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

Androgenmetabolismus in peripheren Genitalhautfibroblasten von Patienten mit 17β-Hydroxysteroid-dehydrogenase 3-Mangel

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Inken Sommerfeld
aus Lübeck

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Olaf Hiort

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Achim Peters

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.10.2010

gez. Prof. Dr. med Solbach
- Dekan der medizinischen Fakultät -

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Die männliche Geschlechtsentwicklung 1

1.2 Die männliche Geschlechtsreife 3

1.3 Die Sexualsteroidbiosynthese 5

1.4 Die 17β-Hydroxysteroiddehydrogenasen und Intrakrinologie 8

1.5 Wirkungen der Androgene 9

1.6 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase 3-Mangel 11
1.6.1 Klinische Befunde 12
1.6.2 Endokrinologische Befunde 12
1.6.3 Genetische Befunde 13

1.7 Fragestellung 13

2 MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 Material 15
2.1.1 Zellen 15
2.1.1.1 Genitalhautfibroblasten und skrotale Fibroblasten 15
2.1.1.2 CHO-Zellen 16

2.2 Methoden 17
2.2.1 Zellkultur und verwendete Kulturmedien. 17
2.2.1.1 Auftauen der Fibroblasten 17
2.2.1.2 Kultur und Inkubation der Zellen 18
2.2.1.3 Passagierung (Trypsinierung) und Verteilung auf 6-Loch-Platten 18
2.2.1.4 Inkubation mit Androstendion 18
2.2.1.5 Abnahme von Zellen und Überstand 19
2.2.1.6 RNA-Isolierung 19
2.2.1.7 Isolierung von Proteinlysat 20
2.2.1.8 Einfrieren von Zellkulturen 20
2.2.2 Qualitätsprüfung und Quantitätsprüfung der isolierten Produkte 21
2.2.2.1 Qualitäts- und Quantitätsmessung der Proteine 21
2.2.2.2 Qualitäts- und Quantitätsmessung der mRNA 21
2.2.3 Fällen der RNA 23
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion 23
2.2.4.1 Grundlagen 23
2.2.4.2 cDNA-Erststrangsynthese 24
2.2.4.3 Ablauf der Real-Time-PCR mit dem Light Cycler 25
2.2.4.4 Auswertung der Ergebnisse durch relative Quantifizierung 27
2.2.4.5 Qualitätsüberprüfung der PCR-Produkte 28

2.2.5 Western Blot 29
2.2.5.1 Grundlagen 29
2.2.5.2 Gießen der Gele und Vorbereitung der Proben 29
2.2.5.3 Elektrophorese 31
2.2.5.4 Blotten 31
2.2.5.5 Markierung der Membran mit Antikörpern 32
2.2.5.6 Detektion 33
2.2.5.7 Quantitative Auswertung 34
2.2.6 Untersuchung der Mediumüberstände auf Hormone und Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese 35
2.2.7 Reportergenassay 37
2.2.7.1 Grundlagen 37
2.2.7.2 Vorbereitungen der Zellen 38
2.2.7.3 Transfektion 38
2.2.7.4 Hormonzugabe 39
2.2.7.5 Lysieren der Zellen und Messen im Luminometer 39
2.2.7.6 Auswertung der Ergebnisse 40

3 ERGEBNISSE 41

3.1 Zellkultur der Fibroblasten 42

3.2 RT-PCR-Analysen 42

3.3 mRNA-Expressionsprofil nach Inkubation mit Androstendion 44
3.3.1 Expressionsprofil der 17β-HSD 5 mRNA 44
3.3.2 Expressionsprofil der Androgenrezeptor mRNA 45

3.4 Protein-Expressionsprofil nach Inkubation mit Androstendion 46
3.4.1 Expressionsprofil des 17β-HSD 5 Proteins 47
3.4.2 Expressionsprofil des Androgenrezeptor Proteins 49

3.5 Untersuchung der Mediumüberstände auf Hormone und Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese 50

3.6 Androgene Wirkung der Kulturüberstände 53

4 DISKUSSION 56

5 ZUSAMMENFASSUNG 71

6 LITERATURVERZEICHNIS 72

7 ANHANG 80
7.1 Tabellen der verwendeten Materialen 80
7.2 Tabellen zur Zusammensetzung der selbst hergestellten Puffer, Lösungen und Gele 82
7.3 Tabellen der verwendeten Primer 85
7.4 Tabellen zu den Ergebnissen 86
7.5 Adressenverzeichnis unserer Kooperationspartner 90

8 DANKSAGUNG 91

9 LEBENSLAUF 92

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die männliche Geschlechtsentwicklung mit beteiligten Faktoren 3
Abb. 2: Männliche Pubertätsstadien nach Tanner (Schambeharrung) 4
Abb. 3: Darstellung der Steroidbiosynthese mit beteiligten Enzymen 7
Abb. 4: Dosis-Antwort-Kurve von Androstendion am $(ARE)_2$-TATA-Luc-Promoter in CHO Zellen 11
Abb. 5: Qualitätsprüfung der mRNA im Elektropherogramm 23
Abb. 6(a-c): Ablauf der Amplifikationsphase bei Real-Time-PCR mit SYBR Green 26
Abb. 7: Light-Cycler Quantifizierungslauf mit Androgenrezeptor-Primern 27
Abb. 8: Darstellung einer Western-Blot Quantifizierung 35
Abb. 9: Zusammenfassende Darstellung der Versuchsdurchführung 41
Abb. 10: Schmelzkurvenanalyse zur Spezifitätsprüfung von PCR-Produkten 43
Abb. 11: Agarosegel zur Prüfung der spezifischen Fragmentlänge von PCR-Produkten 43
Abb. 12: Einfluss von Androstendion auf die mRNA-Akkumulation der 17ß-HSD 5 45
Abb. 13: Einfluss von Androstendion auf die mRNA-Akkumulation des Androgenrezeptors 46
Abb. 14: Expressionsprüfung des 17β-HSD 5-Proteins in Leber und Vorhaut 47
Abb. 15+16: Einfluss von Androstendion auf die Akkumulation des 17β-HSD 5-Proteins 48
Abb. 17+18: Einfluss von Androstendion auf die Akkumulation des Androgenrezeptor-Proteins 50
Abb. 19: Abnahme der Androstendionkonzentration in den gewonnen Mediumüberständen nach Inkubation der Zellen mit 10 nM Androstendion 51
Abb. 20: Testosteronkonzentrationen in den gewonnen Mediumüberständen nach Inkubation der Zellen mit 10 nM Androstendion 52
Abb. 21:Testosteronkonzentrationen in den gewonnen Mediumüberständen nach Inkubation der Zellen mit 700 nM Androstendion 53
Abb. 22: Abnahme der AR-Aktivierungskapazität des androstendionhaltigen Mediums 54

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Angaben zu den untersuchten Zelllinien der 17β-HSD 3-Mangel Patienten 15
Tab. 2: Altersangaben der untersuchten Normalkontrollzelllinien 16
Tab. 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot 33
Tab. 4: Verwendete Geräte, Zubehör- und Verbrauchsmaterialen 80
Tab. 5: Verwendete kommerzielle Gebrauchslösungen und Chemikalien 81
Tab. 6: Verwendete molekularbiologische Reagenzien 81
Tab. 7: Verwendete Kits 81
Tab. 9: Zusammensetzung des DMEM/F12-Kulturmedium 82
Tab. 11: Zusammensetzung 10 x PBS Puffer 82
Tab. 12: Zusammensetzung 1 x PBS Puffer 82
Tab. 13: Zusammensetzung 70 %Ethanol 82
Tab. 14: Zusammensetzung 2 % Agarosegel 82
Tab. 15: Zusammensetzung d-NTP´s 83
Tab. 16: Zusammensetzung DEPC-H_20 83
Tab. 17: Zusammensetzung Ethidiumbromidfärbelösung 83
Tab. 18: Zusammensetzung Loadingpuffer III 83
Tab. 19: Zusammensetzung 10 x TBE-Puffer 83
Tab. 20: Zusammensetzung 1 x TBE-Puffer 83
Tab. 21: Zusammensetzung APS 83
Tab. 22: Zusammensetzung 10 x Blottingpuffer 83
Tab. 23: Zusammensetzung 1 x Blottingpuffer 84
Tab. 24: Zusammensetzung 10 x Elektrodenpuffer 84
Tab. 25: Zusammensetzung 1 x Elektrodenpuffer 84
Tab. 26: Zusammensetzung Lysispuffer A 84
Tab. 27: Zusammensetzung Puffer C 84
Tab. 28: Zusammensetzung 2 x Sample Puffer nach Laemmli 84
Tab. 29: Zusammensetzung 5 % Skim Milk 84
Tab. 30: Zusammensetzung 5 x Sammelgelpuffer 84
Tab. 31: Zusammensetzung 5 x Trenngelpuffer 85
Tab. 32: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele 85
Tab. 33: Zusammensetzung des verwendeten Sammelgels 85
Tab. 34: Verwendete Primer 85
Tab.35: Mittelwerte der ermittelten normalisierten relativen Expressionsverhältnisse (17β-HSD 5 /PBGD) der 17β-HSD 5 mRNA (Versuch 1) 86

