetzt. Bei 100 nM wurden 100 - 120 % erreicht.

Die mutierten Rezeptoren zeigten an diesem Promotor keine Reduktion der Transaktivität (Abb. 24). Auch die Mutation S432F, die am (ARE)₂-TATA-Promotor die Transaktivität im Vergleich zum WT deutlich reduzierte, minderte die Transaktivierungsfunktion des AR am Pem-Promotor nicht. Durch Western-Blot-Analysen waren in Vorversuchen Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen AR-Mutanten ausgeschlossen worden (Holterhus *et al.* 2005b).

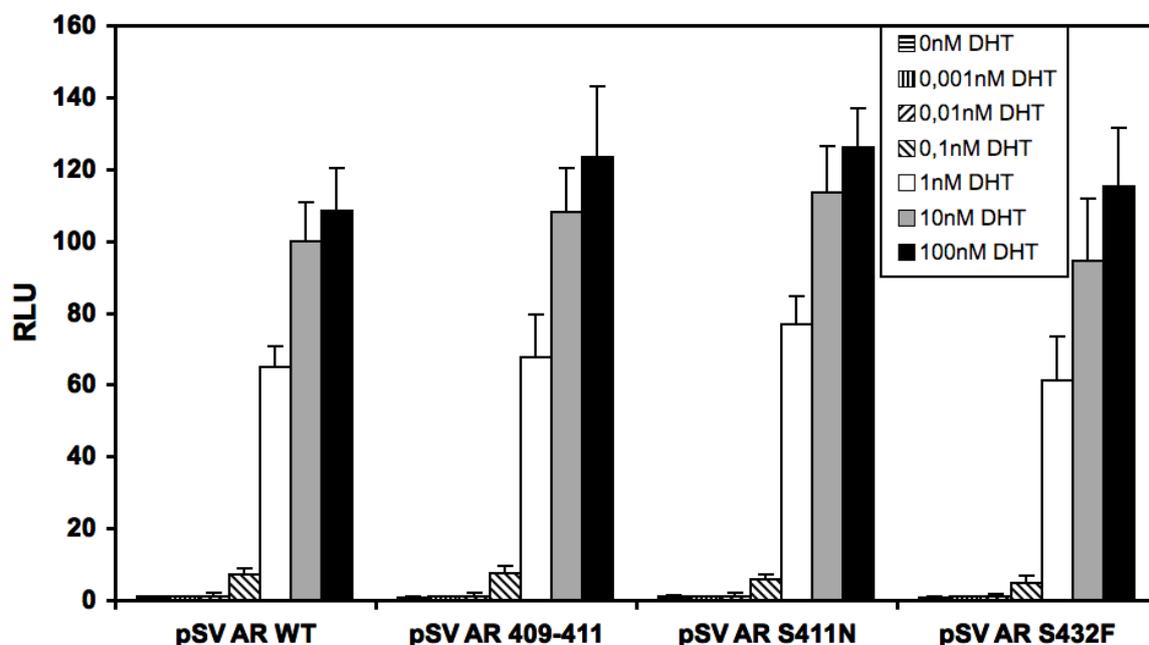


Abb. 24 Transaktivität des AR mit NTD-Mutationen am Pem-Promotor

Die pSVAR-Mutanten (WT, Δ 409-411, S411N und S432F) wurden mit dem Reporter gen Pem-Luc und phRGTK in CHO-Zellen transfektiert. Nach 5 Stunden wurde DHT in angegebener Konzentration zugegeben. Die Luziferaseaktivitäten wurden nach weiterer 18-stündiger Inkubation bestimmt. Die Ergebnisse wurden nach der Transfektionseffizienz normalisiert. Der Mittelwert des Wildtyp-AR bei 10 nM DHT wurde gleich 100 % gesetzt. Es wurden mindestens 3 unabhängige Versuche in Triplikaten durchgeführt. RLU: relative Luziferase Einheiten.

IV Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden acht bekannte Mutationen des AR im Hinblick auf ihre Funktionalität untersucht. Hierzu wurden Zellmodelle eingesetzt, in denen die Transaktivierungsfähigkeit des Rezeptors, die Interaktion zwischen N- und C-Terminus des AR und die Interaktion der LBD mit zwei bekannten Kofaktoren analysiert wurde.

Reporter-Gen-Assays stellen ein etabliertes Verfahren dar, um die Expression von Genen und die Funktion von Transkriptionsfaktoren zu analysieren (Groskreutz und Schenborn, 1997). Auch in Studien zu Mutationen des AR werden sie verwendet, um die Funktion des Rezeptors einschätzen zu können (Zuccarello *et al.*, 2008; Bevan *et al.*, 1996; Jääskeläinen *et al.*, 2006). In der hier vorgestellten Arbeit wurden drei verschiedene Reporter-Gen-Modelle eingesetzt.

Um die Transaktivierungsfähigkeit der mutierten ARs zu untersuchen, wurde ein klassischer Reporter-Gen-Assay durchgeführt. Hierzu wurden Expressionsvektoren des Androgenrezeptors sowie verschiedene Reporter-Gene mit Androgen-abhängigem Promotor mit dem Verfahren der transienten Transfektion in Mammalia-Zellen eingebracht. Durch die Messung der Expression des Reporter-Gens sind Rückschlüsse auf die Funktion des AR möglich.

Die N/C-Interaktion wurde durch den Einsatz eines Mammalian-Two-Hybrid-Systems untersucht. In Studien von Ghali *et al.* (2003) zeigte die Analyse der N/C-terminalen Interaktion Ergebnisse, die mit dem klinischen Bild von fünf AIS-Patienten gut korrelierten. Eine Einschränkung der N/C-terminalen Interaktion wurde als mögliche Ursache von AIS in Patienten mit Mutationen der LBD, die die Hormonbindung nicht stark beeinflussen, vermutet (Thompson *et al.*, 2001). Für den Mammalian-Two-Hybrid-Assay wurden die NTD und LBD separat in Two-Hybrid-Vektoren (pAD-NTD und pBD-LBD) kloniert, wodurch sie als Fusionsproteine mit Domänen anderer Proteine exprimiert werden. Interagieren die beiden Fusionsproteine miteinander, entsteht ein funktionierender Transkriptionsfaktor, der die Expression eines Reporter-Gens initiiert. Da nur die spezifische Interaktion zwischen NTD und LBD die Expression des Reporter-Gens auslöst, eignet sich dieses Verfahren zur Analyse der N/C-Interaktion. Neuere Studien zeigten, dass die Hinge-Region (AS 624-639) einen inhibierenden Effekt auf die N/C-terminale Interaktion sowie auf Kofaktorbindungen ausübt (Askew *et al.*, 2007, Haelens *et al.*, 2007). Deeb *et al.* (2008) zeigten, dass die Hinge-Region eine regulierende Rolle bei der N/C-terminalen Interaktion spielt. Eine Mutation der Hinge-Region, R629W, führte zu einer fehlenden N/C-Interaktion im Two-Hybrid-Assay. Deswegen wurde in den Two-Hybrid-LBD-Vektor (pBD-LBD) die LBD ohne Hinge-Region, von Aminosäure 644 bis 919, integriert.

Der AR bildet über verschiedene Oberflächenstrukturen Interaktionen mit regulatorischen Proteinen aus. Die AF2 der LBD kann mit FXXLF- und LXXLL-Motiven von Kofaktoren (Heery *et al.*, 1997; Hsu *et al.*, 2003) bzw. dem FQNLF-Motiv der NTD (He *et al.*, 2000; Steketeer *et al.*, 2002) interagieren. Die klassischen p160-Koaktivatoren besitzen LXXLL-Motive und konkurrieren mit dem FQNLF-Motiv der NTD um die Bindung an die AF2 (Dubbink *et al.*, 2004). Dabei bindet das FQNLF-Motiv die AF2 mit höherer Affinität als das Leucin-reiche Motiv der Kofaktoren (Hur *et al.*, 2004). Ein vergleichbares FXXLF-Motiv wurde auch in einigen AR-spezifischen Kofaktoren wie ARA 54 und ARA70 detektiert (Kang *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 1999, He *et al.*, 2002b). Van de Wijngaart *et al.* (2006) zeigte, dass auch FXXFF- und FXXMF-Motive mit der AF2 interagieren können. Dadurch erweitert sich die Zahl der interagierenden Proteine. Um die Interaktion von Kofaktoren mit den mutierten Rezeptoren zu untersuchen, wurden zwei strukturell unterschiedliche Kofaktoren des AR ausgewählt. Beide verstärken die Transaktivität des AR in Reporter-Gen-Assays. SRC1e gehört zu den p160 Koaktivatoren und bindet über ein LXXLL-Motiv an die AF2 und über eine Glutamin-reiche Region an die NTD des AR (Ma *et al.*, 1999). BAG1L gehört zu einer Gruppe von Kochaperonen und interagiert ebenfalls sowohl mit der NTD als auch der LBD des AR (Shatkina *et al.*, 2003). Die genaue Bindungsregion in der LBD ist bisher unbekannt.

Um die Auswirkung der in der LBD liegenden Mutationen auf die isolierte AF2 zu analysieren, wurde der Two-Hybrid-Vektor der LBD (pBD-LBD) verwendet. In diesem Vektor sind weder NTD noch Hinge-Region enthalten, dadurch wird eine Überlagerung durch Wechselwirkungen zwischen NTD und Kofaktor vermieden und die inhibierende Wirkung der Hinge-Region unterbunden. Im Zellmodell wurde der pBD-LBD-Vektor mit einem Reporter-Gen und dem Expressionsvektor eines Kofaktors kotransfiziert. Die LBD ist selbst in der Lage, zelluläre Kofaktoren zu rekrutieren und die Expression des Reportergens in Gang zu setzen. Um die zusätzliche Expressionssteigerung durch die Überexpression des Kofaktors zu erkennen, wurde im Vergleich eine Kotransfektion mit dem leeren Expressions-Vektor, ohne Gen des Kofaktors, durchgeführt.

Die Experimente wurden in Triplikaten mit mindestens 3 unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Um Schwankungen der Transfektionseffizienz zu vermeiden, wurden der Vektor der konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase (phRGTK) kotransfiziert und die Ergebnisse nach den Renilla-Messwerten normalisiert. Die DNA aller verwendeten Vektoren wurde durch Sequenzierung verifiziert. Choong *et al.* (1996) beschrieb eine Mutation des AR, die durch ihre Lage die Translation des Rezeptors verminderte und dadurch eine partielle Androgenresistenz in den betroffenen Individuen hervorrief. Mit Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren bzw. Rezeptordomänen mit den 8 untersuchten Mutationen in Säugerzellen gleich stark wie der Wildtyp exprimiert werden.

Unterschiede in der Transaktivierung der Reportergene sind somit auf eine eingeschränkte Funktion der mutierten Rezeptoren zurückzuführen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellmodelle haben den Nachteil, dass die Funktion des AR nicht unter physiologischen Bedingungen getestet wurde. Das Einbringen der Rezeptor-DNA in die Säugerzellen führt zu einer Überexpression des AR in den Mammalia-Zellen, die weit über dem normalen Niveau liegt. Hinzu kommt, dass die DNA der Zielgene des AR im Nukleus normalerweise als Chromatin vorliegt. Im verwendeten Zellmodell sind die Reportergene in den Plasmiden viel freier exponiert. In Studien von Li *et al.* (2007) konnte gezeigt werden, dass verschiedene verkürzte AR-Mutanten in der Lage waren, Reportergene zu aktivieren, während eine Transkriptionsaktivierung von im Chromatin befindlichen Androgen-responsiven Genen nicht möglich war. Für das „Entpacken“ von Genen aus Chromatin ist das Zusammenspiel vieler regulatorischer Proteine nötig. Diese Interaktionen werden bei den durchgeführten Versuchen außer Acht gelassen, könnten aber die Funktion der mutierten ARs *in-vivo* maßgeblich beeinflussen.

Der Hauptteil der Experimente wurde in CHO-K1 Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie stammt aus dem Ovar chinesischer Hamster und wird standardmäßig für Transfektionen verwendet. Wie in der Literatur beschrieben und durch die durchgeführten Western Blots bestätigt, findet in CHO-Zellen keine endogene Expression des AR statt (Delypere *et al.*, 1992). Als weitere Zelllinie wurden HeLa-Zellen verwendet, deren Verwendung ebenfalls in Transfektionsversuchen etabliert ist. Der AR wird in dieser Zelllinie nicht oder nur wenig exprimiert (Read *et al.*, 2007). Inwieweit sich die genregulatorischen Elemente und das Set der zellulären Kofaktoren zwischen den verwendeten Zelllinien und in den Geweben der AIS-Patienten unterscheiden, ist nicht bekannt. Es wurde nachgewiesen, dass die Zusammensetzung der Kofaktoren, und damit die Sensibilität auf bestimmte Hormone, auch innerhalb des menschlichen Organismus, in verschiedenen Geweben und zu verschiedenen Zeitpunkten des Lebens Schwankungen unterliegt (Bebermeier *et al.* 2006; Trapman und Dubbink, 2007). Hieraus lässt sich schließen, dass beim Einsatz humaner Zellen die Verteilung der Kofaktoren zwischen verschiedenen Zellpassagen variieren würde. Vergleiche zwischen den in CHO-Zellen und HeLa-Zellen durchgeführten Experimenten zeigten ebenfalls große Unterschiede in der Funktionalität des Wildtyp-Rezeptors. Dieses bestätigt, dass sich die koregulatorischen Proteine zwischen den beiden Zelllinien unterscheiden. Während kleinere Hormonkonzentrationen in CHO-Zellen bereits für die Rekrutierung der Transkriptions-initiiierenden Kofaktoren durch den AR ausreichten, wurde in HeLa-Zellen eine vergleichbare Aktivierung erst bei höheren DHT-Mengen erreicht. Das Zellmodell stellt ein stark vereinfachtes und reduziertes System dar, in dem lediglich die Wirkung des Androgenrezeptors an einem definierten Androgen-abhängigen Reportergen untersucht wird. Durch den Einsatz verschiedener Promotoren im Vergleich und

die parallele Untersuchung der N/C-terminalen Interaktion und Kofaktorinteraktion wird es möglich, die Rezeptorfunktion auf verschiedenen Ebenen zu analysieren. Ein Vergleich des Wildtyps mit den mutierten Rezeptoren gibt weitere Aufschlüsse über die veränderte Funktion. Durch den Einsatz eines breiten Hormonspektrums, von 0 nM DHT bis zu supraphysiologischen Werten von 100 nM, konnten die mutierten Rezeptoren differenziert in ihrer Abhängigkeit von DHT untersucht werden. Die Standardabweichung in den Transfektionsversuchen war tolerabel und die Ergebnisse konsistent und wiederholbar, sodass Aussagen über die Funktionalität der mutierten Rezeptoren auf Basis der gewonnenen Ergebnisse möglich sind. In Grenzen lassen sich die Ergebnisse aus dem Zellmodell auf die Rolle der mutierten Androgenrezeptoren in der Entstehung von AIS projizieren. Genotyp-Phänotyp-Korrelationen können durch die Korrelation zwischen einer gut charakterisierten Funktionalität des mutierten Rezeptors und dem Phänotyp des betroffenen Individuums ergänzt werden. Dieses ist auch im Hinblick auf medizinische Therapieansätze im Umgang mit den betroffenen Patienten wichtig.

In dieser Arbeit wurden acht Mutationen des Androgenrezeptors, die eine Bindung von Androgenen in der Ligandenbindungsgrube der LBD zulassen, analysiert. Fünf Mutationen befinden sich in der LBD, von diesen wurden zwei bei PAIS- (L712F und Q798E) und drei bei CAIS-Patienten (P723S, P904S und H917R) gefunden. Eine tabellarische Übersicht der Ergebnisse für diese Mutationen ist in Tbl. 7 dargestellt. Die restlichen drei Mutationen (Δ 409-411, S411N und S432F) liegen in der NTD des AR und sind mit PAIS assoziiert, wobei der Nachweis einer Funktionseinschränkung *in-vitro* nicht bei allen Mutationen vorlag und die Ätiologie des PAIS noch zu ergründen war.

Die PAIS-Mutation L712F war in einer Familie bei drei Brüdern und ihrem Onkel gefunden worden (Holterhus *et al.*, 2000). Auffällig war besonders die große phänotypische Varianz, die vom männlichen Phänotyp des Onkels mit Mikropenis und Gynäkomastie bis zu einem intersexuellen Genital mit Skrotum bipartum bei einem der Brüder reichte. In den durchgeführten Reporteragen-Assays am (ARE)₂-TATA-, Probasin- und MMTV-Promotor zeigte der mutierte Rezeptor bei höheren DHT-Konzentrationen (10-100 nM DHT) eine Transaktivierung von 60 - 70 % des Wildtyps. Die Ergebnisse zum (ARE)₂-TATA- und MMTV-Promotor stimmen mit vorherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe überein (Holterhus *et al.*, 2000; Holterhus *et al.*, 2005a). Am Probasin-Promotor war die Transaktivierung für den AR mit L712F noch nicht bestimmt worden. Es zeigte sich auch hier eine vorhandene Transaktivierungsfunktion, die allerdings deutlich unter der Wildtyp-Aktivität lag und insofern die Diagnose eines PAIS bestätigte. An allen verwendeten Promotoren benötigte der mutierte Rezeptor deutlich höhere DHT-Konzentrationen, um eine Reporteragen-Transkription auslösen zu können. Eine erhöhte K_d war bereits von He *et al.* (2006) de-

tektiert worden. Der durchgeführte Two-Hybrid-Assay ergab eine vollkommen aufgehobene N/C-terminale Interaktion durch die Mutation L712F, selbst bei der supraphysiologischen Konzentration von 100 nM DHT. Es ist davon auszugehen, dass der Hormon-Rezeptor-Komplex durch die fehlende N/C-Interaktion weniger stabil ist und möglicherweise mehr unspezifischen Proteinbindungen vor der DNA-Bindung ausgesetzt ist (van Royen *et al.*, 2007). Dies korreliert mit einer erhöhten Kd. Eine Diskrepanz zwischen Ergebnissen der N/C-Interaktion im Two-Hybrid-Assay und Versuchen mit dem vollständigen AR-Protein waren auch bei Need *et al.* (2009) bei Versuchen zu den Aminosäuren 501-535 aufgetaucht. Die N/C-Interaktion ist ein sehr komplexer Prozess, sodass sich die Ergebnisse des Two-Hybrid-Assays nur bedingt auf Vorgänge *in-vivo* übertragen lassen. Eine entscheidende Rolle scheint die N/C-Interaktion im Zusammenhang mit in Chromatin integrierten Genen zu spielen (Li *et al.* 2006). Hierfür spricht auch, dass die Transaktivierungsfunktion des AR mit L712F im Reporter-gen-Assay viel weniger eingeschränkt war, als es eine fehlende N/C-Interaktion zunächst vermuten lässt. Da sich die Auswirkungen der fehlenden N/C-Interaktion *in-vivo* nur erahnen lassen, wäre es im nächsten Schritt interessant zu untersuchen, inwieweit der AR mit L712F in der Lage ist, die Expression von Zielgenen zu initiieren, die in Form von Chromatin vorliegen.

Die isolierte LBD mit L712F war nicht in der Lage, zelluläre Kofaktoren zu rekrutieren und die Transkription eines Reportergens zu initiieren. Auch die Überexpression der Kofaktoren SRC1e und BAG1L konnte die Transaktivierung nicht positiv beeinflussen. Studien von Dubbink *et al.* (2006) zeigten, dass die umliegenden Aminosäuren der Kofaktorbindungsgrube einen großen Einfluss sowohl auf die Bindung von FXXLF als auch LXXLL-Motiven haben. Die Mutation L712F liegt am Rand dieser Bindungsgrube und ist von hydrophoben Seitenketten umgeben. He *et al.* (2006) vermutete durch die prominente Seitenkette des Phenylalanins bereits eine gestörte Interaktion mit FXXLF-Motiven. Normalerweise liegt das Leucin an Position 712 in unmittelbarer Nähe zum Leucin an Position 4 des FXXLF-Motivs sowie zu Aminosäuren der Helix 3, 4 und 12. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse untermauern weiter, dass die Mutation L712F die Funktion der AF2 in der Interaktion mit Kofaktoren und dem FQNLF-Motiv der NTD direkt unterbindet.

In seiner Gesamtheit wird die Funktion des ARs durch die Mutation L712F sehr viel weniger beeinträchtigt als die alleinige Funktion der AF2. Die untersuchten Kofaktoren sind in der Lage, auch über die NTD mit dem AR zu interagieren. Diese Interaktion ist durch die Mutation L712F nicht mit betroffen. Die Möglichkeit des Rezeptors, die Funktion der gestörten AF2 über andere Kofaktorbindungsstellen auszugleichen, wird auch durch die deutliche Virilisierung der betroffenen Patienten bekräftigt. Der mutierte Rezeptor benötigt zur Aktivierung und Stabilisierung des Hormon-Rezeptor-Komplexes deutlich höhere Hormonkonzentrationen als der Wildtyprezeptor. Die Konzentration von DHT und Testos-

teron während der embryonalen Entwicklung spielt daher eine wichtige modulierende Rolle im Hinblick auf die große phänotypische Varianz. Durch Hormontherapien konnte bei zwei der betroffenen Brüder eine deutliche Verstärkung der Virilisierung erreicht werden (Holterhus *et al.*, 2000).

Adachi *et al.* (2000) beschrieb einen CAIS-Patienten bei dem keine Mutation im Gen des AR gefunden werden konnte und vermutete das Fehlen eines entscheidenden Kofaktors als mögliche Ursache des AIS. Studien über das mit dem AR interagierende Kochaperon FKBP52 zeigten, dass Mäuse ohne das Gen von FKBP52 eine Störung der Geschlechtsentwicklung aufwiesen, die als Androgenresistenz gewertet werden kann (Cheung-Flynn *et al.* 2005, Hong *et al.*, 2007). Eine Vielzahl von regulatorischen Proteinen, die mit dem AR interagieren, wurde bereits beschrieben (Trapman und Dubbink, 2007). Brooke *et al.* (2008) wiesen nach, dass die LBD-Mutationen T877A und W743L die Rekrutierung von Kofaktoren im Vergleich zum Wildtyp verändern. Schwierig bleibt es bisher, die Relevanz einzelner Kofaktorbindungen nachzuweisen. Der Androgenrezeptor mit L712F ist in seiner Kofaktorinteraktion eingeschränkt. Es lässt sich vermuten, dass die Interaktion je nach Art des Kofaktors unterschiedlich stark beeinträchtigt ist. Durch Unterschiede in der Expression verschiedener Kofaktoren während der Geschlechtsentwicklung ließe sich die unterschiedliche Ausprägung der Androgenresistenz bei den betroffenen Familienmitgliedern erklären.

Das Vorliegen der Mutation L712F verändert die Funktion des AR maßgeblich. Der mutierte Rezeptor ist nicht in der Lage, eine N/C-terminale Interaktion auszubilden, und die Interaktion mit Kofaktoren über die LBD ist stark beeinträchtigt. Es bleiben weiter viele Details der Rezeptorfunktion im Unklaren, die in weiteren Funktionsanalysen eruiert werden sollten. Es besteht die Möglichkeit, dass die Ergebnisse letztendlich auch in der Behandlung betroffener Patienten umgesetzt werden können und eine differenzierte Therapie angeborener Störungen ermöglichen.

Zwischen Helix 3 und 4 der LBD liegt die CAIS-Mutation P723S. Normalerweise bilden die beiden Helices zusammen mit der Helix 12 nach der Aktivierung durch DHT die AF2. Am (ARE)₂-TATA-Promotor konnte eine Transaktivierung durch den AR mit der Mutation P723S erst bei hohen bis sehr hohen DHT-Werten (10-100 nM DHT) erreicht werden. Bei niedrigeren Hormonkonzentrationen war keine Aktivierung sichtbar. Dieses Ergebnis weist auf eine erhöhte K_d des mutierten Rezeptors hin. Bei 100 nM DHT war eine N/C-terminale Interaktion von 40 % der Wildtyp-Interaktion detektierbar. Die mutierte LBD war nicht in der Lage, durch die Rekrutierung zellulärer Kofaktoren die Transaktivierung eines Reportergens auszulösen. Durch die Überexpression der Kofaktoren SRC1e und BAG1L konnte bei physiologischen DHT-Werten ebenfalls keine Transaktivität erreicht werden.

Lediglich bei 100 nM DHT und der Überexpression von BAG1L war eine leichte Expression des Reportergens messbar. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Mutation die Ausbildung einer aktiven AF2 unter physiologischen Hormonkonzentrationen verhindert. Allerdings wurde in einem Patienten, der die Mutation P723S aufwies, die Ausbildung von Nebenhoden nachgewiesen (Hannema *et al.*, 2004). Nebenhoden bilden sich unter parakrinem Testosteroneinfluss im Zuge der embryonalen Entwicklung aus den Wolff'schen Gängen aus. Dieses lässt darauf schließen, dass in diesem Fall die embryonalen Hormonkonzentrationen für die Aktivierung des mutierten Rezeptors ausgereicht haben und dadurch die Ausbildung der Nebenhoden vermitteln konnten.

Die Ergebnisse der durchgeführten Funktionsanalysen für den AR mit P723S korrelieren gut mit dem klinischen Bild einer kompletten Androgenresistenz.

Die Mutation Q798E ist in verschiedenen Fällen von PAIS und MAIS gefunden worden. In früheren Untersuchungen war in Reportergen-Assays mit dem synthetischen Androgen Miboleron eine signifikante Reduktion der Transaktivierung nachgewiesen worden (Bevan *et al.*, 1996). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass der mutierte Rezeptor eine dem Wildtyp vergleichbare maximale Transaktivierung am (ARE)₂-TATA-Promotor aufweist. Die EC₅₀ wies mit $3,691 \times 10^{-10}$ (CI: $3,324 \times 10^{-10} - 4,099 \times 10^{-10}$) einen etwas niedrigeren Wert auf als die EC₅₀ des Wildtyps mit $1,55 \times 10^{-10}$ (CI: $1,4 \times 10^{-10} - 1,7 \times 10^{-10}$). Die N/C-terminale Interaktion war von Jääskeläinen *et al.* (2006) mit dem Ratten-AR ebenfalls in einem Mammalian-Two-Hybrid-System untersucht worden. Die Ergebnisse waren zu den hier dargestellten kongruent. Es fand sich keine Einschränkung der N/C-Interaktion durch den mutierten Rezeptor. Die isolierte LBD mit der Mutation Q798E war in der Lage, im gleichen Ausmaß wie der Wildtyp, zelluläre Kofaktoren zu rekrutieren und die Expression des Reportergens zu aktivieren. Die zusätzliche Überexpression der Kofaktoren SRC1e und BAG1L konnte ebenfalls, wie beim Wildtyp, die Transaktivität der LBD in etwa verdoppeln.

In den durchgeführten Reportergen-Assays gelang der Nachweis einer Funktionseinschränkung des AR durch die Mutation Q798E nicht. Es bleibt weiter abzuklären, inwieweit diese Mutation für die Entwicklung von PAIS und MAIS in den Patienten ursächlich ist. Das Zusammentreffen sehr niedriger Testosteronkonzentrationen während der embryonalen Entwicklung und eine geringe Expression spezifischer Kofaktoren könnte zum klinischen Bild eines PAIS führen. In den Fällen von MAIS war eine Azoospermie und Infertilität der betroffenen Patienten beschrieben worden. Dieses ließe sich ebenfalls durch unterdurchschnittliche Konzentrationen der Androgene Testosteron und DHT und eine leicht verminderte Transaktivierung des mutierten Rezeptors erklären. Das Vorliegen einer weiteren Ursache der verminderten Androgenwirkung würde die Unterschiede im

Grad des AIS zwischen den betroffenen Patienten erklären können. Unbekannte Mutationen in den Genen von Kofaktoren des AR wären denkbar. In der Veröffentlichung von Wong *et al.* (2008) wird ein vergleichbarer Fall für die PAIS-Mutation F826L beschrieben. Da die Mutation Q798E mehrfach unabhängig in Fällen von PAIS und MAIS detektiert wurde, ist von einer ursächlichen Beteiligung der Mutation Q798E an der Entstehung von AIS auszugehen.