Tab.36: Mittelwerte der ermittelten normalisierten relativen Expressionsverhältnisse (17β-HSD 5 /PBGD) der 17β-HSD 5 mRNA (Versuch 2) 86
Tab.37: Mittelwerte der ermittelten normalisierten relativen Expressionsverhältntisse (AR/PBGD) der AR mRNA (Versuch 1) 86
Tab.38: Mittelwerte der ermittelten normalisierten relativen Expressionsverhältnisse (AR/PBGD) der AR mRNA (Versuch 2) 86
Tab. 39: Ermittelte relative Expressionsverhältnisse (17β-HSD 5/ Aktin) des 17β-HSD 5-Proteins im Western Blot (Versuch 1) 87
Tab. 40: Ermittelte relative Expressionsverhältnisse (17β-HSD 5/Aktin) des 17β-HSD 5-Proteins im Western Blot (Versuch 2) 87
Tab. 41: Ermittelte relative Expressionsverhältnisse (AR/ Aktin) des AR-Proteins im Western Blot (Versuch 1) 87
Tab. 42: Ermittelte relative Expressionsverhältnisse (AR/ Aktin) des AR-Proteins im Western Blot (Versuch 2) 87
Tab. 43: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen Androstendionkonzentration im Tandemmassenspektrometer (Versuch 1) in nmol/l nach Inkubation mit 10 nM Androstendion . 88
Tab. 44: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen Androstendionkonzentrationen im Tandemmassenspektrometer (Versuch 2) in nmol/l nach Inkubation mit 10 nM Androstendion . 88
Tab. 45: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen Testosteronkonzentrationen im Tandemmassenspektrometer (Versuch 1) in nmol/l nach Inkubation mit 10 nM Androstendion . 88
Tab. 46: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen Testosteronkonzentrationen im Tandemmassenspektrometer (Versuch 2) in nmol/l nach Inkubation mit 10 nM Androstendion . 88
Tab. 47: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen Testosteronkonzentrationen im Tandemmassenspektrometer in nmol/l nach Inkubation mit 700 nM Androstendion 88
Tab.48: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen androgenen Aktivierungskapazität der androstendionhaltigen Überstände (Versuch 1) 89
Tab. 49: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen androgenen Aktivierungskapazität der androstendionhaltigen Überstände (Versuch 2) 89

Abkürzungsverzeichnis

17β-HSD	17β-Hydroxysteroiddehydrogenase
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ak	Antikörper
AKR	Aldoketoreduktase
AMH	Anti-Müller-Hormon
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ARD	Androgenresistenzdiagnostik
ARE	Androgenresponsives Element
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
ca	Circa
g	Gramm
CCD	Charge-coupled-device
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinesischer Hamster Ovar
CP	Kreuzungspunkt (crossing point)
d-ATP	2`- Deoxyadenosine 5`- Triphosphat
d-CTP	2`- Deoxycytidine 5`- Triphosphat
d-GTP	2`-Deoxyguanosine 5`-Triphosphat
d-TTP	2`-Deoxythyminidine 5`-Triphosphat
Da	Dalton
DAX-1	Dosage-sensitive sex-reversal, adrenal hypoplasia congenital, X chromosome, gene 1
DCC-FCS	Dextran-Kohle beschichtetes FCS (dextran coated charcoal-FCS)
DEO	Deoxycholsäure
DEPC-H_2O	mit Diethyl-Pyrocarbonat behandeltes H_2O
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMRT	Double sex and map-3 related transcription factor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylendiamintetraacetat)

FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
GATA 4	Gata bindendes Protein 4
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GnRH	Gonadotropine releasing hormone
h	Stunde (hour)
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HRP	Meerettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
hVHF	Humane Vorhautfibroblasten
kb	Kilobase
KCL	Kaliumchlorid
kDA	Kilo Dalton
l	Liter
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie Tandemassenspektrometrie (liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
LH	Luteinisierendes Hormon
LIM	Eigenname des Erstbeschreibers
M	molar (mol/l)
mg	Milligramm (10^{-3} g)
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} l)
mM	Millimolar (10^{-3} mmol/l)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm (10^{-9} g)
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P/S	Penicillin/Streptomycin
RIN	RNA Integrity Number
RL	Relative Luziferaseeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
Sc	Scrotum
Scc	Side chain cleavage

SDR	Kurzketten- (short chain)-dehydrogenase/reduktase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF-1	Steroidogenic factor 1
SOX-9	Sex determining region Y-box 9
SRY	Sex determining region auf dem Y-Chromosom
SSW	Schwangerschaftswoche
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
v.a.	Vor allem
WT-1	Wilms-Tumor-1-Gen
z.B.	Zum Beispiel
µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
µl	Mikroliter (10^{-6} l)

1 Einleitung

Die Geschlechtsentwicklung beginnt mit der Befruchtung der Eizelle und endet mit der Geschlechtsreife in der Pubertät. In der Geschlechtsentwicklung werden unterschieden: (1) das chromosomale Geschlecht, (2) das gonodale Geschlecht, (3) das phänotypische Geschlecht und (4) das psychische Geschlecht. Alle Entwicklungsschritte unterliegen einem komplexen Kontrollmechanismus von verschiedenen Genen, Transkriptionsfaktoren, Enzymen und Hormonen. Bei einer ungestörten Geschlechtsentwicklung entsteht aus einer Eizelle mit XY-Chromosomensatz ein Junge mit sowohl gonadal männlichem Geschlecht als auch phänotypisch männlichem Geschlecht mit einer subjektiven Überzeugung, dem männlichen Geschlecht zugehörig zu sein. Eine Eizelle mit XX-Chromosomensatz führt dagegen in der Regel zu einem Mädchen mit gonadal weiblichem Geschlecht als auch phänotypisch weiblichem Geschlecht mit einer subjektiven Überzeugung, dem weiblichen Geschlecht zugehörig zu sein. Bei einer Störung in der Geschlechts-entwicklung ist eine eindeutige Zuordnung zu einer Geschlechtsform jedoch oft nicht möglich, welches für die betroffenen Personen sowohl mit physischen als auch mit psychischen Problemen verbunden sein kann.

1.1 Die männliche Geschlechtsentwicklung

Die männliche Geschlechtsentwicklung wird in Geschlechtsdeterminierung und Geschlechtsdifferenzierung untergliedert. Die Geschlechtsdeterminierung führt zur Entwicklung des Hodens aus einer indifferenten Gonade. Die Geschlechts-differenzierung bezeichnet dagegen die der Geschlechtsdeterminierung nachgeschalteten hormonabhängigen Prozesse, die zur weiteren Entwicklung des inneren und äußeren Genitals führen (Hughes 2002).
Bei der Befruchtung der Eizelle durch das Spermium findet eine Kombination der Geschlechtschromosomen statt, wodurch das chromosomale Geschlecht festgelegt wird. Dabei ist das Vorhandensein eines Y-Chromosoms für gewöhnlich mit der Entwicklung des männlichen Geschlechts verbunden (Hiort und Holterhus 2000). Zunächst sind in der frühen Embryogenese indifferente, aus dem Mesoderm abstammende Keimdrüsenanlagen vorhanden, die sich entweder in Hoden oder Ovar weiterentwickeln können. Ein erstes sichtbares