Die Hormonbindung führt zu einer Konformationsänderung der LBD. Der gesamte C-Terminus des AR verlagert sich, und Helix 12 bedeckt die Ligandenbindungsgrube. Bei dieser Umlagerung bildet sich gleichzeitig eine Kofaktorbindungsgrube (AF2) aus (Moras und Gronemeyer, 1998). Die C-terminalen Aminosäuren sind in der Funktion des AR unabdingbar (Tahiri *et al.*, 2001). Auch beim Mineralokortikoidrezeptor sind die letzten 4 AS der LBD für die Hormonbindung und Rezeptoraktivierung entscheidend (Couette *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden Punktmutationen untersucht, die sich weit am C-Terminus des ARs befinden und möglicherweise die Funktion der AF2 stören. Die betroffenen Aminosäuren, Prolin 904, Phenylalanin 916 und Histidin 917, sind unter den Steroidhormonrezeptoren konserviert (Lanz und Rusconi, 1994).

Die Mutation P904S ist am Ende der Helix 12 lokalisiert. In der Literatur wurden zwei weitere Missense-Mutationen, P904H und P904R, an gleicher Stelle beschrieben (McPhaul *et al.*, 1992, Melo *et al.*, 2003). Diese Mutationen, sowie auch P904S, sind mit CAIS assoziiert, was die wichtige Rolle des Prolins an der Position 904 unterstreicht. In den durchgeführten Versuchen zeigte der AR mit P904S ähnliche Ergebnisse wie der AR mit P723S. Am (ARE)₂-TATA-Promotor initiierte der mutierte Rezeptor erst bei 10-100 nM DHT eine Transaktivierung des Reportergens. Aus den Messdaten konnte keine EC₅₀ berechnet werden, da bei den eingesetzten DHT-Konzentrationen keine Sättigung des Modells erreicht wurde. Der vermutete Wert liegt etwas unter dem geschätzten Wert des AR mit P723S.

Die Mutation P904S wirkte sich auch auf die N/C-terminale Interaktion aus. Bei 100 nM DHT war diese auf 50 % der Wildtyp-Interaktion reduziert. Die isolierte LBD des mutierten Rezeptors konnte zelluläre Kofaktoren nicht in ausreichendem Maße rekrutieren, um die Expression eines Reportergens anzuschalten. Die zusätzliche Überexpression des Kofaktors BAG1L hatte keinen transkriptionsaktivierenden Effekt. Die Überexpression von SRC1e konnte hingegen bei 100 nM DHT eine sichtbare Expression des Reportergens von 20 % der Wildtyp-Aktivität mit Kofaktor auslösen. Diese Ergebnisse sprechen für eine gestörte Funktion der AF2 durch die vorliegende Mutation. Nur bei supraphysiologischen Hormonkonzentrationen *in-vitro* konnte der mutierte Rezeptor in dem Maße aktiviert und

stabilisiert werden, dass eine geringe Rezeptorfunktion nachweisbar war. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit dem assoziierten klinischen Bild eines CAIS.

Im C-terminalen Ende des AR, hinter Helix 12, befindet sich die Mutation H917R. Diese Mutation wurde in einem Fall von CAIS detektiert (Ahmed *et al.*, 2000). In den vorliegenden Versuchen zeigte der mutierte Rezeptor ausnahmslos eine gute – aber im Vergleich zum Wildtyp verzögerte – Antwort auf DHT. Am (ARE)₂-TATA-Promotor lag die EC₅₀ eine Zehnerpotenz über der des Wildtyps. Bei 100 nM erreichte der mutierte Rezeptor 80 - 90 % der Wildtyp-Aktivität. Tahiri *et al.* (2001) führten Studien zum C-Terminus des AR durch. Dabei zeigte der AR mit einer positionsgleichen Mutation (H917A) am MMTV-Promotor ebenfalls eine zehnfach erhöhte EC₅₀ und im Bindungsassay eine erhöhte K_d (1 nM statt 0,5 nM beim WT). Die Mutation H917A wurde bisher nicht in Fällen von AIS beschrieben und war zur Analyse des C-Terminus konstruiert worden. Da die Ergebnisse zur Transaktivität zwischen H917A und H917R ähnlich sind, ist anzunehmen, dass die K_d des AR mit H917R ebenfalls erhöht ist.

Die N/C-terminale Interaktion des Rezeptors mit H917R wurde durch steigende DHT-Konzentrationen zunehmend stabilisiert, und bei 100 nM DHT lag sie bei 90 % der Wildtyp-Interaktion. Dies korreliert ebenfalls gut mit einer erhöhten K_d und lässt vermuten, dass eine direkte Auswirkung auf die N/C-terminale Interaktion durch die H917R nicht vorliegt. Die isolierte LBD zeigte eine deutlich verminderte transaktivierende Aktivität, die bei 50 % des Wildtyps lag und durch die Überexpression der Kofaktoren BAG1L und SRC1e jeweils noch verdoppelt werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass die AF2 des Rezeptors durch die Mutation beeinträchtigt ist. Vor allem bei höheren Hormonkonzentrationen wird der Rezeptor jedoch zunehmend stabilisiert und zeigt *in-vitro* eine deutliche Restfunktion. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten CAIS-Mutationen und auch zur Mutation L712F ist die Funktion der AF2 relativ gut erhalten. Diese Ergebnisse stehen in gewissem Widerspruch zum klinischen Bild eines CAIS.

Estebanez-Perpina *et al.* beschrieben eine bisher unbekannte Kofaktorbindungsstelle, genannt binding function 3 (BF-3), die regulatorisch in die Funktion der AF2 eingreift. BF-3 besteht aus den Aminosäuren E829, N833, F683 und Y834 und liegt in Nachbarschaft zur AF2 auf der Oberfläche der LBD. Mutationen in dieser Region sind mit AIS sowie Prostatakarzinomen assoziiert (Estebanez-Perpina *et al.*, 2007). Es ist durchaus möglich, dass weitere Proteinstrukturen der LBD ebenfalls wichtige regulatorische Funktionen innehaben. Möglicherweise wirkt sich die Mutation H917R weniger auf die AF2, aber dafür auf bisher unbekannte Kofaktor-Interaktionsstellen des AR aus, deren Funktion in den bisher durchgeführten Reporter-Gen-Assays nicht untersucht wurde.

Eine andere Erklärung für die Entstehung eines CAIS-Phänotyps wäre die selektive Interaktionsstörung mit speziellen Kofaktoren, die in der Zeit der embryonalen Geschlechts-

entwicklung eine große Rolle spielen. Auch möglich wäre das Zusammentreffen der Mutation H917R mit einer zusätzlichen Mutation in Kofaktorgenen. Ausgehend von den Ergebnissen der durchgeführten Versuche ist es denkbar, dass die Mutation in einem anderen Fall zum klinischen Bild eines PAIS führen kann. Auch eine stärkere Virilisierung in der Pubertät durch den Anstieg von Testosteron ist vorstellbar. Die durchgeführten Funktionsanalysen konnten das Bild eines CAIS bei Vorliegen der Mutation H917R nicht vollständig erklären und zeigen die Grenzen der verwendeten Methoden auf.

Mutation	L712F	P723S	Q798E	P904S	H917R	F916X
Klinischer Grad des AIS	PAIS	CAIS	PAIS	CAIS	CAIS	/
Transaktivierung am (ARE) ₂ -TATA-Promotor (1 nM DHT)	↓ ↓	↓ ↓ ↓	=	↓ ↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓ ↓
Transaktivierung am (ARE) ₂ -TATA-Promotor (100 nM DHT)	↓	↓	=	↓	↓	↓ ↓ ↓
N/C-Interaktion (1 nM DHT)	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	=	↓ ↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓ ↓
N/C-Interaktion (100 nM DHT)	↓ ↓ ↓	↓	=	↓	=	↓ ↓ ↓
Kofaktorinteraktion der isolierten LBD (1 nM DHT)	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	=	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓
Kofaktorinteraktion der isolierten LBD (100 nM DHT)	↓ ↓ ↓	↓ ↓ (↓)	=	↓ ↓ (↓)	↓	↓ ↓ ↓

Tbl. 7 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der LBD-Mutationen

=	Funktion wie der WT Rezeptor
↓	verminderte Funktion im Vergleich zum WT Rezeptor
↓ ↓	stärker verminderte Funktion im Vergleich zum WT Rezeptor
↓ ↓ (↓)	Kaum Funktion sichtbar
↓ ↓ ↓	keine nachweisbare Funktion

Legende zu Tbl. 7

In der NTD sind vor allem Stoppkodon-Mutationen bekannt, die den Abbruch der Aminosäurekette bei der AR-Synthese bewirken und zu CAIS führen. Auch MAIS und PAIS Mutationen sind beschrieben worden (Wang *et al.*, 1998; Ferlin *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden die Missense-Mutationen S411N, S432F und die 9 Basenpaardele-

tion $\Delta 409-411$ untersucht, die mit PAIS assoziiert sind (Holterhus *et al.*, 2005b). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die N/C-terminale Interaktion der mutierten NTDs im Two-Hybrid-Assay untersucht. Dabei konnte bei allen Mutationen eine signifikant reduzierte N/C-Interaktion von 80 - 90 % der Wildtyp-Interaktion detektiert werden (siehe Tbl. 6). Die Mutationen scheinen die variable NTD in ihrer Konformation leicht zu verändern und somit auf die Interaktion zwischen N- und C-Terminus modulierend einzuwirken. Das $^{23}\text{FQNLF}^{27}$ -Motiv, das direkt mit der AF2 der LBD interagiert, befindet sich ganz am NH_2 -Terminus des Rezeptors und liegt somit nicht in direkter räumlicher Nähe zu den Mutationen. Ein zweites ähnliches Motiv, $^{433}\text{WHTLF}^{437}$, befindet sich in der Tau-5 der NTD, direkt neben den drei untersuchten Mutationen. He *et al.* (2000) beschrieben, dass die Ausbildung der N/C-Interaktion auch über das WHTLF-Motiv möglich ist, allerdings sehr viel schwächer ausgeprägt als über das FQNLF-Motiv. Um den starken Effekt von FQNLF auf die N/C-Interaktion auszuschalten, wurde in den pAD-NTD-Vektoren FQNLF zu FQNAA verändert und erneut die N/C-Interaktion im Two-Hybrid-Assay untersucht. Es gelang nicht, einen Unterschied zwischen Wildtyp-NTD mit FQNAA-Motiv und mutierten NTDs mit FQNAA-Motiv festzustellen. Das WHTLF-Motiv scheint für die N/C-Interaktion nicht die vorher vermutete Rolle zu spielen. Neuere Studien zeigten, dass die Tau-5 mit dem WHTLF-Motiv eine Androgen-unabhängige transaktivierende Domäne ist, die bei der Entstehung des Hormon-insensitiven Prostata-Karzinoms eine Rolle spielen könnte (Dehm *et al.*, 2007). Das verwendete Modell untersucht die Auswirkungen der Mutationen nur im Hinblick auf die N/C-Interaktion und kann andere möglicherweise veränderte Funktionen des WHTLF-Motivs somit nicht detektieren.

In vorhergehenden Studien wurde die Transaktivität der drei N-terminalen Mutationen bereits am $(\text{ARE})_2$ -TATA-Promotor im Vergleich zum Wildtyp untersucht (Holterhus *et al.*, 2005b). Dabei konnte nur für die Mutation S432F eine Funktionseinschränkung des Rezeptors *in-vitro* nachgewiesen werden. Der Pem-Promotor wurde von Zuccarello *et al.* (2008) als sehr sensitiv für die Funktionsanalyse von PAIS-Mutationen beschrieben. Aus diesem Grund wurde er im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die Transaktivierungsfunktion des AR mit den N-terminalen Mutationen zu untersuchen. Im Vergleich zum Wildtyp ergab sich jedoch bei keiner der drei Mutationen eine verminderte Funktion des Rezeptors. Dieses zeigt, dass der $(\text{ARE})_2$ -TATA-Promotor ein sensitiver Promotor für die Funktionsanalyse von PAIS und CAIS-Mutationen ist, im Fall der Mutation S432F sensitiver als der Pem-Promotor, und sich auch weiterhin für die Funktionsanalyse mutierter ARs eignet.

Eine eingeschränkte Rezeptorfunktion konnte für die Mutationen S411N und $\Delta 409-411$, bis auf eine leicht verminderte N/C-terminale Interaktion, nicht nachgewiesen werden. Die Mutationen scheinen die Integrität der NTD nachweislich zu verändern. Es kann jedoch

nicht sicher davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Mutationen wirklich ursächlich für die Entstehung des PAIS bei den Patienten ist. Wiederum sind zusätzliche Mutationen in den Genen entscheidender Kofaktoren der Genitalentwicklung denkbar. Da die NTD eine variable Domäne ist, die in Abhängigkeit von interagierenden Proteinen ihre Konformation ständig verändert, ist es gut vorstellbar, dass die beschriebenen Mutationen einen eher unterschweligen Einfluss auf die Rezeptorfunktion ausüben, die in Kombination mit niedrigen Androgen- oder niedrigen Kofaktorspiegeln ein PAIS erklären können.

Verschiedene Androgen-abhängige Promotoren wurden eingesetzt, um zu untersuchen, ob Mutationen die Transaktivierung eines Reportergens differenziert beeinflussen können. Hierzu wurden Reportergen-Assays des AR mit den Einzelmutationen L712F und ²³FQNAA²⁷, sowie der Doppelmutation L712F und ²³FQNAA²⁷ am Probasin-, (ARE)₂-TATA- und MMTV-Promotor durchgeführt. Während der AR mit L712F in allen Assays ca. 60 % der Wildtyp-Aktivität erreichte, schwankten die Ergebnisse für den AR mit ²³FQNAA²⁷. Am MMTV-Promotor glich die Transaktivierung durch die ²³FQNAA²⁷-Variante des AR jener der Mutante L712F. Am (ARE)₂-TATA- und Probasin-Promotor lag sie mit 20 % bzw. 40 % deutlich darunter. He *et al.* (2002a) untersuchten Promotoren in Reportergen-Assays im Hinblick auf ihre Abhängigkeit von der N/C-terminalen Interaktion des AR. Hierzu verwendeten sie ebenfalls den AR mit ²³FQNAA²⁷. Aus den Ergebnissen schlossen sie, dass der PSA- und Probasin-Promotor von der N/C-terminalen Interaktion abhängig sind, der MMTV- und sex-limited-protein-Promotor nicht. Auch die Veröffentlichung von Tadokoro *et al.* (2008) geht von der Einteilung in N/C-Interaktion-abhängige und N/C-Interaktion-unabhängige Promotoren aus. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse stehen dazu im Widerspruch. Die Mutation L712F unterbindet die N/C-Interaktion komplett. Der AR mit L712F führt trotzdem am Probasin-Promotor und MMTV-Promotor zu einer vergleichbaren Genexpression. Die N/C-Interaktion scheint somit für eine Aktivierung dieser Promotoren keine modulierende Rolle zu spielen. Die Abweichungen der Rezeptorfunktion in Abhängigkeit vom Promotor, die bei den Ergebnissen der Mutation ²³FQNAA²⁷ auffallen, wurden möglicherweise durch die Interaktion mit bestimmten Promotor-spezifischen Kofaktoren ausgelöst.

Während der MMTV-Promotor gut zu aktivieren war, sind der (ARE)₂-TATA- und Probasin-Promotor auf das ²³FQNAA²⁷-Motiv verstärkt angewiesen, allerdings nicht im Hinblick auf die N/C-terminale Interaktion. Die Doppelmutante erreichte am (ARE)₂-TATA- und am Probasin-Promotor die gleiche Transaktivierung wie der AR mit ²³FQNAA²⁷. Am MMTV-Promotor führte die Kombination der beiden Mutationen zu einer zusätzlichen Reduktion der Transaktivität von 60 % der Wildtyp-Aktivität bei den Einzelmutanten auf 40 % für die Doppelmutante. Dieses zeigt, dass der MMTV-Promotor weniger sensitiv auf eine Verän-

derung des ²³FQNAA²⁷-Motivs reagiert als der Probasin- und (ARE)₂-TATA-Promotor. Erst die Kombination mit einer weiteren Mutation inhibierte die Rekrutierung zellulärer Kofaktoren. Auch der Wildtyp-Rezeptor konnte die Expression eines Reportergens an bestimmten Promotoren bei geringeren Hormonkonzentrationen initiieren als an anderen. Dieses zeigen die je nach Promotor und Zelllinie variierenden EC₅₀-Werte (Abb. 20 E). Strukturelle Unterschiede der Promotorregionen und der dadurch unterschiedliche Bedarf an regulatorischen Proteinen scheinen hierfür maßgeblich verantwortlich zu sein. Dieses wird durch die detektierten Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Zelllinien, die ein abweichendes Ensemble von Kofaktoren aufweisen dürften, weiter bestärkt.

Die Verwendung verschiedener Promotoren in der Funktionsanalyse von Mutationen des AR ist sinnvoll, da der AR auch im menschlichen Organismus eine Vielzahl unterschiedlicher Zielgene mit verschiedenen Promotoren reguliert. So konnte gezeigt werden, dass der Kofaktor SRC3, der auch zu den p160-Koaktivatoren gehört, essenziell für die durch den AR vermittelte Induktion des PSA-, TMPRSS2- und PMEPA1-Gens war, während das Fehlen des Steroid-Rezeptor-RNA-Aktivator nur die Induktion des TMPRSS2-Gens störte (Agoulnik *et al.*, 2009). Durch die Verwendung verschiedener Zelllinien kann möglicherweise auf die Auswirkungen der je nach Gewebe variierenden zellulären Kofaktoren geschlossen werden. Einige Mutationen sind erst in einem bestimmten Kontext auffällig, daher ist die Kombination unterschiedlicher Assays wichtig, um die veränderte Funktion eines mutierten AR verstehen zu können. Die Ergebnisse der AR-Variante ²³FQNAA²⁷ zeigten, dass erhebliche Unterschiede der Transaktivierungsfunktion an verschiedenen Promotoren *in-vitro* nachweisbar sind. Die natürliche Mutation L712F hatte einen relativ gleichmäßigen Effekt auf die Transaktivierungsfunktion an den verwendeten Promotoren.

Im Rahmen dieser Arbeit ist eine Charakterisierung der acht untersuchten Mutationen des Androgenrezeptors in den analysierten funktionellen Bereichen gelungen. Dabei zeigte sich, dass die Mutationen die Funktion des AR differenziert beeinflussen und die detektierten Unterschiede zwischen PAIS- und CAIS-Mutationen fließend sind. Der Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf die Funktion des AR *in-vivo* ist bei den verwendeten Verfahren Grenzen gesetzt. Für die N-terminalen Mutationen konnte nur der Ansatz einer Funktionseinschränkung des AR detektiert werden. Bei der Mutation Q798E gelang der Nachweis nicht. Weiterführende funktionelle Untersuchungen und die Analyse von Kofaktorwirkungen könnten hier Klarheit bringen.

Im Hinblick auf den einzelnen Patienten sind eine fundierte klinische Diagnostik und funktionelle Studien nötig, um Therapieentscheidungen und prognostische Einschätzungen machen zu können. Durch internationale Datenbanken und die Zunahme an gut charakterisierten Mutationen verbessert sich die Möglichkeit, auch bei neuen, bisher unbekanntem

Mutationen durch ihre Lage im AR-Protein und die Kenntnis der betroffenen Aminosäuren Parallelen zu schon bekannten und untersuchten Mutationen zu ziehen. Dieses Wissen könnte für die Geschlechtszuweisung bei einem Kind mit intersexuellem Genital hilfreich sein. Der immer wieder aufgetretenen Frage nach dem Einfluss von Kofaktoren des AR auf AIS-Phänotypen sollte ebenfalls weiter nachgegangen werden. Untersuchungen im Tiermodell ermöglichen das Auffinden von Kofaktoren der Embryonalentwicklung, die möglicherweise nur innerhalb eines kurzen Zeitfensters exprimiert werden. Das Verständnis der Pathogenese ist ein wichtiger Schritt, der in der Zukunft Hinweise auf Therapieansätze im schwierigen Feld angeborener Störungen geben könnte.

V Zusammenfassung

Die Androgenresistenz (AIS) gehört zu den Störungen der Geschlechtsentwicklung. Pathogenetisch führt die eingeschränkte bis aufgehobene Funktion des Androgenrezeptors während der Embryonalentwicklung bei einem 46,XY Karyotyp zu einer verminderten bis fehlenden Virilisierung. In den meisten Fällen liegt eine Mutation im Gen des Androgenrezeptors vor. Bei der kompletten Androgenresistenz (CAIS) werden die Kinder mit einem weiblich ausgebildeten Genital geboren. Die partielle Androgenresistenz (PAIS), bei der der Androgenrezeptor eine Restfunktion aufweist, führt zu einem breiten phänotypischen Spektrum, das von einem fast vollständig weiblichen Äußeren, über die Ausbildung intersexueller Genitalien, bis hin zu einem fast vollständig männlichen Phänotyp reicht.

In dieser Arbeit sollten acht beschriebene Mutationen des Androgenrezeptors im Hinblick auf ihre Funktionalität charakterisiert werden. In Transfektionsversuchen wurde die Rezeptortransaktivität an verschiedenen Androgen-abhängigen Promotoren, die N/C-terminale Interaktion des Androgenrezeptors und die Interaktion der isolierten Liganden-Bindungsdomäne (LBD) mit zwei bekannten Kofaktoren, SRC1e und BAG1L, untersucht. Zur Rezeptoraktivierung wurde Dihydrotestosteron in aufsteigender Konzentration verwendet. Fünf der Mutationen befinden sich in der LBD des Rezeptors. Die Mutationen L712F und Q789E waren bei PAIS-Patienten gefunden worden. Die Mutationen P723S, P904S und H917R sind mit CAIS assoziiert. Die PAIS-Mutationen Δ 409-411, S411N und S432F befinden sich in der N-terminalen Domäne (NTD) des Androgenrezeptors.

In den durchgeführten Versuchen zeigten sich große Unterschiede im Verhalten der verschiedenen AR-Mutanten. Die N-terminalen Mutationen reduzierten die Transaktivität des AR am Pem-Promotor nicht. Die N/C-terminale Interaktion beeinflussten sie signifikant, wodurch ein Hinweis auf einen modulierenden Einfluss auf die NTD gegeben ist. Bei der Mutation Q798E blieb die Ätiologie des AIS nach wie vor ungeklärt. Der AR mit L712F zeichnete sich durch eine fehlende N/C-Interaktion und gestörte Kofaktorbindungsgrube aus. Die CAIS-Mutationen P723S und P904S ließen erst bei sehr hohen DHT-Konzentrationen eine Aktivierung des Rezeptors zu. Der AR mit H917R zeigte eine unerwartet hohe Rezeptoraktivität.

In dieser Arbeit gelang es, die Mutationen differenziert funktionell darzustellen. Eine eindeutige Zuweisung der Mutationen in CAIS und PAIS kann anhand der Ergebnisse nicht erfolgen. *In-vivo* wirken viele Faktoren modulierend auf den Rezeptordefekt, so lässt sich vermuten, dass dieselbe Mutation sowohl eine partielle als auch eine komplette Androgenresistenz verursachen könnte. Im Hinblick auf den einzelnen Patienten sind auch in Zukunft eine fundierte klinische Diagnostik und funktionelle Studien nötig, um Therapieentscheidungen und prognostische Einschätzungen machen zu können.

VI Literaturverzeichnis

- Adachi M, Takayanagi R, Tomura A, Imasaki K, Kato S, Goto K, Yanase T, Ikuyama S, Nawata H: Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N Engl J Med* 343, 856-862 (2000)
- Agoulnik IU, Weigel NL: Coactivator selective regulation of androgen receptor activity. *Steroids* 74, 669-674 (2009)
- Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, Hawkins JR, Martin H, Rowland J, Shimura N, Tait AD, Hughes IA: Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 658-665 (2000)
- Askew EB, Gampe RT Jr, Stanley TB, Wilson EM: Modulation of androgen receptor activation function 2 by testosterone and dihydrotestosterone. *J Biol Chem* 282, 25801-25816 (2007)
- Bai S, He B, Wilson EM: Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction. *Mol Cell Biol* 25, 1238-1257 (2005)
- Barbulescu K, Geserick C, Schüttke I, Schleuning WD, Haendler B: New androgen response elements in the murine *pem* promoter mediate selective transactivation. *Mol Endocrinol* 15, 1803-1816 (2001)
- Batch JA, Williams DM, Davies HR, Brown BD, Evans BA, Hughes IA, Patterson MN: Androgen receptor gene mutations identified by SSCP in fourteen subjects with androgen insensitivity syndrome. *Hum Mol Genet* 1, 497-503 (1992)
- Bebermeier JH, Brooks JD, DePrimo SE, Werner R, Deppe U, Demeter J, Hiort O, Holterhus PM: Cell-line and tissue-specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription. *J Mol Med* 84, 919-931 (2006)
- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M: Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448-450 (1990)
- Bevan CL, Brown BB, Davies HR, Evans BA, Hughes IA, Patterson MN: Functional analysis of six androgen receptor mutations identified in patients with partial androgen insensitivity syndrome. *Hum Mol Genet* 5, 265-273 (1996)
- Bevan CL, Ho(ARE) S, Claessens F, Heery DM, Parker MG: The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol Cell Biol* 19, 8383-8392 (1999)
- Brinkmann AO, Faber PW, van Rooij HC, Kuiper GG, Ris C, Klaassen P, van der Korput JA, Voorhorst MM, van Laar JH, Mulder E, *et al.*: The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem* 34, 307-310 (1989)
- Brinkmann AO: Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 179, 105-109 (2001)
- Brodie J, Mc Ewan IJ: Intra-domain communication between the N-terminal and DNA-binding domains of the androgen receptor: modulation of androgen response element DNA binding. *J Mol Endocrinol* 34, 603-615 (2005)
- Brooke GN, Parker MG, Bevan CL: Mechanisms of androgen receptor activation in advanced prostate cancer: differential co-activator recruitment and gene expression. *Oncogene* 27, 2941-2950 (2008)
- Burd CJ, Petre CE, Moghadam H, Wilson EM, Knudsen KE: Cyclin D1 binding to the androgen receptor (AR) NH2-terminal domain inhibits activation function 2 association and reveals dual roles für AR corepression. *Mol Endocrinol* 19, 607-620 (2005)