Zeichen der Differenzierung der bipotenten Gonaden zum Hoden zeigt sich in der 6-7. Woche der Embryonalentwicklung mit einer Anordnung der Sertolizellen an der Urogenitalrinne (Hiort 2000). Dieser Determinierungs-prozess wird wesentlich von dem auf dem Y-Chromosom lokalisierten SRY-Gen (sex determing-region Y-chromosom) beeinflusst (Fleming und Vilain 2005). Einen entscheidenden Beweis hierfür brachte Koopmann et al., der durch Transfer des SRY-Gens in Eizellen von Mäusen transgene männliche XX–Mäuse erzeugte. Dieses Ergebnis und die Feststellung, dass das SRY-Gen während der Embryonalentwicklung im fetalen Maushoden nur vorübergehend exprimiert wird, führten zu der Schlussfolgerung, dass das SRY-Gen die Transkription weiterer Gene bewirkt (Koopman et al. 1990; Koopman et al. 1991). Bis heute wurden verschiedene an der Hodenentwicklung beteiligte Gene identifiziert, zu denen u.a. SOX-9 (sex determining region Y-box 9) und DMRT 1 + 2 (double sex and map 3-related transcription factor 1+2) gehören (Abb.1). Unter dem Einfluss dieser Genkaskade entwickelt sich schließlich die Gonadenanlage zum Hoden und die Differenzierung des phänotypischen Geschlechts beginnt. Zunächst liegen im Embryo unabhängig vom Karyotyp sowohl die Müller- als auch die Wolff-Gänge vor (Hiort und Holterhus 2000). Bei einer ungestörten Entwicklung des Hodens wird von den Sertolizellen des Hodens Anti-Müller-Hormon (AMH) produziert, welches bei einer Bindung an seinen Rezeptor in den mesenchymalen Zellen der Müller-Derivate die Weiterentwicklung der Müller-Gänge unterdrückt (Josso et al. 2001). Die Expression von AMH wird überwiegend durch SOX-9 zusammen mit WT-1 (Wilms-Tumor-1-Gen), SF-1 (steroidogenic factor-1) und GATA-4 (gata binding protein 4 gene) kontrolliert (Abb.1) (Wilson und Davies 2007).
Ab ca. der 8. Schwangerschaftswoche (SSW) wird in den Leydigzellen des Hodens Testosteron gebildet. Die Androgensynthese wird zunächst durch das plazentare humane Choriongonadotropin (hCG) und in der späteren Entwicklung durch das luteinisierende Hormon (LH) stimuliert (Hiort und Holterhus 2000). Testosteron bewirkt eine Aufrechterhaltung und Differenzierung der Wolff-Gänge zu ductus deferens und Nebenhoden. Außerdem dient es als Vorstufe für Dihydrotestosteron (DHT), welches die weitere Entwicklung des äußeren männlichen Genitals steuert (Abb.1) (Wilson et al. 1993).

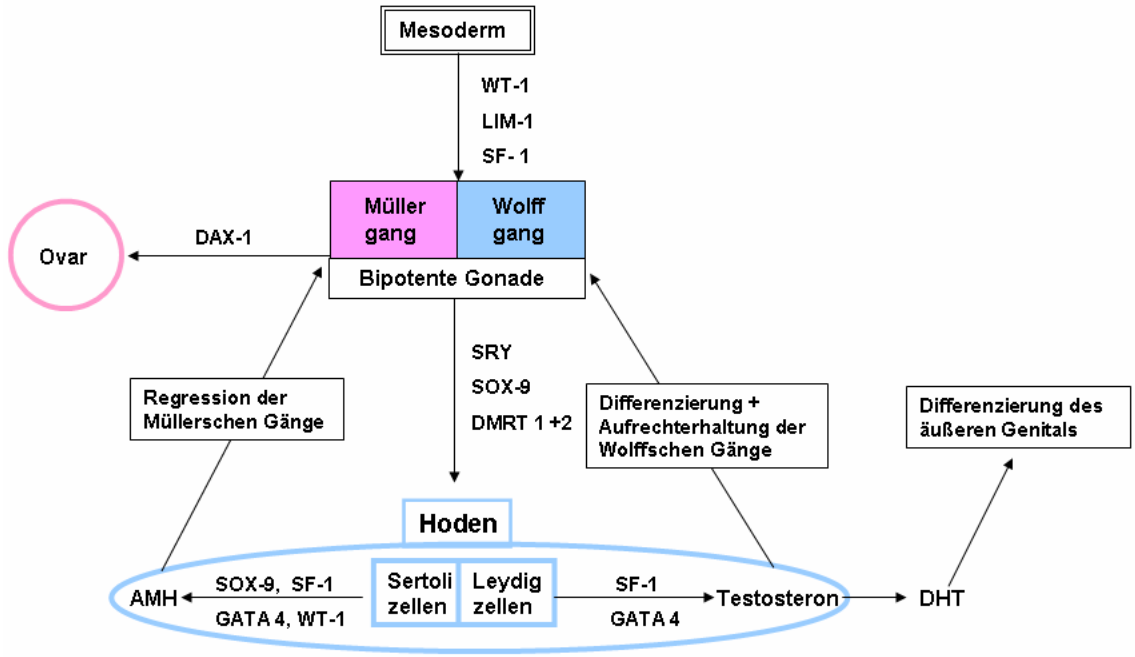


Abb. 1: Die männliche Geschlechtsentwicklung mit beteiligten Faktoren

Die Geschlechtsdeterminierung beinhaltet die Entwicklung der bipotenten Gonade aus dem Mesoderm und die weitere Differenzierung zum Hoden bzw. Ovar. Beide Vorgänge stehen unter dem Einfluss zahlreicher Faktoren, von denen hier nur eine Auswahl angegeben ist. Bei der Entwicklung der bipotenten Gonade sind v.a. WT-1, LIM-1 und das SF-1-Protein von Bedeutung. Für die nachfolgende Differenzierung in Hoden oder Ovar werden noch weitere Faktoren benötigt. Dazu gehören bei der männlichen Geschlechtsentwicklung: SRY, SOX-9 und DMRT 1 +2. Für die Differenzierung zum Ovar wird DAX-1(dosage-sensitive sex-reversal, adrenal hypoplasia congenital, X chromosome, gene 1) benötigt, welches eine Unterdrückung der AMH- Produktion bewirkt. Ab ca. der 8. SSW ist der Hoden soweit differenziert, dass eine Produktion von Hormonen stattfinden kann und damit die Geschlechts-differenzierung beginnt. Die Hormonproduktion unterliegt wiederum genetischen Einflüssen. Besonders wichtig sind hierbei die Transkriptionsregulatoren SF-1 und GATA-4. Bei Produktion einer ausreichenden Menge an AMH wird die Differenzierung der Müller-Gänge unterdrückt. Die Wolff-Gänge werden durch Testosteron zur Differenzierung angeregt. Außerdem dient Testosteron als Vorstufe für Dihydro-testosteron, welches eine Differenzierung des äußeren männlichen Genitales bewirkt (Hiort und Holterhus 2000; Fleming und Vilain 2005; Lee et al. 2007; Wilson und Davies 2007).

1.2 Die männliche Geschlechtsreife

Die Pubertät ist der Übergang von der Kindheit in die Adoleszenz. Sie ist verbunden mit physischen, emotionalen und psychologischen Veränderungen und führt schließlich zur Erlangung der Geschlechtsreife (Rogol 2002). Der Beginn der Pubertät ist gekennzeichnet durch einen Anstieg des Gonadotropin-releasing-hormon (GnRH), wodurch die Hypophyse zur vermehrten LH-Produktion stimuliert wird. Dieses Gonadotropin bewirkt wiederum eine Stimulation der Androgenproduktion im Hoden, von denen Testosteron für die Maskulinisierung die größte Bedeutung besitzt (Delemarre et al. 2008). Der

Testosteronspiegel wird durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert. Das sezernierte Testosteron hat eine hemmende Wirkung auf die GnRH-Sekretion im Hypothalamus.
Noch vor der Pubertät beginnt mit ca. 6-8 Jahren die Adrenarche, welche die vermehrte Produktion von Androgenen, v.a. Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion, in der Nebennierenrinde nach Stimulation durch das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) beschreibt. Eine Induktion der gonadalen Pubertät durch die Adrenarche ist möglich, jedoch kann auch ein unabhängiges Vorkommen stattfinden (Hiort 2002). Der Beginn der gonadalen Pubertät ist sehr variabel. Eine verspätete Pubertät bei Jungen ist definiert als das vollständige Fehlen von Zeichen der Pubertätsentwicklung im Alter von 14 Jahren (Palmert und Boepple 2001). Die normale Pubertät bei Jungen beginnt mit einer Vergrößerung von Penis und Hoden und vermehrter Testosteron-produktion. Am Ende der Pubertät produzieren die Leydigzellen ca. 6-7 mg Testosteron/Tag. Eine unbekannte Menge an Testosteron wird jedoch auch in extratestikulären Geweben produziert. Weitere physische Veränderungen in der Pubertät sind: vermehrte Schambehaarung, erhöhtes Knochen- und Muskel-wachstum, Kehlkopfwachstum und Stimmbruch, Erhöhung der Erythrozyten-masse, Hautverdickung, vermehrte Körperbehaarung und insgesamt eine Veränderung der Fettverteilung und Körperform (Hiort 2002). Die Einteilung der Pubertätsstadien wird nach Tanner anhand äußerer Geschlechtsmerkmale, wie Hodenvolumen und Schambeharrung, vorgenommen (Abb.2).