- Callewaert L, Van Tilborgh N, Claessens F: Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor. *Cancer Res* 66, 543-553 (2006)
- Callewaert L, Verrijdt G, Christiaens V, Haelens A, Claessens F: Dual function of an amino-terminal amphipatic helix in androgen receptor-mediated transactivation through specific and nonspecific response elements. *J Biol Chem* 278, 8212-8218 (2003)
- Castagnaro M, Yandell DW, Dockhorn-Dworniczak B, Wolfe HJ, Poremba C: Androgen receptor gene mutations and p53 gene analysis in advanced prostate cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 77, 119-123 (1993)
- Centenera MM, Harris JM, Tilley WD, Butler LM: The contribution of different androgen receptor domains to receptor dimerization and signalling. *Mol Endocrinol* 22, 2373-2382 (2008)
- Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Cox MB, Riggs DL, Suarez-Quian C, Smith DF: Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signalling. *Mol Endocrinol* 19, 1654-1666 (2005)
- Choong CS, Quigley CA, French FS, Wilson EM: A novel missense mutation in the amino-terminal domain of the human androgen receptor gene in a family with partial androgen insensitivity syndrome causes reduced efficiency of protein translation. *J Clin Invest* 98, 1423-1431 (1996)
- Christiaens V, Bevan CL, Callewaert L, Haelens A, Verrijdt G, Rombauts W, Claessens F: Characterization of the two coactivator-interacting surfaces of the androgen receptor and their relative role in transcriptional control. *J Biol Chem* 277, 49230-49237 (2002)
- Claessens F, Denayer S, Van Tilborgh N, Kerkhofs S, Helsen C, Haelens A: Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal* 6: e008 (2008)
- Couette B, Jalaguier S, Hellal-Levy C, Lupo B, Fagart J, Auzou G, Rafestin-Oblin ME: Folding requirements of the ligand-binding domain of the human mineralocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 12, 855-863 (1998)
- Cutress ML, Whitaker HC, Mills IG, Stewart M, Neal DE: Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J Cell Sci.* 121, 957-968 (2008)
- Cutress RI, Townsend PA, Sharp A, Maison A, Wood L, Lee R, Brimmell M, Mullee MA, Johnson PW, Royle GT, Bateman AC, Packham G: The nuclear BAG-1 isoform, BAG-1L, enhances oestrogen-dependent transcription. *Oncogene* 22, 4973-4982 (2003)
- Deeb A, Jääskeläinen J, Dattani M, Whitaker HC, Costigan C, Hughes IA: A novel mutation in the human androgen receptor suggests a regulatory role for the hinge region in amino-terminal and carboxy-terminal interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 3691-3696 (2008)
- Dehm SM, Regan KM, Schmidt LJ, Tindall DJ: Selective role of an NH₂-terminal WxxLF motif for aberrant androgen receptor activation in androgen depletion independent prostate cancer cells. *Cancer Res* 67, 10067-10077 (2007)
- Dehm SM, Tindall DJ: Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol* 21, 2855-2863 (2007)
- Denolet E, Gendt KD, Swinnen JV, Verrijdt G, Deboel L, Roskams T, Verhoeven G: Transfection with steroid-responsive reporter constructs shows glucocorticoid rather than androgen responsiveness in cultured Sertoli cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 98, 164-173 (2006)
- Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ: Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol* 88, 15-22 (1992)

- Dubbink HJ, Hersmus R, Pike AC, Molier M, Brinkmann AO, Jenster G, Trapman J: Androgen receptor ligand-binding domain interaction and nuclear receptor specificity of FXXLF and LXXLL motifs as determined by L/F swapping. *Mol Endocrinol* 20, 1742-1755 (2006)
- Dubbink HJ, Hersmus R, Verma CS, van der Korput HA, Berrevoets CA, van Tol J, Ziel-van der Made AC, Brinkmann AO, Pike AC, Trapman J: Distinct recognition modes of FXXLF and LXXLL motifs by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 18, 2132-2150 (2004)
- Estébanez-Perpiñá E, Arnold LA, Nguyen P, Rodrigues ED, Mar E, Bateman R, Pallai P, Shokat KM, Baxter JD, Guy RK, Webb P, Fletterick RJ: A surface on the androgen receptor that allosterically regulates cofactor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 16074-16079 (2007)
- Evans BA, Harper ME, Daniells CE, Watts CE, Matenhelia S, Green J, Griffiths K: Low incidence of androgen receptor gene mutations in human prostatic tumors using single strand conformation polymorphism analysis. *Prostate* 28, 162-171 (1996)
- Farla P, Hersmus R, Geverts B, Mari PO, Nigg AL, Dubbink HJ, Trapman J, Houtsmuller AB: The androgen receptor ligand-binding domain stabilizes DNA binding in living cells. *J Struct Biol* 147, 50-61 (2004)
- Ferlin A, Vinanzi C, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Cazzadore C, Foresta C: Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65, 606-610 (2006)
- Froesch BA, Takayama S, Reed JC: BAG-1L protein enhances androgen receptor function. *J Biol Chem* 273, 11660-11666 (1998)
- Galani A, Kitsiou-Tzeli S, Sofokleous C, Kanavakis E, Kalpini-Mavrou A: Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. *Hormones (Athens)* 7, 217-229 (2008)
- Gehring U: Activities of the cochaperones Hsp46/BAG-1M and Hsp50/BAG-1L and isoforms. *Cell Stress Chaperones* 11, 295-303 (2006)
- Geserick C, Meyer HA, Barbulescu K, Haendler B: Differential modulation of androgen receptor action by deoxyribonucleic acid response elements. *Mol Endocrinol* 17, 1738-1750 (2003)
- Ghali SA, Gottlieb B, Lumbroso R, Beitel LK, Elhaji Y, Wu J, Pinsky L, Trifiro MA: 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* 88, 2185-2193 (2003)
- Gobinet J, Poujol N, Sultan Ch: Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 198, 12-24 (2002)
- Gottlieb B, Beitel L, Trifiro MA: Androgen insensitivity syndrome. www.geneclinics.org (2007)
- Gottlieb B, Beitel LK, Wu JH, Trifiro M: The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat* 23, 527-533 (2004)
- Greer LF 3rd, Szalay AA: Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* 17, 43-74 Review (2002)
- Groskreutz D, Schenborn ET: Reporter Systems. *Methods Mol Biol* 63, 11-30 (1997)
- Haelens A, Tanner T, Denayer S, Callewaert L, Claessens F: The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res* 67, 4514-4523 (2007)
- Hannema SE, Hughes IA: Regulation of Wolffian duct development. *Horm Res* 67, 142-151 (2007)

- Hannema SE, Scott IS, Hodapp J, Martin H, Coleman N, Schwabe JW, Hughes IA: Residual activity of mutant androgen receptors explains wolffian duct development in the complete androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5815-5822 (2004)
- 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* 24, 466-487 (2003)
- He B, Bowen NT, Minges JT, Wilson EM: Androgen-induced NH₂- and COOH-terminal Interaction inhibits p160 coactivator recruitment by activation function 2. *J Biol Chem* 276, 42293-42301 (2001)
- He B, Gampe RT Jr, Hnat AT, Faggart JL, Minges JT, French FS, Wilson EM: Probing the functional link between androgen receptor coactivator and ligand-binding sites in prostate cancer and androgen insensitivity. *J Biol Chem* 281, 6648-6663 (2006)
- He B, Kempainen JA, Wilson EM: FXXLF and WXXLF Sequences mediate the NH₂-terminal Interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J Biol Chem* 275, 22986-22994 (2000)
- He B, Lee LW, Minges JT, Wilson EM: Dependence of selective gene activation on the androgen receptor NH₂- and COOH-terminal interaction. *J Biol Chem* 277, 25631-25639 (2002a)
- He B, Minges JT, Lee LW, Wilson EM: The FXXLF motif mediates androgen receptor-specific interactions with coregulators. *J Biol Chem* 277, 10226-10235 (2002b)
- He B, Wilson EM: Electrostatic modulation in steroid receptor recruitment of LXXLL and FXXLF motifs. *Mol Cell Biol* 23, 2135-2150. (2003)
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG: A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736 (1997)
- Hiort O, Holterhus PM, Horter T, Schulze W, Kremke B, Bals-Pratsch M, Sinnecker GH, Kruse K: Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2810-2815 (2000a)
- Hiort O, Holterhus PM: The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol* 142, 101-110 (2000b)
- Hiort O, Sinnecker GH, Holterhus PM, Nitsche EM, Kruse K: Inherited and de novo androgen receptor gene mutations: investigation of single-case families. *J Pediatr* 132, 939-943 (1998)
- Hiort O: Androgens and Puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16, 31-41 (2002)
- Holterhus PM, Brüggewirth HT, Hiort O, Kleinkauf-Houcken A, Kruse K, Sinnecker GH, Brinkmann AO: Mosaicism due to a somatic mutation of the androgen receptor gene determines phenotype in androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3584-3549 (1997)
- 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* 63, 152-158 (2005a)
- 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* 85, 3245-3250 (2000)

- 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* 113, 457-463 (2005b)
- Hong J, Kim ST, Tranguch S, Smith DF, Dey SK: Deficiency of co-chaperone immunophilin FKBP52 compromises sperm fertilizing capacity. *Reproduction* 133, 395-403 (2007)
- Houk CP, Lee PA: Consensus statement on terminology and management: disorders of sex development. *Sex Dev* 2, 172-180 (2008)
- Hsu CL, Chen YL, Yeh S, Ting HJ, Hu YC, Lin H, Wang X, Chang C: The use of phage display technique for the isolation of androgen receptor interacting peptides with (F/W)XXL(F/W) and FXXLY new signature motifs. *J Biol Chem* 278, 23691-23698 (2003)
- Hur E, Pfaff SJ, Payne ES, Grøn H, Buehrer BM, Fletterick RJ: Recognition and accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface. *PLoS Biol* 2, E274 (2004)
- Hurme T, Lahdes-Vasama T, Makela E, Iber T, Toppari J: Clinical findings in prepubertal girls with inguinal hernia with special reference to the diagnosis of androgen insensitivity syndrome. *Scand J Urol Nephrol* 43, 42-46 (2009)
- Inoue H, Nojima H, Okayama H: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28 (1990)
- Jääskeläinen J, Deeb A, Schwabe JW, Mongan NP, Martin H, Hughes IA: Human androgen receptor gene ligand-binding-domain mutations leading to disrupted interaction between the N- and C-terminal domains. *J Mol Endocrinol* 36, 361-368 (2006)
- Jenster G, Spencer TE, Burcin MM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: Steroid receptor induction of gene transcription: a two-step model. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 94, 7879-7884 (1997)
- Jenster G, van der Korput HA, Trapman J, Brinkmann AO: Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the androgen receptor. *J Biol Chem* 270, 7341-7346 (1995)
- Kalkhoven E, Valentine JE, Heery DM, Parker MG: Isoforms of steroid receptor coactivator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *EMBO J* 17, 232-243 (1998)
- Kanai Y, Hiramatsu R, Matoba S, Kidokoro T: From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation. *J Biochem* 138, 13-19 (2005)
- Kang HY, Yeh S, Fujimoto N, Chang C: Cloning and characterization of human prostate coactivator AR54, a novel protein that associates with androgen receptor. *J Biol Chem* 274, 8570-8576 (1999)
- Kawate H, Wu Y, Ohnaka K, Tao RH, Nakamura K, Okabe T, Yanase T, Nawata H, Takayanagi R: Impaired nuclear translocation, nuclear matrix targeting, and intranuclear mobility of mutant androgen receptors carrying amino acid substitutions in the deoxyribonucleic acid-binding domain derived from androgen insensitivity syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6162-6169 (2005)
- Klokk TI, Kurys P, Elbi C, Nagaich AK, Hendarwanto A, Slagsvold T, Chang CY, Hager GL, Saatcioglu F: Ligand-specific dynamics of the androgen receptor at its response element in living cells. *Mol Cell Biol* 27, 1823-1843 (2007)
- Köhler B, Lumbroso S, Leger J, Audran F, Grau ES, Kurtz F, Pinto G, Salerno M, Semitcheva T, Czernichow P, Sultan C: Androgen insensitivity syndrome: somatic mosaicism of the androgen receptor in seven families and consequences for sex assignment and genetic counseling. *J Clin*

- Endocrinol Metab 90, 106-111 (2005)
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
- Lahn BT, Page DC: Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278m, 675-680 (1997)
- Langley E, Kempainen JA, Wilson EM: Intermolecular NH₂-/carboxyl-terminal interactions in androgen receptor dimerization revealed by mutations that cause androgen insensitivity. *J Biol Chem* 273, 92-101 (1998)
- Lanz RB, Rusconi S: A conserved carboxy-terminal subdomain is important for ligand interpretation and transactivation by nuclear receptors. *Endocrinology* 135, 2183-2195 (1994)
- Lee HJ, Chang C: Recent advances in androgen receptor action. *Cell Mol Life Sci* 60, 1613-1622 (2003)
- Li J, Fu J, Toumazou C, Yoon HG, Wong J: A role of the amino-terminal (N) and carboxyl-terminal (C) interaction in binding of androgen receptor to chromatin. *Mol Endocrinol* 20, 776-785 (2006)
- Li J, Zhang D, Fu J, Huang Z, Wong J: Structural and Functional Analysis of Androgen Receptor in Chromatin. *Mol Endocrinol* (Epub ahead of print) (2008)
- Lindsey JS, Wilkinson MF: Pem: a testosterone- and LH-regulated homeobox gene expressed in mouse Sertoli cells and epididymis. *Dev Biol* 179, 471-484 (1996)
- Loy CJ, Yong EL: Sex, infertility and the molecular biology of the androgen receptor. *Curr Opin Obstet Gynecol* 13, 315-321 (2001)
- Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon CJ, Wilson EM, French FS: 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 USA* 86, 9534-9538 (1989)
- Ma H, Hong H, Huang SM, Irvine RA, Webb P, Kushner PJ, Coetzee GA, Stallcup MR: Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. *Mol Cell Biol* 19, 6164-6173 (1999)
- MacDonald PC, Madden JD, Brenner PF, Wilson JD, Siiteri PK: Origin of estrogen in normal men and in women with testicular feminization. *J Clin Endocrinol Metab* 49, 905-916 (1979)
- Marcelli M, Tilley WD, Wilson CM, Griffin JE, Wilson JD, McPhaul MJ: Definition of the human androgen receptor gene structure permits the identification of mutations that cause androgen resistance: premature termination of the receptor protein at amino acid residue 588 causes complete androgen resistance. *Mol Endocrinol* 4, 1105-1116 (1990)
- Marshall Graves JA: Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis - a feminist view. *Biol Reprod* 63, 667-676. Review (2000)
- Matias PM, Donner P, Coelho R, Thomaz M, Peixoto C, Macedo S, Otto N, Joschko S, Scholz P, Wegg A, Bäsler S, Schäfer M, Egner U, Carrondo MA: Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications für pathogenic gene mutations. *J Biol Chem* 275, 26164-26171 (2000)
- McEwan IJ, Lavery D, Fischer K, Watt K.: Natural disordered sequences in the amino terminal domain of nuclear receptors: lessons from the androgen and glucocorticoid receptors. *Nucl Recept Signal* 5: e001 (2007)
- McPhaul MJ, Marcelli M, Zoppi S, Wilson CM, Griffin JE, Wilson JD: Mutations in the ligand-binding

- domain of the androgen receptor gene cluster in two regions of the gene. *J Clin Invest* 90, 2097-2101 (1992)
- Meeks JJ, Crawford SE, Russell TA, Morohashi K, Weiss J, Jameson JL: Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development* 130, 1029-1036 (2003)
- Melo KF, Mendonca BB, Billerbeck AE, Costa EM, Inácio M, Silva FA, Leal AM, Latronico AC, Arnold IJ: Clinical, hormonal, and genetic characteristics of androgen insensitivity syndrome in a Brazilian cohort: five novel mutations in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3241-3250 (2003)
- Miller WL: Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12, 67-81 (1998)
- Mittwoch U: Genetics of sex determination: exceptions that prove the rule. *Mol Genet Metab* 71, 405-410 (2000)
- Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS: A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol* 9, 44 (2008)
- Moras D, Gronemeyer H: The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10, 384-391 (1998)
- Need EF, Scher HI, Peters AA, Moore NL, Cheong A, Ryan CJ, Wittert GA, Marshall VR, Tilley WD, Buchanan G.A: novel androgen receptor amino terminal region reveals two classes of amino/carboxyl interaction-deficient variants with divergent capacity to activate responsive sites in chromatin. *Endocrinology* 150, 2674-2682 (2009)
- Orphanides G, Reinberg D: A unified theory of gene expression. *Cell* 108, 439-451 (2002)
- Papadimitriou DT, Linglart A, Morel Y, Chaussain JL: Puberty in subjects with complete androgen insensitivity syndrome. *Horm Res* 65, 126-131 (2006)
- Park SY, Jameson JL: Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology* 146, 1035-1042 (2005)
- Park SY, Meeks JJ, Raverot G, Pfaff LE, Weiss J, Hammer GD, Jameson JL: Nuclear receptors Sf1 and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development* 132, 2415-2423 (2005)
- Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS: Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16, 271-321 (1995)
- Quintana-Murci L, Fellous M: The Human Y Chromosome: The Biological Role of a "Functional Wasteland". *J Biomed Biotechnol* 1, 18-24 (2001)
- Read JT, Rahmani M, Boroomand S, Allahverdian S, McManus BM, Rennie PS: Androgen receptor regulation of the versican gene through an androgen response element in the proximal promoter. *J Biol Chem* 282, 31954-31963 (2007)
- Reid J, Kelly SM, Watt K, Price NC, McEwan IJ: Conformational analysis of the androgen receptor amino-terminal domain involved in transactivation. Influence of structure-stabilizing solutes and protein-protein interactions. *J Biol Chem* 277, 20079-20086 (2002)
- Rennie PS, Bruchofsky N, Leco KJ, Sheppard PC, McQueen SA, Cheng H, Snoek R, Hamel A, Bock ME, MacDonald BS, Nickel BE, Chang C, Liao S, Cattini PA, Matusik RJ: Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Mol. Endocrinol* 7, 23-36 (1993)

- Rosenfeld MG, Glass CK: Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276, 36865-36868 (2001)
- Sack JS, Kish KF, Wang C, Attar RM, Kiefer SE, An Y, Wu GY, Scheffler JE, Salvati ME, Krystek SR Jr, Weinmann R, Einspahr HM: Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4904-4909 (2001)
- Schaufele F, Carbonell X, Guerbodot M, Borngraeber S, Chapman MS, Ma AA, Miner JN, Diamond MI: The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 9802-9807 (2005)
- Shaffer PL, Gewirth DT: Structural basis of VDR-DNA interactions on direct repeat response elements. *EMBO J* 21, 2242-2252 (2002)
- 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 USA* 101, 4758-4763 (2004)
- Shatkina L, Mink S, Rogatsch H, Klocker H, Langer G, Nestl A, Cato AC: The cochaperone BAG-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor. *Mol Cell Biol* 23, 7189-7197 (2003)
- Shen HC, Buchanan G, Butler LM, Prescott J, Henderson M, Tilley WD, Coetzee GA: GRIP1 mediates the interaction between the amino- and carboxyl-termini of the androgen receptor. *Biol Chem* 386, 69-74 (2005)
- Shimamura R, Fraizer GC, Trapman J, Lau YfC, Saunders GF: The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Müllerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin Cancer Res* 3, 2571-2580 (1997)
- 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* 156, 7-14 (1997)
- Song LN, Herrell R, Byers S, Shah S, Wilson EM, Gelmann EP: Beta-catenin binds to the activation function 2 region of the androgen receptor and modulates the effects of the N-terminal domain and TIF2 on ligand-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 23, 1674-1687 (2003)
- Steketee K, Berrevoets CA, Dubbink HJ, Doesburg P, Hersmus R, Brinkmann AO, Trapman J: Amino acids 3-13 and amino acids in and flanking the 23FxxLF27 motif modulate the interaction between the N-terminal and ligand-binding domain of the androgen receptor. *Eur J Biochem* 269, 5780-5791 (2002)
- Tadokoro R, Bunch T, Schwabe JW, Hughes IA, Murphy JC: Comparison of the molecular consequences of different mutations at residue 754 and 690 of the androgen receptor and androgen insensitivity syndrome phenotype. *Clin Endocrinol (Oxf)* 71, 253-260 (2009)
- Tahiri B, Auzou G, Nicolas JC, Sultan C, Lupo B: Participation of critical residues from the extreme C-terminal end of the human androgen receptor in the ligand binding function. *Biochemistry* 40, 8431-8437 (2001)
- Thompson J, Saatcioglu F, Jänne OA, Palvimo JJ: Disrupted amino- and carboxyl-terminal interactions of the androgen receptor are linked to androgen insensitivity. *Mol Endocrinol* 15, 923-935 (2001)
- Trapman J, Dubbink HJ: The role of cofactors in sex steroid action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21, 403-414 (2007)

- Truss M, Beato M: Steroid Hormone Receptors: Interaction with Deoxyribonucleic Acid and Transcription Factors. *Endocrine Reviews* 14, 459-479 (1993)
- Ulloa-Aguirre A, Carranza-Lira S, Mendez JP, Angeles A, Chavez B, Perez-Palacios G: Incomplete regression of müllerian ducts in the androgen insensitivity syndrome. *Fertil Steril* 53, 1024-1028 (1990)
- van de Wijngaart DJ, van Royen ME, Hersmus R, Pike AC, Houtsmuller AB, Jenster G, Trapman J, Dubbink HJ: Novel FXXFF and FXXMF motifs in androgen receptor cofactors mediate high affinity and specific interactions with the ligand-binding domain. *J Biol Chem* 281, 19407-19416 (2006)
- van Royen ME, Cunha SM, Brink MC, Mattern KA, Nigg AL, Dubbink HJ, Verschure PJ, Trapman J, Houtsmuller AB: Compartmentalization of androgen receptor protein-protein interactions in living cells. *J Cell Biol* 177, 63-72 (2007)
- Van YH, Lin JL, Huang SF, Luo CC, Hwang CS, Lo FS: Novel point mutations in complete androgen insensitivity syndrome with incomplete müllerian regression: two Taiwanese patients. *Eur J Pediatr* 162, 781-784 (2003)
- Verrijdt G, Haelens A, Claessens F: Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. *Mol Genet Metab* 78, 175-185 (2003)
- Wang Q, Ghadessy FJ, Trounson A, de Kretser D, McLachlan R, Ng SC, Yong EL: Azoospermia with a mutation in the ligand-binding domain of an androgen receptor displaying normal ligand binding, but defective trans-activation. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 4303-4309 (1998)
- Werner R, Schütt J, Hannema S, Röpke A, Wieacker P, Hiort O, Holterhus PM: Androgen receptor gene mutations in androgen insensitivity syndrome cause distinct patterns of reduced activation of androgen-responsive promoter constructs. *J Steroid Biochem Biol* 101, 1-10 (2006)
- Wilson CA, Davies DC: The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction* 133, 331-359 (2007)
- Wong HY, Hoogerbrugge JW, Pang KL, van Leeuwen M, van Royen ME, Molier M, Berrevoets CA, Dooijes D, Dubbink HJ, van de Wijngaart DJ, Wolffenbuttel KP, Trapman J, Kleijer WJ, Drop SL, Grootegoed JA, Brinkmann AO: A novel mutation F826L in the human androgen receptor in partial androgen insensitivity syndrome; increased NH₂-/COOH-terminal domain interaction and TIF2 co-activation. *Mol Cell Endocrinol* 292, 69-78 (2008)
- Yeh S, Kang HY, Miyamoto H, Nishimura K, Chang HC, Ting HJ, Rahman M, Lin HK, Fujimoto N, Hu YC, Mizokami A, Huang KE, Chang C: Differential induction of the androgen receptor transcriptional activity by selective androgen receptor coactivators. *Keio J Med* 48, 87-92 (1999)
- Zuccarello D, Ferlin A, Vinanzi C, Prana E, Garolla A, Callewaert L, Claessens F, Brinkmann AO, Foresta C: Detailed functional studies on androgen receptor mild mutations demonstrate their association with male infertility. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68, 580-588 (2008)

VII Anhang

1. Materialienindex.....	87
1.1 Allgemein verwendete Chemikalien und Reagenzien	87
1.2 Für Bakterienkultur und Klonierung verwendete Reagenzien	87
1.3 Für Zellkultur und Transfektion verwendete Reagenzien	88
1.4 Für Proteinlysate und Western Blots verwendete Reagenzien	88
1.5 Geräte und Computersoftware	89
1.6 Einmalartikel.....	90
1.7 Kits	90
2. Primer	91
3. Plasmidkarten.....	92
3.1 pSV AR0	92
3.2 pAD-NTD.....	93
3.3 pBD-LBD.....	94
3.4 pCR4-Blunt-TOPO mit AR-LBD.....	95
4. Plasmidlisten	96
4.1 Verwendete Plasmide des AR Expressionsvektors pSVAR.....	96
4.2 Verwendete Plasmide des Two-Hybrid-Vektors pAD-NTD	96
4.3 Verwendete Plasmide des Two-Hybrid-Vektors pBD-LBD.....	97
5. Programm für die PCR-Mutagenese	97
6. Luminometer-Programm.....	98
7. Sequenzierungsprogramm	98
8. Einbuchstaben-Code der Aminosäuren	99

1. Materialienindex

1.1 Allgemein verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glyzerol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Select Peptone	Invitrogen, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Fluka, Schweiz
Trizma Base (Tris)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Select Tryptone	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	GIBCO, Invitrogen, USA
Select Yeast Extract	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	J.T.Baker, Holland

1.2 Für Bakterienkultur und Klonierung verwendete Reagenzien

Select-Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA Ladder 100bp und 1kb	New England Biolabs, USA
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Kanamycin mg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LB Medium Capsulett	QBioGene, USA
TE-Puffer (10mM TrisCl, pH 8,0, 1mM EDTA)	Qiagen, Hilden

1.3 Für Zellkultur und Transfektion verwendete Reagenzien

Aktivkohle (Norit A pract 4-7 µm)	Serva, Heidelberg
Dextran T300	Sigma, Deisenhofen
Dihydrotestosteron (DHT) 0,001 g/l in Ethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FCS	PAA, Cölbe
FuGene HD Transfection Reagent	Roche, USA
PBS Puffer 1, pH 7,2	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

1.4 Für Proteinlysate und Western Blots verwendete Reagenzien

Acrylamid (Rotiphoresegel 30)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
bovine serum albumine (BSA)	Serva, Heidelberg
Kaleidoscope Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad, München
Methanol	J.T. Baker, Holland
Mammalian-Protein-Extraction-Reagent (M-PER)	Pierce, USA
Protein Assay	Bio-Rad, München
Proteasen-Inhibitor-Cocktail (complete, Mini, EDTA-free)	Roche, USA
Skim Milk Powder	Difco, Becton & Dickinson, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween 20	Bio-Rad, München
Western-Lightning-Chemiluminescence-Reagent-Plus	PerkinElmer, USA

1.5 Geräte und Computersoftware

Geräte	Bezugsfirma
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Genetic-Analyzer-3130 (Kapillarsequenzierer)	Applied Biosystems, Hitachi, USA
Excel	Microsoft, USA
Lasergene 6.0 (SeqBuilder, SeqManager)	DNASStar, USA
Lucy 3 Luminometer	Anthos Mikrosysteme, Krefeld
Mastercycler-Gradient	Eppendorf, Hamburg
Mikro-Rapid Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Mini-PROTEAN®-3-Cell	BioRad, München
Mini-Trans-Blot®-Electrophoretic-Transfer-Cell	BioRad, München
Molecular-Imager-Chemidoc-XRS-System	Bio-Rad, München
Nalgene-Cryo-Einfriergerät	NUNC Thermo Fisher Scientific, Wiesbaden
Prism 5	GraphPad Software, LaJolla, USA
QuantityOne	Bio-Rad, München
Sorvall RC-5B-Refrigerated-Superspeed-Centrifuge mit GS3 Rotor	Thermo Scientific, Karlsruhe
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Schüttelinkubator Lab Therm	Kühner, Schweiz
Sequence Analysis 5.2	Applied Biosystems, USA
Thermomixer-Comfort	Eppendorf, Hamburg

1.6 Einmalartikel

bio-one-CELLSTAR-TC-Plate 24-Well	Greiner, Solingen
Costar-Assay-Plate, 96-Well	Corning, USA
CryoTube	Nunc, Wiesbaden
Hyperfilm	Amersham, Freiburg
Nunclon™ Surface 6-Well Platten	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen	Greiner, Solingen
QIAshredder Homogenizer	Qiagen, Hilden
Ready-Gel-Blotting-Sandwiches	Bio-Rad, München
10ml Röhrchen	Harre, Hannover
Zellkulturflaschen 175cm ² mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht

1.7 Kits

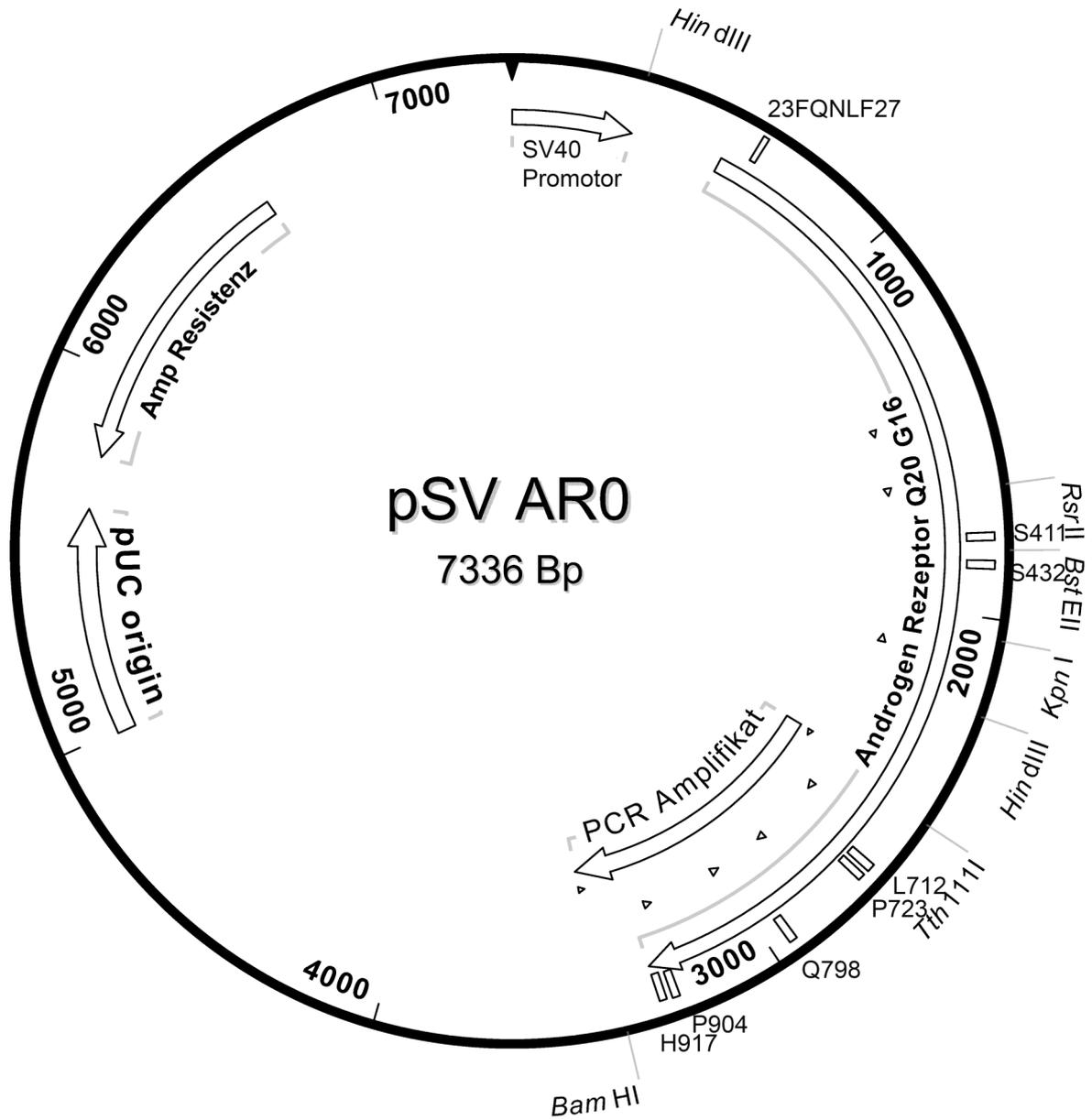
BigDye® Terminator-v1.1-Cycle-Sequencing-Kit	Applied Biosystems, USA
Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System	Promega, USA
EndoFree-Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
High-Pure-PCR-Product-Purification-Kit	Roche, USA
Mammalian-Two-Hybrid-Assay-Kit	Stratagene, USA
QIAprep-Spin-Miniprep-Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter-Plasmid-Midi-Kit	Qiagen, Hilden
Zero-Blunt-TOPO-pCR4-Cloning-Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe

2. Primer

Name	Sequenz
AR536-TAG-BamHI*	5'-TGG ATC CTA GTC CCC GTA AGG TCC GGA GTA GCT-3'
ARKpn_fw*	5'-CGC ACC TGA TGT GTG GTA CCC T-3'
GGN5up	5'-TGC CGA CTA CTA CAA CTT TCC ACT -3'
GGN5low	5'-AGG GGC CCA TTT CGC TTT TCA CAC-3'
F916X-BamHI*	5'-CTC GGA TCC TCA ATA GAT GGG CTT GAC TT-3'
H917RBamHI*	5'-CTC GGA TCC TCA CTG GGT GCG GAA ATA GAT G-3'
hAR-GGN-1s:	5'-GCA AGA GCA CTG AAG ATA CTG C-3'
hAR-GGN-2a	5'-CAT CAA AGA ATT TTT GAT TTT TCA GC-3'
HindIII-AR1*:	5'-GGA AGC TTG ATG GAA GTG CAG TTA GGC TG-3'
HindIII_LBD644*	5'-AAG CTT GGA GGC TTC CAG CAC CAC CA-3'
LBD_F916X*	5'CTC CTG CAG TCA ATA GAT GGG CTT GAC TT-3'
LBD_H917R*	5'-CTC CTG CAG TCA CTG GGT GCG GAA ATA GAT G-3'
LBD-seq-1s	5'-ACA CGA CAA CAA CCA GCC CGA CTC-3'
LBD-seq-2a	5'-CTT GGG CAC TTG CAC AGA GAT GAT-3'
LBD-seq-3s	5'-TAC TTC GCC CCT GAT CTG CTT TTC-3'
P723S-up*	5'-GGG CCA AGG CCT TGT CTG GCT TCC GC-3'
P723S-low*	5'- GCG GAA GCC AGA CAA GGC CTT GGC CC-3'
P904S-up*	5'- CAT CTC TGT GCA AGT GTC CAA GAT CCT TTC TGG G-3'
P904S-low*	5'-CCC AGA AAG GAT CTT GGA CAC TTG CAC AGA GAT G-3'
pBD-5'-seq	5'-AGC ATA GAA TAA GTG CGA C-3'
pCMV-AD-seq1	5'-GAA GCT ATA ACT CGC CTG GTG ACA-3'
pSV0-Seq-as*	5'-TGA TAG GCA GCC TGC ACC TGA-3'
T3 TOPO	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG-3'
T7 TOPO	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
mit * gekennzeichneten wurden auch für die PCR-Mutagenese verwendet	

3. Plasmidkarten

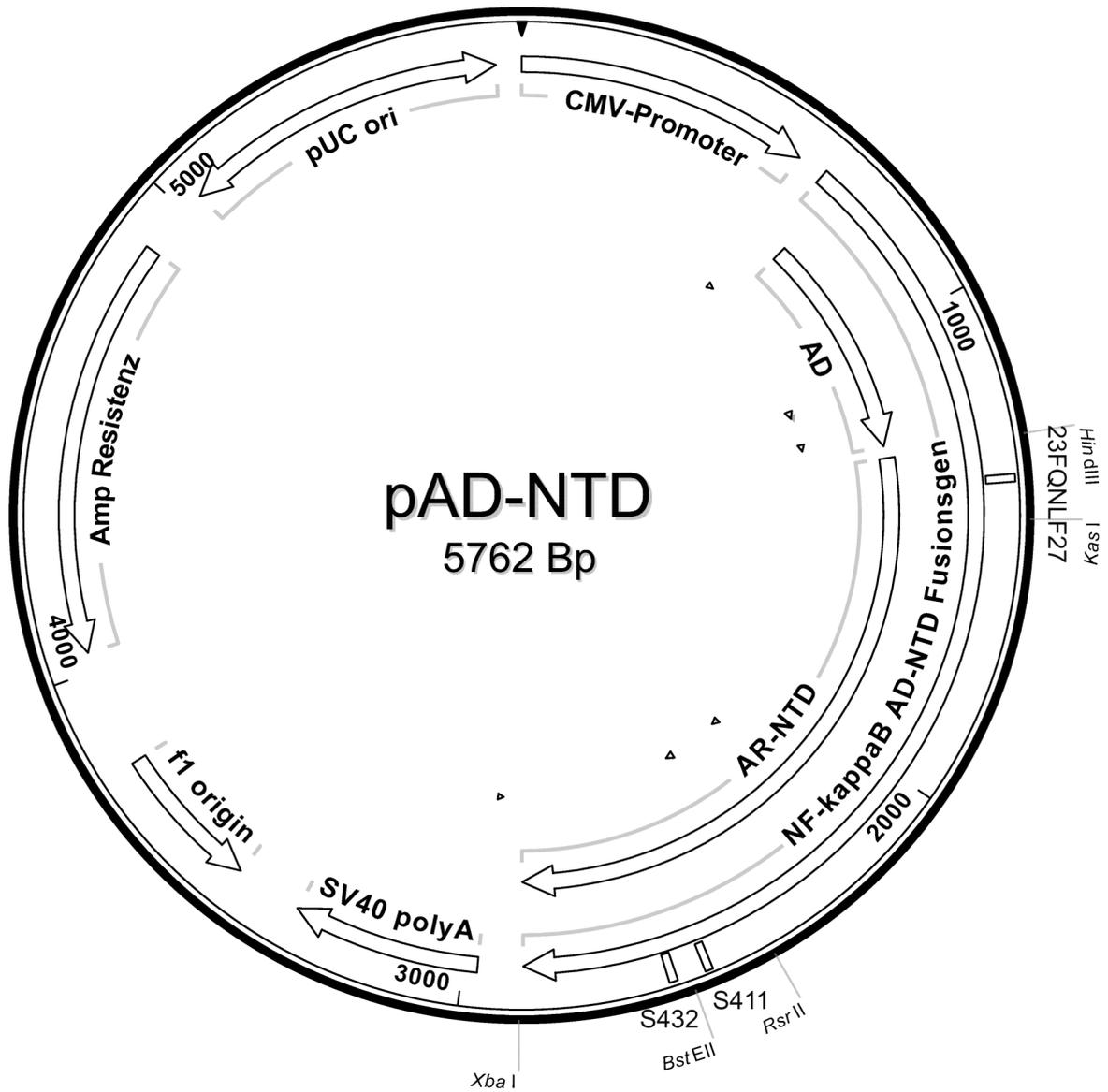
3.1 pSV AR0



Legende

- ▷ Primer
- ▭ Position der mutierten Aminosäuren
- ▭▶ Gen
- Schnittstellen verwendeter Restriktionsenzyme

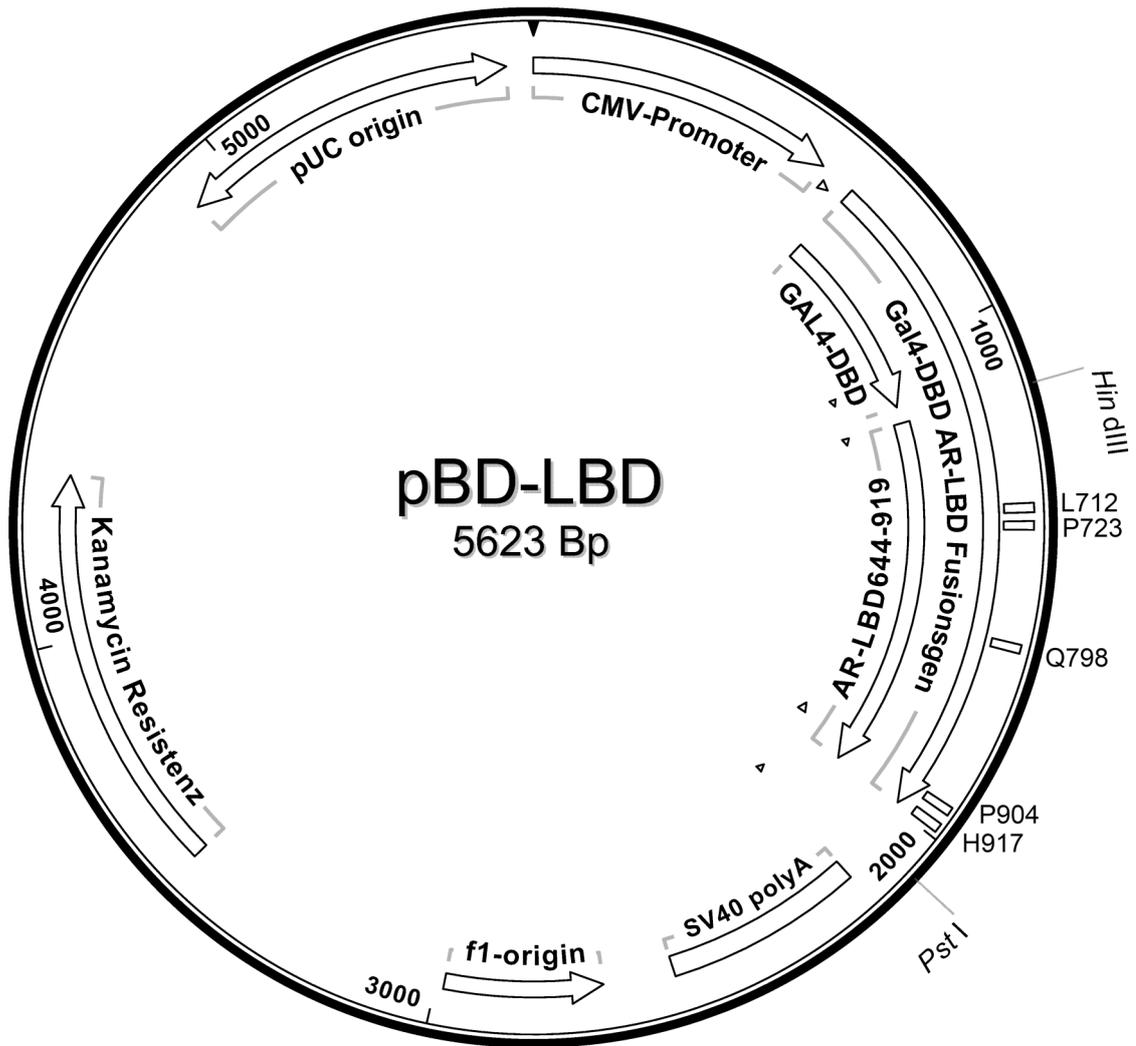
3.2 pAD-NTD



Legende

- Primer
- Position der mutierten Aminosäuren
- Gen
- Schnittstellen verwendeter Restriktionsenzyme