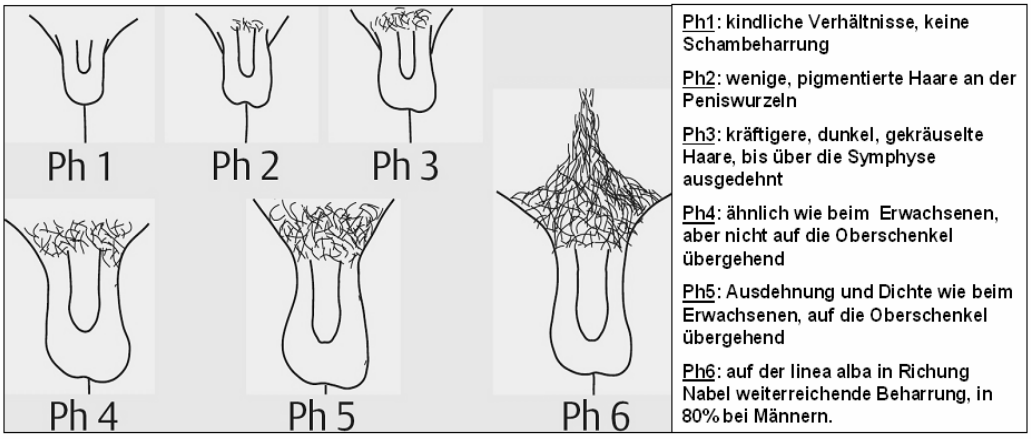


Abb.2: Männliche Pubertätsstadien nach Tanner (Schambeharrung)

Dargestellt sind die männlichen Pubertätsstadien nach Tanner. Neben der Beurteilung der Schambeharrung, wie oben sichtbar, werden bei Jungen auch die Hodenvolumina für die Beurteilung des pubertären Entwicklungsstadiums genutzt (Abb. modifiziert nach G. Neuhäuser, 2002).

1.3 Die Sexualsteroidbiosynthese

Für die männliche Geschlechtsentwicklung und zur Erlangung der Geschlechtsreife ist die Synthese von Androgenen erforderlich, die durch die Sexualsteroidbiosynthese bereitgestellt werden. Die Androgenproduktion bei Jungen findet überwiegend im Hoden statt, jedoch wurde auch in verschiedenen anderen androgenabhängigen Geweben eine mRNA-Expression von Enzymen der Sexualsteroidbiosynthese nachgewiesen (Hoppe et al. 2007). Der erste Schritt der Sexualsteroidbiosynthese, der in der Synthese aller Steroidhormone gleich ist (Glukokortikoide, Mineralkortikoide, Östrogene und Androgene), ist die Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon (Abb.3). Die Pregnenolonsynthese wird durch das Enzym P450 side chain cleavage (P450scc) in den Mitochondrien katalysiert. Ein Transport des Cholesterols in die Mitochondrien erfolgt durch das Steroidogenic Acute Regulatory (StAR)-Protein (Miller 2002). Pregnenolon dient als Substrat für zwei weitere Enzyme. In Nagetieren wird der Weg zum Testosteron überwiegend über die 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase (3β-HSD) zu Progesteron fortgesetzt, während im Menschen und höheren Primaten überwiegend eine Umwandlung in 17-Hydroxypregnenolon durch die P450c17 geschieht (Wilson und Davies 2007). Dieses Enzym vereinigt zwei Aktivitäten in sich und kann als 17α-Hydroxylase und als 17/20-Lyase fungieren. Dies wird dadurch deutlich, dass bei einer Mutation im kodierenden Gen beide Enzymaktivitäten ausfallen (Lin et al. 1991). Somit wird die Sexualsteroidbiosynthese qualitativ durch die Substratauswahl des P450c17-Enzyms kontrolliert, während eine quantitative Begrenzung durch das StAR-Protein stattfindet (Miller 2002).
Die 17α-Hydroxylase katalysiert die Reaktion von Pregnenolon zu 17-OH Pregnenolon und von Progesteron zu 17-OH Progesteron. In Anwesenheit der 17/20-Lyase wird 17-OH Pregnenolon in DHEA und 17-OH Progesteron in Androstendion umgewandelt. Ein weiteres wichtiges Enzym der Steroidbiosynthese ist die 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase (HSD), welche zwei Isoenzyme besitzt. Typ 1 befindet sich v.a. in der Plazenta und peripheren Geweben, während Typ 2 v.a. in Nebennieren, Eierstöcken und Hoden exprimiert wird. Die Isoenzyme katalysieren die Reaktionen von Pregnenolon zu Progesteron, von 17-OH Pregnenolon zu 17-OH Progesteron, von DHEA zu

Androstendion und von Androstendiol zu Testosteron (Simard et al. 2005). Für die Prä-Rezeptor-Regulation der Sexualsteroidbiosynthese sind schließlich verschiedene Isoenzyme der 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase (17β-HSD) - Super-Familie und der 5α-Reduktase verantwortlich (Abb.3).

Die 17β-HSD 3 katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Androstendion zu Testosteron und wird als Schlüsselenzym der Testosteronsynthese gesehen. Das Enzym ist v.a. in den Leydigzellen des Hodens vorhanden. Es konnte aber auch eine geringe Expression der 17β-HSD 3 in weiteren Geweben nachgewiesen werden, wie z.B. in Fettgewebe, Knochen, Blut und Genitalhaut (Moghrabi und Andersson 1998; Janssen et al. 1999; Hoppe et al. 2006).

Die 17β-HSD 3 besitzt auch eine geringe Affinität zu anderen Sexualsteroiden und kann die Umwandlung von Östron in Östradiol und von DHEA in Androstendion katalysieren.

Neben der 17β-HSD 3 kann die Testosteronsynthese noch durch ein weiteres Enzym der 17β-HSD-Superfamilie katalysiert werden: die 17β-HSD 5. Diese Isoform ist zwar wie die 17β-HSD 3 auch in den Leydig-Zellen des Hodens nachweisbar, jedoch auch in zahlreichen anderen peripheren Geweben, wie z.B. Niere, Leber, Blut, Genitalhaut, Skrotalhaut, Prostata, Endometrium und Brustdrüsengewebe (Dufort et al. 1999; Pelletier et al. 1999; Luu-The 2001; Blouin et al. 2003; Hoppe et al. 2006; Qin et al. 2006). Aufgrund eines Vorkommens im Ovar wird postuliert, dass die 17β-HSD 5 für die Testosteron-produktion bei Frauen verantwortlich ist (Luu-The et al. 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Unterdrückung der 17β-HSD 5-Expression durch spezifische siRNA in der Nebenniere zu einer verminderten Testosteronsynthese führt. Dies unterstützt die Hypothese, dass die 17β-HSD 5 für die Testosteronsynthese in peripheren Geweben verantwortlich ist (Nakamura et al. 2009). Neben der Testosteronsynthese katalysiert die 17β-HSD 5 auch noch zusätzliche Reaktionen als 3α-HSD, 20α-HSD, Dehydrodiol-Dehydrogenase und Prostaglandin-Synthase (Penning et al. 2001; Lukacik et al. 2006).

Das entstandene Testosteron wird schließlich durch die 5α-Reduktase in DHT umgewandelt. Die 5α-Reduktase besitzt zwei Isoenzyme. Die 5α-Reduktase Typ 1 wird überwiegend in Haut, Kopfhaut und Genitalhaut exprimiert, während die 5α-Reduktase Typ 2 überwiegend in Genitalhaut und männlichen

Anhangsdrüsen, v.a. der Prostata vorkommt (Thigpen et al. 1993). Die 5α-Reduktase Typ 2 ist von Bedeutung für die Virilisierung des äußeren männlichen Genitals und für das Wachstum des Phallus während der Fetalzeit (Kim et al. 2002). Weiterhin findet sich eine starke Expression des Typ 2-Isoenzyms im Säuglings- und Kindesalter. Während der Pubertät und im Erwachsenenalter kommt es aber zu einer Herabregulation der Expression (Hellwinkel et al. 2000). Mutationen im korrespondierenden Gen SRD5A2 können zum 5α-Reduktase-Mangel führen. Bei den betroffenen XY-Individuen kommt es zu einer Störung in der Entwicklung der äußeren männlichen Geschlechtsorgane. In der Pubertät findet häufig eine Maskulinisierung statt (Wilson et al. 1993). Es wird postuliert, dass die 5α-Reduktase-Typ 1, die im Gegensatz zu dem Typ 2-Isoenzym altersunabhängig in der Genitalhaut exprimiert wird, ab der Pubertät hauptsächlich für die DHT-Synthese verantwortlich ist. Die kontinuierliche Expression in der Genitalhaut könnte die Maskulinisierung in der Pubertät bei 5α-Reduktase-Mangel Patienten bewirken (Thiele et al. 2005).

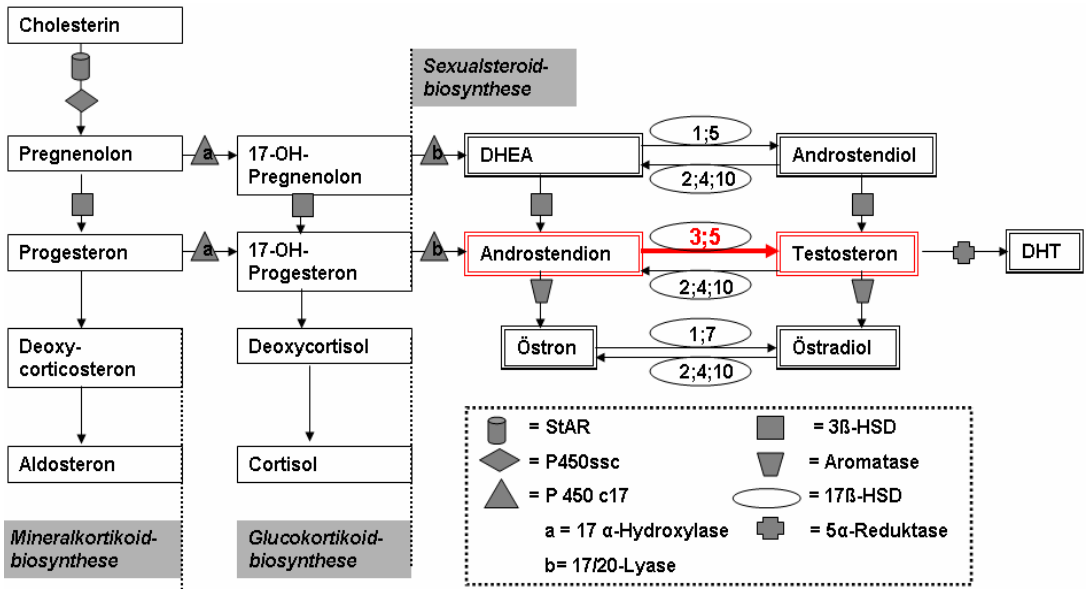


Abb. 3: Darstellung der Steroidbiosynthese mit beteiligten Enzymen

Cholesterin und Pregnenolon sind gemeinsame Substrate für die Mineralkortikoid-, Glucokortikoid- und Sexualsteroidbiosynthese. Die Synthese der Steroidhormone wird durch verschiedene Enzyme katalysiert, die in der Zeichnung mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet sind. Eine Erklärung der Symbole befindet sich in der Legende.

1.4 Die 17β-Hydroxysteroiddehydrogenasen und Intrakrinologie

Die 17β-HSDs sind involviert in der Aktivierung und Deaktivierung von Steroidhormonen. Sie katalysieren die Umwandlung von 17-Ketosteroiden, wie z.B. Androstendion und Östron, in ihre potenteren 17-Hydroxysteroid Formen, wie z.B. Testosteron und Östradiol (Mindnich et al. 2004). Hierbei handelt es sich um Redox-Reaktionen. Die bevorzugte Katalysationsrichtung ist abhängig von den vorhanden Kofaktoren: für die Reduktion wird NADPH benötigt, für die Oxidation NAD^+ (Penning 2003). In intakten Zellkulturen katalysieren die Enzyme die Reaktionen in unidirektionaler Richtung: Typ 1,3,5 und 7 die Reduktion und Typ 2,4,6 8,9,10,11 und 14 die Oxidation (Abb.3). Bisher wurden 14 verschiedene Isoenzyme in Säugetieren gefunden, von denen mindestens 11 auch im Menschen exprimiert werden (Lukacik et al. 2006; Moeller und Adamski 2006). Die Expression der Isoformen Typ 6 und 9 konnte bisher nur in Nagetieren nachgewiesen werden (Moeller und Adamski 2006). Die chronologische Nummerierung basiert auf dem Zeitpunkt der ersten Klonierung der einzelnen Isoenzyme (Peltoketo et al. 1999). Mit Ausnahme der 17β-HSD 5, welche zur Familie der Aldo-Keto-Reduktasen (AKR) gehört, sind alle anderen Isoenzyme der Familie der Kurze-Ketten-Dehydrogenasen (short-chain-deydrogenase/reductase= SDR) zugehörig (Moeller und Adamski 2006). Neben ihrer Aktivität im Steroidmetabolismus katalysiert die Mehrzahl der 17β-HSD-Isoenzyme weitere Reaktionen im Retinoid- oder Fettsäurestoffwechsel. Die 17β-HSD Typ 1-3 scheinen jedoch nur Reaktionen an Steroidsubstraten zu katalysieren (Adamski und Jakob 2001; Lukacik et al. 2006; Moeller und Adamski 2006). Die 17β-HSD Enzyme unterscheiden sich nicht nur in ihren katalytischen- und Kofaktorpräferenzen sondern auch in ihrer Gewebs- und subzellulären Lokalisation (Adamski und Jakob 2001). Die mRNA verschiedener Isoformen der 17β-HSD-Superfamilie wurde bisher in folgenden Geweben nachgewiesen: Plazenta (Moghrabi et al. 1997), Ovar (Nelson et al. 1999), Hoden (Geissler et al. 1994), Hodenhaut (Hoppe et al. 2006), Vorhaut (Theintz et al. 1989), Endometrium (Casey et al. 1994), Gehirn (Steckelbroeck et al. 1999), Lunge (Provost et al. 2002), Niere (Quinkler et al. 2003), Leber (Moghrabi et al. 1997), Gastrointestinal-Trakt (Magen, Duodenum, Ileum, Colon, Rectum) (Sano et al. 2001), Fettgewebe (Blouin et al. 2003), Haut

(Fritsch et al. 2001), Haare (Ando et al. 1999) und Blut (Hoppe et al. 2006). Eine weitere Expression findet sich in Prostata und Brustgewebe, wo das verminderte bzw. vermehrte Vorkommen, v.a. der Isoenzyme 1 und 2, im Zusammenhang mit der Entwicklung von Tumoren stehen soll (Vihko et al. 2002).

Die Expression der 17β-HSD Isoenzyme und anderer Enzyme der Steroidbiosynthese in unterschiedlichen Geweben lässt auf eine gewebsspezifische Synthese von Sexualhormonen schließen, welche je nach Bedarf genutzt werden kann (Hoppe et al. 2006; Moeller und Adamski 2006). Von C. Labrie wurde 1988 der Terminus Intrakrinologie für diese lokale gewebsspezifische Steroidhormonbiosynthese eingeführt (Labrie et al. 1988). Intrakrinologie ist dabei definiert als das Vermögen peripherer Zellen, ihre eigenen Hormone aus Vorstufen von steroidalen Hormonen zu produzieren. Die Wirkung dieser Sexualhormone beschränkt sich auf die produzierende Zelle und es sind keine endokrinen, exokrinen oder parakrinen Mechanismen vorhanden (Labrie 1991). Die Synthese der Sexualhormone geschieht in den peripheren Geweben wahrscheinlich nicht direkt aus Cholesterol, sondern aus DHEA oder DHEA-Sulfat (DHEA-S), welche zuvor von der Nebenniere produziert und in die Blutbahn gebracht wurden. Für diese Hypothese spricht, dass die DHEA bzw. DHEA-S Konzentrationen in Männern 100-500 mal höher sind als diejenige von Testosteron, in Frauen sogar 1000-10000 mal höher als diejenige von Östrogenen (Labrie et al. 2000).

1.5 Wirkungen der Androgene

Zu den virilisierenden Androgenen gehören Testosteron und DHT, die in den Leydigzellen des Hodens ab ca. der 8. Woche der Embryonalentwicklung exprimiert werden. Die Bedeutung dieser Androgene für die Entwicklung des männlichen Genitals wurde von A. Jost durch Kastration von XX- und XY-Kaninchen vor dem Beginn der Sexualdifferenzierung verdeutlicht (Jost et al. 1953). Nach der Gonadenentfernung entwickelten sowohl die XX- als auch die XY-Kaninchen ein phänotypisch weibliches Genital. Ein männlicher Phänotyp konnte jedoch durch eine Reimplantation des Hodens wiederhergestellt werden. Die molekulare Wirkung der Androgene wird über den Androgenrezeptor (AR) vermittelt. Dieser gehört zu der Familie der nuklearen Rezeptoren und ist ein

Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor. Der AR liegt ohne Ligandenbindung an Hitze-Schock-Proteine gebunden im Zytoplasma der Zelle vor. Bei einer Bindung von Androgenen findet eine weitere Phosphorilisierung, Konformationsänderung und ein Transfer des AR in den Zellkern statt. Dort kann der AR unter Einfluss von Koaktivatoren an palindromische DNA-Sequenzen binden und die Transkription von Zielgenen beeinflussen (Hiort 2000). Somit werden extrazelluläre Signale in intrazelluläre Antworten umgesetzt (Gobinet et al. 2002).