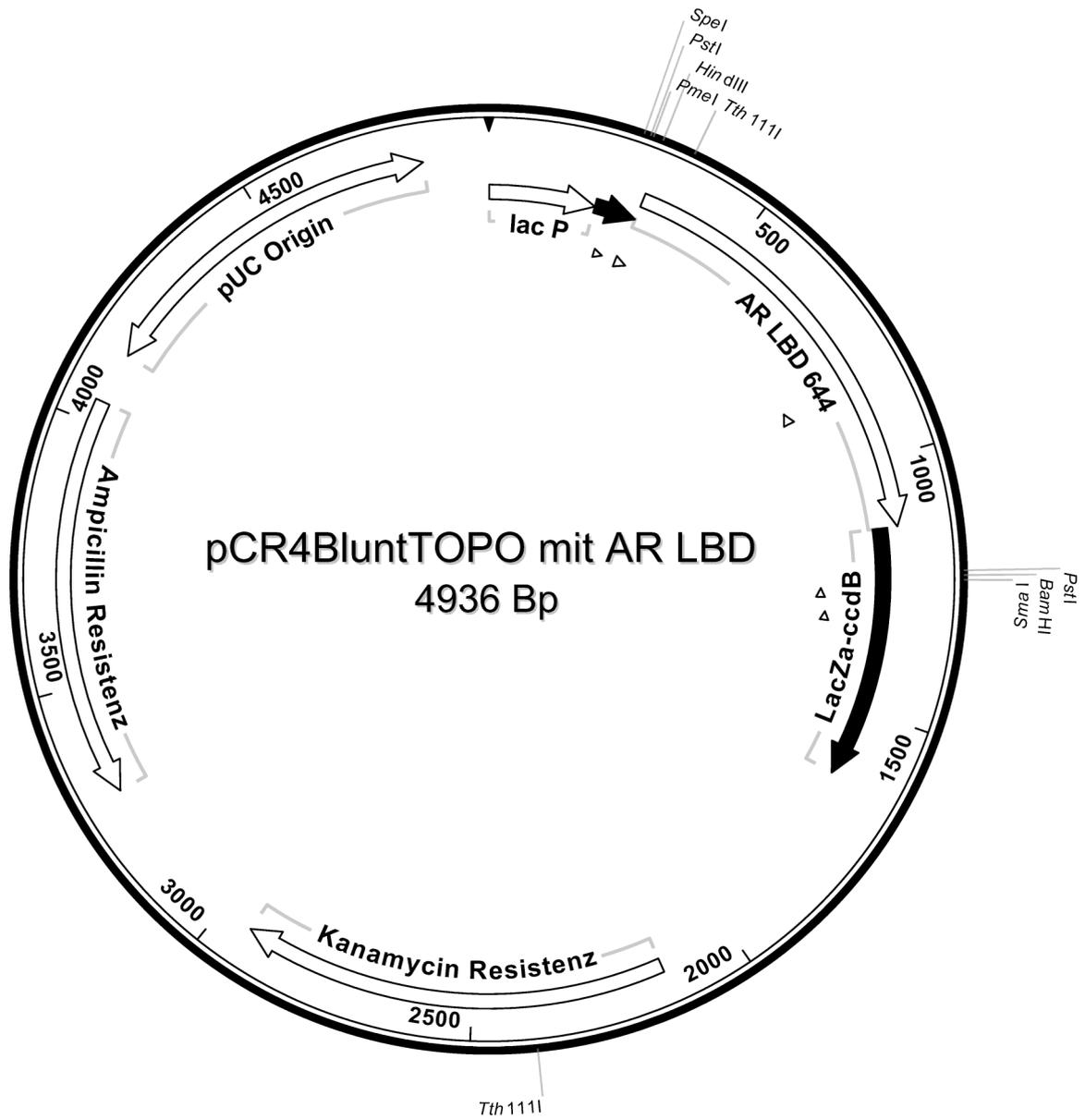
3.3 pBD-LBD



Legende

- ▷ Primer
- Position der mutierten Aminosäuren
- ▢ Gen
- Schnittstellen verwendeter Restriktionsenzyme

3.4 pCR4-Blunt-TOPO mit AR-LBD



Legende

- ▷ Primer
- ▭ Position der mutierten Aminosäuren
- ▶ Gen
- Schnittstellen verwendeter Restriktionsenzyme

4. Plasmidlisten

4.1 Verwendete Plasmide des AR Expressionsvektors pSVAR

pSVAR0	Wildtyp Q16, G20
pSVAR FQNAA	Mutationen in der NTD
pSVAR Δ 409-411	
pSVAR S411N	
pSVAR S432F	
pSVAR FQNAA+ Δ 409-411	
pSVAR FQNAA+ S411N	
pSVAR FQNAA+ S432F	
pSVAR L712F	Mutationen in der LBD
pSVAR L712F + FQNAA	
pSVAR P723S	
pSVAR Q798E	
pSVAR P904S	
pSVAR F916X	
pSVAR H917R	
pSV02 AR NTD	

4.2 Verwendete Plasmide des Two-Hybrid-Vektors pAD-NTD

pAD-NTD	Wildtyp (Q20, G16; AS 1-536)
pAD-NTD FQNAA	Mutationen in der NTD
pAD-NTD Δ 409-411	
pAD-NTD S411N	
pAD-NTD S432F	
pAD-NTD FQNAA + Δ 409-411	
pAD-NTD FQNAA + S411N	
pAD-NTD FQNAA + S432F	

4.3 Verwendete Plasmide des Two-Hybrid-Vektors pBD-LBD

pBD-LBD	Wildtyp der LBD (AS 644-919)
pBD-LBD L712F	Mutationen in der LBD
pBD-LBD P723S	
pBD-LBD Q798E	
pBD-LBD P904S	
pBD-LBD F916X	
pBD-LBD H917R	

5. Programm für die PCR-Mutagenese

	Temperatur	Zeit in min:s	Zykluszahl
Aufheizen des Heizblocks	98 °C		1
Initiale Denaturierung	98 °C	0:30	1
Denaturierung	98 °C	0:10	30
Primerhybridisierung	60 °C	0:30	
Elongation	72 °C	0:30	
	72 °C	5:00	1
Kühlung	8 °C		1

6. Luminometer-Programm

Programm für die Detektion der Luziferaseaktivität mit dem Double Single Point Luminometer Lucy 3 von Anthos mit 570nm Highpass Filter	
25 µl	Zelllysate
100 µl	Luciferase Assay Reagent II
10 s	Messung der Firefly- Luciferase Aktivität
3 s	Pause
100 µl	Stop&Glo Reagent
10 s	Abstoppen der Reaktion und Messung der Renilla-Luziferase Aktivität
3 s	Pause und Einstellen des nächsten Wells

7. Sequenzierungsprogramm

	Temperatur	Zeit in min:s	Zykluszahl
Aufheizen des Heizblocks	96 °C		1
Initiale Denaturierung	96 °C	3:00	1
Primerhybridisierung	59 °C	0:20	24
Elongation	60 °C	4:00	
Denaturierung	96 °C	0:20	
	50 °C	0:20	1
	60 °C	4:00	1
Kühlung	4 °C		1

8. Einbuchstaben-Code der Aminosäuren

Aminosäure	Buchstabe	Aminosäure	Buchstabe
Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

VIII Danksagung

Zum Abschluss möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Olaf Hiort meinen Dank für die Bereitstellung des spannenden Themas und das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten aussprechen. Weiterhin bedanke ich mich bei ihm für die sehr gute und freundliche Betreuung, die Unterstützung bei der Interpretation der Ergebnisse und für wichtige Denkanstöße bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation.

Ich möchte dem Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Lübeck, Prof. Dr. Egbert Herting, für die Möglichkeit danken, in seiner Klinik zu forschen. Außerdem bedanke ich mich bei der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck für die Förderung im Rahmen des Stipendienprogramms „Exzellenzmedizin“, die mir die Durchführung einer aufwendigeren experimentellen Arbeit sehr erleichtert hat.

Mein großer Dank gilt Dr. Ralf Werner für die ausdauernde Betreuung beim experimentellen Teil dieser Arbeit. Besonders möchte ich mich für die naturwissenschaftlichen Einblicke in die Thematik, die Einführung in die verwendeten Methoden, die jederzeitige Erreichbarkeit und die praktischen Hilfestellungen im Umgang mit dem technischen Equipment bedanken. Eine große Hilfe war für mich ebenfalls die Unterstützung beim Erstellen der schriftlichen Fassung meiner Dissertation. Bei Helga Grötsch möchte ich mich sehr für die guten Ratschläge und Korrekturen bedanken.

Weiterhin danke ich der ganzen Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme und das positive Arbeitsklima während der vielen gemeinsam verbrachten Stunden. Mein besonderer Dank gilt Frau Dagmar Struve für die geduldige Einarbeitung in die verschiedenen Methoden und die Hilfe bei unvorhergesehenen Problemen an der Zellkultur oder in der Dunkelkammer.

Johanna Varvarikés und Carolin Criée möchte ich für das Korrekturlesen der schriftlichen Ausarbeitung danken. Meine Eltern und Freunde haben mir im Studium und während der Ausarbeitung meiner Dissertation immer zur Seite gestanden, dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

IX Lebenslauf und Publikationen

Persönliche Daten

Name	Julia Katharina Gesing
Geburtsdatum	01.10.1983
Geburtsort	Achim

Studium

Okt 2009 – Jan 2010	3. Terial Pädiatrie, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Lübeck
Sep 2009	Aktive Teilnahme an der Jahrestagung der European Society for Paediatric Endocrinology 2009 in New York, Posterpräsentation
Jun – Okt 2009	2. Terial Chirurgie, Hospital General de México, Mexiko-Stadt
Apr – Jun 2009	2. Hälfte 1. Terial Innere Medizin, VA Medical Center Northport, Long Island
Feb – Apr 2009	1. Hälfte 1. Terial Innere Medizin, Sana-Kliniken Lübeck
Jul 2008	Teilnahme an der Sommerakademie Globale Gesundheit in Würzburg
Okt 2007	Stipendium „Exzellenzmedizin“ der Medizinischen Fakultät zu Lübeck für die Ausarbeitung einer experimentellen Promotionsarbeit
Feb – Jul 2007	Auslandssemester im Rahmen des Erasmus Programms an der „Universidad de Murcia“ in Spanien
Sep 2006	Teilnahme am Kongress „From Gene to Gender – 2nd International Symposium on DSD“ der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin UKSH – Campus Lübeck
Aug 2006 – Mai 2008	experimenteller Teil der Dissertation in der pädiatrisch-endokrino-logischen Forschungsgruppe der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UKSH – Campus Lübeck
Aug 2005	1. Staatsexamen (Note: 1,5)
seit Okt 2003	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

Schulbildung

2000-2003	Oberstufe des Alten Gymnasiums zu Bremen (Abiturnote: 1,1)
Aug – Nov 1999	Teilnahme am Schüleraustauschprogramm des Senators für Bildung und Wissenschaft Bremen mit British Columbia (Kanada)
1994 – 2000	Ökumenisches Gymnasium in Bremen
1990 – 1994	Grundschule an der Lessingstraße, Bremen

Praktika

Sep 2008	Famulatur im „Hospital del Niño“ in Toluca, Mexiko
Mär 2008	Famulatur in der Ambulanz des St. Joseph Stifts, Bremen
Aug 2007	Famulatur in der Kinderklinik der Universitätsklinik Murcia, Spanien
Apr 2006 – Nov 2007	Arbeit als studentische Aushilfskraft für den zentralen Blutentnahme Dienst der Medizinischen Klinik I, UKSH Lübeck
Mär 2006	Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe des St. Joseph Stifts, Bremen
Feb 2004	Krankenpflegepraktikum in der Prof. Hess Kinderklinik, Bremen
Sep 2003	Praktikum im Zentrum für Humangenetik, Bremen
Jun – Jul 2003	Krankenpflegepraktikum in der Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie des Krankenhauses Bremen Mitte

Soziales Engagement und Interessen

Seit Sep 2005	Violine im Uni-Orchester Lübeck
Apr 2008	Organisation des bvmd-Projekts „uni hilft“ in Lübeck, zur Registrierung neuer Blutspender und Knochenmarkspender
Seit Apr 2006	Mitarbeit in der Bundesvertretung der Medizinstudierenden in Deutschland (bvmd) in Lübeck, Organisation von Famulaturplätzen, Unterkunft und Rahmenprogramm für ausländische Medizinstudenten und Vermittlung der Lübecker Studenten ins Ausland
2001 - 2003	Rudern, Teilnahme an Wettkämpfen und Co-Leitung des Kindertrainings
1998- 2003	Violine im Jugend-Sinfonie-Orchester Bremen Mitte

Publikation

Werner R, Zhan J, Gesing J, Struve D, Hiort O: In-vitro characterization of androgen receptor mutations associated with complete androgen insensitivity syndrome reveals distinct functional deficits. Sex Dev 2, 73-83 (2008)

Posterpräsentationen

Gesing J, Werner R, Zhan J, Holterhus PM, Hiort O: Promotor-specific dependency on the N/C-terminal interaction of the human androgen receptor – a reexamination. PO2-087 Disorders of Sexual Differentiation, Horm Res 2009, Vol 72 suppl 3: 232

Gesing J, Struve D, Werner R, Hiort O: Ist es ein Mädchen oder ein Junge? Androgenresistenz. Zweiter Lübecker Doktorandentag 2008

Werner R, Gesing J, Zhan J, Struve D, Holterhus PM, Hiort O: Mutations in the Ligand Binding Domain of the Human Androgen Receptor and their Role for N/C- and Coactivator Interaction. PO3-657 Sex Differentiation, Horm Res 2007, Vol 68 suppl 1: 204