Die beiden virilisierenden Androgene zeigen unterschiedliche Wirkungen in der männlichen Geschlechtsentwicklung. Testosteron bewirkt die Ausbildung des inneren männlichen Genitals, indem es zwischen der 9.-13. Woche der Fetalentwicklung die Wolff-Gänge zur Differenzierung anregt. Der proximale Teil formt den Nebenhoden, wogegen aus dem distalen Teil die Samenleiter entstehen. Die Bläschendrüsen werden aus späteren Auswachsungen am unteren Ende des Samenleiters gebildet. Testosteron dient jedoch nicht nur der Differenzierung sondern auch der Aufrechterhaltung der Wolff-Gänge (Hannema und Hughes 2007). Es wird vermutet, dass das Testosteron direkt in die Wolff-Gänge sezerniert und dort aktiv transportiert wird. Somit lägen in den Wolff-Gängen hohe Testosteronkonzentrationen vor (Tong et al. 1996). Testosteron dient zusätzlich als Substrat für die Synthese von DHT. DHT induziert die Entwicklung der Urethra und der Prostata aus dem Urogenital-sinus. Außerdem bewirkt es in den Genitalhöckern, -schwellungen und -falten eine Mittellinienfusion und eine Verlängerung und Vergrößerung, wodurch schließlich Skrotum und Penis entstehen (Wilson et al. 1993). Es wird vermutet, dass neben den Androgenen auch Androgenvorstufen, wie DHEA und Androstendion, in der männlichen Geschlechtsentwicklung von Bedeutung sind. Die Transaktivierungskapazität der Androgene und Androgenvorstufen wurde in verschiedenen Studien der eigenen Arbeitsgruppe *in-vitro* getestet (Holterhus et al. 2002; Werner et al. 2006). Hierzu wurden künstliche AR-Zielgenmodelle in chinesische-Hamster-Ovar (CHO)-Zellen transfiziert und die Transaktivierungskapazität des AR an androgenresponsiven Promotern bei steigenden Konzentrationen von Androgenen gemessen. Dabei zeigte sich, dass durch Androstendion eine Aktivierung des ARs möglich ist, welcher wiederum an die androgenresponsiven Elemente (ARE) des Zielgens binden

und dessen Transkription bewirken kann. So war bei einer Hormonkonzentration von 1 nM eine Transaktivierungskapazität der ARE von 40 % bei Androstendion (Abb.4), von 70 % bei Testosteron und von 90 % bei DHT sichtbar. Bei einer Hormonkonzentration von 10 nM ist bei Androstendion eine Transaktivierungskapazität von 80 % und bei Testosteron und DHT von 100 % (Holterhus, Piefke et al. 2002) vorhanden. Dadurch wird deutlich, dass Androstendion unter *in-vitro* Bedingungen bei Konzentrationen über 10 nM eine ähnliche Transaktivierungskapazität wie die virilisierenden Androgene zeigt. Bisher konnte jedoch klinisch bei oraler Androstendiongabe keine anabole Wirkung nachgewiesen werden (Rasmussen et al. 2000).

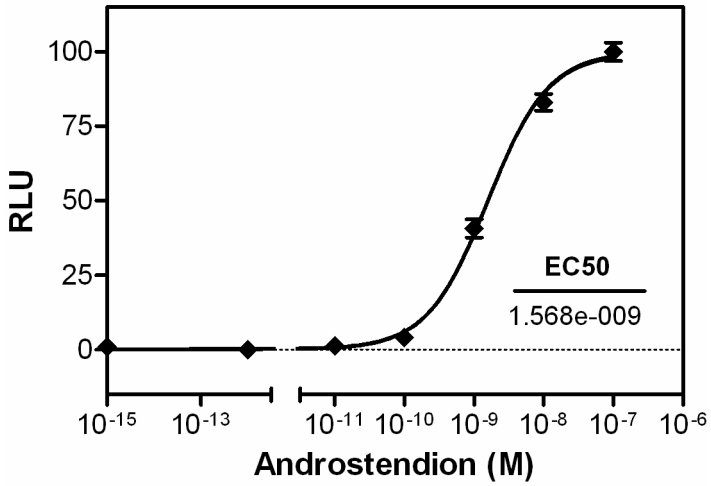


Abb. 4: Dosis-Antwort-Kurve von Androstendion am $(ARE)_2$-TATA-Luc-Promoter in CHO Zellen

Dargestellt ist die Transaktivierungskapazität des AR an einem ARE in Antwort auf steigende Androstendionkonzentrationen. Ab einer Konzentration von 10e-10 ist ein exponentieller Anstieg der Transaktivierungskapazität sichtbar. Bei einer Konzentration von 1,568e-009 ist eine 50%ige Transaktivierung vorhanden. RLU= relative Luziferaseeinheiten (Abb. modifiziert nach J. Schütt, 2009)

1.6 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase 3-Mangel

Der 17β-HSD 3-Mangel ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Störung der Sexualentwicklung, die nur XY-Individuen betrifft. Sie beruht auf Mutationen im 17β-HSD 3 Gen und führt zu schweren Virilisierungsstörungen bei Geburt (Geissler et al. 1994). Die Inzidenz des 17β-HSD 3-Mangels variiert zwischen den einzelnen Populationen weltweit. Das Vorkommen von 17β-HSD 3-Mangel Patienten wurde bisher in Asien, Amerika, Australien und Europa beschrieben, wobei in Europa eine eher geringe Inzidenz vorhanden ist. So wurde in den Niederlanden eine minimale Inzidenz von 1:147000 Geburten beschrieben

(Boehmer et al. 1999). Die höchste Inzidenz ist im Gazastreifen vorhanden mit einer Häufigkeit von 1:150 (Rosler et al. 1996).

1.6.1 Klinische Befunde

Betroffene Patienten haben eine Ausbildung von hypoplastisch-normalen inneren männlichen Geschlechtsorganen, welche den Wolff-Gängen abstammen (Nebenhoden, Samenleiter und Samenbläschen). Es ist eine blind endende Vagina und keine Ausbildung von inneren weiblichen Geschlechtsorganen vorhanden. Das äußere Genitale der 17β-HSD 3 Patienten ist bei Geburt jedoch meist weiblich, weswegen die XY-Kinder häufig als Mädchen aufgezogen werden. Eine Diagnose des 17β-HSD 3-Mangels findet dann oft erst in der Pubertät statt, wenn die Patienten Maskulinisierungserscheinungen unterschiedlicher Ausprägung zeigen (Geissler et al. 1994; Andersson 1995; Mendonca et al. 2000; Lee et al. 2007; Faienza et al. 2008). Jedoch werden einige Patienten schon vorher durch das Auftreten von Leistenhernien auffällig. Bei einem operativen Eingriff der Leistenhernien werden die Hoden gefunden (Moghrabi et al. 1998; Boehmer et al. 1999; Lindqvist et al. 2001; Lee et al. 2007). Die Maskulinisierung in der Pubertät kann beinhalten: Entwicklung einer männlichen Körperform und Muskelmasse, vermehrte Behaarung, Vertiefung der Stimme, Akne, Vergrößerung der Klitoris und Erhöhung des Hodenvolumens (Andersson 1995; Bertelloni et al. 2009 a und b; Moghrabi et al. 1998; Mendonca et al. 2000; Twesten et al. 2000; Lee et al. 2007; Mains et al. 2008).

1.6.2 Endokrinologische Befunde

Aufgrund einer Mutation im 17β-HSD 3-Gen kann durch die 17β-HSD 3 kein, bzw. nur in geringerem Maße, Testosteron hergestellt werden. Das Substrat der 17β-HSD 3, Androstendion, liegt somit in einer erhöhten Konzentration vor. Als Hauptkriterium für die Diagnose des 17β-HSD 3-Mangels wird die Bildung der Testosteron:Androstendion-Rate nach hCG-Test gesehen (Boehmer et al. 1999; Faisal Ahmed et al. 2000; Lee et al. 2007; Bertelloni et al. 2009a). Bei einer Ratio unter 1,0 liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein 17β-HSD 3 Mangel vor (Twesten et al. 2000; Bertelloni et al. 2009 a).

Weitere Parameter für die molekularendokrinologische Diagnostik des 17β-HSD 3-Mangels sind: ein verminderter Anstieg des Testosterons nach hCG-Test und eine Erhöhung von Gonadotropinen, v.a. LH (Andersson 1995; Boehmer et al. 1999; Twesten et al. 2000; Lee et al. 2007).

1.6.3 Genetische Befunde

Das 17β-HSD 3 kodierende Gen ist mit 60 kb eher groß, besitzt 11 Exons und ist auf Chromosom 9q22 lokalisiert. Bis zum Jahr 2009 wurden 26 verschiedene Mutationen im 17β-HSD 3 Gen nachgewiesen mit vermehrter Häufung in Exon 3, 8, 9 und 10 (Faienza et al. 2008). Bei den meisten Mutationen handelt es sich um inaktivierende Mutationen, welche für ein nicht funktionsfähiges 17β-HSD 3 Enzym kodieren. Eine Ausnahme hiervon bildet die Mutation R80Q, die zu einem Enzym führt, welches noch eine geringe Restaktivität gegenüber dem Wildtyp aufweist (McKeever et al. 2002). Diese Mutation ist v.a. im Gazastreifen verbreitet. In Europa ist dagegen mit erhöhter Frequenz die Mutation 325+4 A→T vorhanden (Boehmer et al. 1999). Hierbei handelt es sich um eine Missense-Mutation, die sich 4 Nukleotide stromabwärts der Grenze Exon/ Intron 3 im Intron 3 befindet. Durch den Basenaustausch von Adenin durch Thymin wird die Spleißstelle verändert. Dies führt zu einem funktionsunfähigen 17β-HSD 3 Enzym (Andersson 1995; Boehmer et al. 1999; Twesten et al. 2000).

1.7 Fragestellung

Als Schlüsselenzym in der männlichen Testosteronsynthese wird das 17β-HSD 3 Enzym angesehen, welches die Reduktion von Androstendion zu Testosteron katalysiert. In der Geschlechtsentwicklung sind sowohl die Differenzierung des inneren männlichen Genitals in der Fetalentwicklung als auch die Maskulinisierung in der Pubertät testosteronabhängige Prozesse. Trotz eines defekten 17β-HSD 3 Enzyms liegen bei Patienten mit 17β-HSD 3-Mangel die Testosteronwerte im Serum teilweise im Normbereich normaler Männer (Mendonca et al. 2000). Als Begründung für die Maskulinisierung der Patienten in der Pubertät wird angenommen, dass in androgenabhängigen peripheren Geweben Testosteron durch ein anderes Enzym der

Sexualsteroidbiosynthese synthetisiert wird (Andersson 1995; Boehmer et al. 1999; Dufort et al. 1999; Adamski und Jakob 2001; Luu-The et al. 2001; Lee et al. 2007). Hierfür kommt v.a. die 17β-HSD 5 in Frage, die dieselbe Reaktion wie die defekte 17β-HSD 3 katalysiert. Eine intrakrine Testosteronsynthese in androgenabhängigen Geweben durch das 17β-HSD 5 Enzym wurde bisher noch nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit soll deswegen *in-vitro* untersucht werden, ob in der Genitalhaut von 17β-HSD 3 Patienten eine Testosteronsynthese stattfindet. Dazu sollen folgende Aspekte geklärt werden:

- Wird die 17β-HSD 5 in der Genitalhaut von Patienten mit 17β-HSD 3-Mangel exprimiert?
- Zeigt sich eine Induktion der 17β-HSD 5 nach Inkubation mit Androstendion ?
- Findet eine Synthese von potenten Androgenen in der Genitalhaut statt?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten Materialen mit Angabe des jeweiligen Herstellers sind im Anhang zu finden (siehe 7.1). Dort ist auch die Herstellung der selbst hergestellten Puffer, Lösungen und Gele näher beschrieben (siehe 7.2).

2.1.1 Zellen

2.1.1.1 Genitalhautfibroblasten und skrotale Fibroblasten

Zur Klärung der Fragestellung wurden Genitalhautfibroblasten von Patienten mit 17β-HSD 3-Mangel untersucht. Als Einschlusskriterien für die Auswahl der Zelllinien wurden definiert, dass eine inaktivierende Mutation des 17β-HSD 3-Gens vorliegt und dass alle untersuchten Zelllinien der Genitalhaut entstammten. Trotz dieser strengen Einschlusskriterien war es uns möglich, drei Patientenzelllinien aus dem Zellkulturenbestand der Arbeitsgruppe für die Untersuchungen zu verwenden (Tab.1).

Zelllinie	Alter bei Gewebe-entnahme	Karyo typ	Geschlechts-zuweisung bei Geburt	Mutation	Grund für die Konsultation
ARD 111	10 Jahre	46 XY	Weiblich	Homozygot 325+4 A→T	Herniotomie mit Fund von Leistenhoden, geringe Maskulinisierung
ARD 1318	18 6/12 Jahre	46 XY	Weiblich	Homozygot 325+4 A→T	Amenorrhoe und geringe Maskulinisierung
ARD 1373	13 4/12 Jahre	46 XY	Weiblich	Homozygot 325+4 A→T	Starke Maskulinisierung in Pubertät

Tab. 1: Angaben zu den untersuchten Zelllinien der 17β-HSD 3-Mangel Patienten

Bei allen Patienten lag die Mutation 325+4 A→T vor, die zu einem kompletten Funktionsverlust des 17 β-HSD 3-Enzyms führt. Sie zeigten bei Geburt ein weibliches äußeres Genital und im pubertären Alter Maskulinisierungserscheinungen unterschiedlicher Ausprägung. Alle untersuchten Zellproben entstammten der Genitalhaut.

Da Fibroblasten mit Herkunft aus unterschiedlichen topographischen Lokalisationen verschiedene Genexpressionsprogramme zeigen, sollten als Normalkontrollen Zellen verwendet werden, die der topographischen

Lokalisation der Patientenzellen entsprechen. Skrotalzellen und Labia majora Zellen stammen von homologen embryonalen Strukturen ab (Holterhus et al. 2007). Deswegen wurden skrotale Fibroblasten, die aus medizinisch indizierten Operationen stammten, als Normalkontrollen ausgewählt (Tab. 2). Da in dieser Arbeit speziell eine mögliche Testosteronsynthese durch die 17β-HSD 5 untersucht werden soll, war ein weiteres Einschlusskriterium für die Normalkontrollenzelllinien, dass nur eine geringe Expression der 17β-HSD 3 in den ausgewählten Normalkontrollen stattfindet. In einer Untersuchung der mRNA-Transkription verschiedener Enzyme der 17β-HSD-Super-Familie wurde von Hoppe et al. gezeigt, dass die 17β-HSD 3 in Skrotalhautfibroblasten nur minimal exprimiert wird. Die Expression dieses Isoenzyms ist um ca. das Achtfache geringer als die Expression der 17β-HSD 5 in dieser Lokalisation (Hoppe et al. 2006).

Zelllinie	**Alter**
Scrotum 3	13
Scrotum 9	34
Scrotum 12	9

Tab. 2: Altersangaben der untersuchten Normalkontrollzelllinien

Alle untersuchten Normalkontrollzelllinien entstammen der Skrotalhaut und wurden bei medizinisch indizierten Operationen in unterschiedlichem Alter gewonnen.

Die Untersuchung aller ausgewählten Zelllinien ist durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck geprüft und genehmigt worden (Ethikantragnummer: 01-066).

2.1.1.2 CHO-Zellen

Für die Messung der androgenen Aktivierungskapazität mittels Reportergenassay wurden CHO-Zellen der Zelllinie K1 verwendet. Diese Zelllinie ist ein Subklon einer Zelllinie, die 1957 bei einer Ovar-Biopsie eines erwachsenen chinesischen Hamsters in Holland gewonnen wurde. Die Zellen wachsen adhärent und zeigen eine hohe Teilungsrate, so dass schon nach 24 h eine Verdopplung erreicht werden kann. Bei einer Atmosphäre von 37 ℃ mit 5 % CO_2 vermehren sich die CHO-Zellen unter einfachen Kulturbedingungen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und verwendete Kulturmedien

Alle Versuche mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter der Zellkulturbank durchgeführt. Die Kultivierung der Fibroblasten fand bei einer Atmosphäre von 37 °C und 5 % CO_2 mit Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Phenolrot statt. Dieses Kulturmedium war versetzt mit dem Nährstoffmix F12, 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % der Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (0,1 mg/ml). Für die Inkubationsversuche war die Verwendung von steroidfreiem FCS (DCC-FCS= dextran-coated-charcoal FCS) nötig. Dazu wurde das FCS mit Aktivkohle und Dextran behandelt, um eventuelle Verunreinigungen des FCS mit Hormonen zu adsorbieren. Für die Herstellung des DCC-FCS wurden 0,5 g Dextran mit 5 g Aktivkohle bei 4 °C in 200 ml 10 nM Tris-HCl über N acht unter stetigem Rühren inkubiert. Bei diesem Vorgang adsorbierte die Aktivkohle das Dextran. Am nächsten Tag wurde die Suspension in 4 x 50 ml Röhrchen aliquotiert, bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden je zwei Kohle-Pellets mit 500 ml FCS resuspendiert und die Mischung für 2 h bei 0 °C langsam gerührt. Bei diesem Vorgang wurden durch die mit Dextran umhüllte Aktivkohle hormonelle Bestandteile des FCS adsorbiert. Dieser Vorgang wurde mit den übrigen zwei Kohle-Pellets wiederholt. Nach Absaugen der Kohle durch einen Filter wurde das nun steroidfreie FCS dreimal steril filtriert und in 50 ml Aliquots bei -18 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (ge naue Zusammensetzung siehe 7.2; Tab. 8).

2.2.1.1 Auftauen der Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden in einem Kryoröhrchen mit Einfriermedium (Medium versetzt mit 10 % Dimethylsulfoxid= DMSO) in flüssigem Stickstoff gelagert und anschließend in einem auf 37 °C erwärmtem Wasserbad aufgetaut. Nach dem Auftauen konnte unter der Sterilbank das Zellpellet resuspendiert und die Fibroblasten in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und für 10 min bei 1000-1500 rpm zentrifugiert werden. Dann wurde der Überstand aspiriert und das Zellpellet erneut in 10 ml Medium aufgenommen. Nach einer zweimaligen Wiederholung des Waschvorganges wurden schließlich die Zellen gezählt und für jede Zelllinie ca. 25 x 10^5 Zellen in eine 175 cm^2 Flasche mit 25 ml

Kulturmedium gegeben. Wenn ein aufgetautes Aliquot mehr als die benötigte Zellmenge enthielt, wurden auch die nicht für den Versuch benötigten Zellen angezogen und später für erneute Versuche eingefroren.

2.2.1.2 Kultur und Inkubation der Zellen

Die Inkubation der Fibroblasten fand bei einer Atmosphäre von 5 % CO_2 in einem Brutschrank statt. Das Wechseln des Mediums erfolgte dreimal wöchentlich und pro Fütterung bekamen die Fibroblasten 25 ml des Kulturmediums in die 175 cm^2 Flaschen.

2.2.1.3 Passagierung (Trypsinierung) und Verteilung auf 6-Loch-Platten

Die Fibroblasten wurden bis zu einer ca. 90 %igen Konfluenz in 175 cm^2 Flaschen angezogen und dann auf 6-Loch-Platten verteilt. Dazu wurde zunächst das Medium aspiriert und die Zellen mit 1x phosphatgepufferter Salzlösung (phosphat buffered saline= PBS:136 mM NaCl; 2,64 mM Na_2HPO_4; 2,64 mM KCl; 1,14 mM KH_2PO_4; pH 7,4) gewaschen. Die Zellen wurden dann trypsiniert, vom Boden der Flasche gelöst und abschließend in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und bei ca. 1000-1500 rpm zentrifugiert. Dieser Waschvorgang erfolgte zweimal, um dann die Zellen erneut in 10 ml Medium aufzunehmen und auf die 6-Loch-Platten zu verteilen. Vor der endgültigen Verteilung auf die 6-Loch-Platten wurden die Zellen noch einmal gezählt und pro Vertiefung 200000 Zellen ausgesät. Nach jeder Trypsinierung befanden sich die Fibroblasten in einer höheren Passage.

2.2.1.4 Inkubation mit Androstendion

Die Fibroblasten wurden in den 6-Loch-Platten bis zur 90 %igen Konfluenz angezogen; dann fand die Hormonzugabe statt. Die Fütterung wurde mit steroidfreiem Medium durchgeführt, um die Messergebnisse der Inkubation nicht durch Steroide im Kulturmedium zu beeinflussen. Für die Inkubation wurde das Androstendion mit DCC-FCS auf 10 nM verdünnt, so dass schließlich eine Inkubation mit 10 nM Androstendion stattfand. Dies entspricht etwa der Serumkonzentration eines erwachsenen Mannes nach hCG-Stimulation (Mendonca et al. 2000). Bei einer Konfluenz von 90 % wurden die 6-Loch-Platten mehrmals mit PBS gewaschen. Dann sind zu jeder Vertiefung

2 ml der DCC-FCS/Androstendion Mischung gegeben worden. Schließlich wurde von jeder Zelllinie zum Zeitpunkt 0 h, 48 h und 96 h aus zwei Vertiefungen RNA isoliert, aus zwei Vertiefungen Proteinlysat hergestellt und aus zwei Vertiefungen Zellen geschabt. Außerdem wurden aus allen 6-Loch-Platten Überstände abgenommen.
Zusätzlich zu den Inkubationsversuchen mit physiologischer Androstendion-konzentration wurde ein Inkubationsexperiment mit supraphysiologischer Androstendionkonzentration durchgeführt. Für diesen Inkubationsversuch wurden die Patientenzelllinien mit 700 nM Androstendion inkubiert und zu 0 h, 48 h und 96 h der Mediumüberstand isoliert. Es fand keine Isolierung von Proteinen und Zellen statt. In diesem zusätzlichen Experiment sollte untersucht werden, ob eine mögliche Testosteronsynthese durch einen höheren Substratdruck vermehrt angeregt wird.

2.2.1.5 Abnahme von Zellen und Überstand

Aus jeder Vertiefung wurden jeweils 2 ml Überstand abgenommen und bei - 80 ℃ eingefroren. Außerdem sind in jeweils zwei Vertiefungen pro Zeitpunkt und pro Zelllinie die Zellen mit PBS geschabt und auch eingefroren worden. Ein Teil des Überstandes und der Zellen wurde zur Hormonbestimmung zu unseren Kooperationspartnern A.E. Kulle, F.G. Riepe, P.M. Holterhus nach Kiel und S. Wudy nach Gießen geschickt (Adressenverzeichnis siehe 7.5). Dort wurde mittels massenspekrometrischen Messungen der abgenommene Überstand auf Androgene extrazellulär und die Zellen auf Androgene intrazellulär untersucht, die möglicherweise an den AR gebunden vorliegen könnten (siehe 2.2.6). Außerdem wurde der Hormonüberstand für Reportergenassays in Lübeck verwendet, um die AR-Aktivierungskapazität zu messen (siehe 2.2.7)

2.2.1.6 RNA-Isolierung

Die RNA wurde aus jeweils zwei Vertiefungen der 6-Loch-Platten zu jedem Zeitpunkt für jeden Patienten isoliert. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem Rneasy-RNA-Mini-Kit (Qiagen).
Nach der Abnahme des Überstandes wurden die Fibroblasten zunächst mit PBS gewaschen, um eine optimale Einwirkung der 100 µl Lysispuffer (RLT-Puffer versetzt mit 1 % Mercaptoethanol) zu gewährleisten. Die durch einen

Zellschaber gelösten Fibroblasten wurden dann in eine Qiashredder Säule pipettiert und bei 13000 rpm zwei Minuten zentrifugiert, wodurch unlösbare Zellbestandteile abgetrennt werden konnten. Dann wurde der Überstand in 200 µl 70 %igen Ethanol aufgenommen und erneut zentrifugiert, um optimale Bindungskonditionen zu erhalten. 400 µl der Lösung wurden schließlich in eine RN-easy Säule gegeben, wo die Bindung der RNA auf eine auf Silica-Gel basierende Membran erfolgte. Nach mehreren Waschschritten mit verschiedenen Puffern (RW 1 und RPE) wurde die RNA in 60 µl RNAse freiem Wasser gelöst, welches zuvor auf 80 ℃ erwärmt word en war. Anschließend wurde die extrahierte RNA bei - 80 ℃ bis zur weite ren Verwendung eingefroren.

2.2.1.7 Isolierung von Proteinlysat

Nach der Abnahme des Überstandes wurden aus jeweils zwei Vertiefungen Proteinlysate hergestellt. Zunächst wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen, um ein gutes Einwirken des Lysispuffer A (1 % Triton; 0,5 % DEO; 0,08 % SDS; 40 mM Tris; 1 mM EDTA; 10% Glyercol; 1 mM Dithiothreitol; pH 9,5) mit Proteaseinhibitoren (0,5 mM Bacitracin; 0,6 mM PMSF) zu gewährleisten. Nach Zugabe dieses Puffers wurden die Zellen in eine Qiashreddersäule pipettiert und bei 13000 rpm herunterzentrifugiert. Dann wurde das gewonnene Proteinlysat in Reagenzröhrchen pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 ℃ eingefroren. Um mög lichst intakte Proteine zu gewinnen, fanden alle Schritte der Isolierung auf Eis statt.

2.2.1.8 Einfrieren von Zellkulturen

Fibroblasten, die nicht für die Versuche benötigt wurden, wurden wieder eingefroren, um weitere Passagierung zu vermeiden und genügend Aliquots für weitere Versuche zu haben. Dazu wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und durch Trypsinierung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Nach einer Zentrifugation bei 1000 rpm in 37 ℃ warmem Medium wurde das Zellpellet dann in 1,5 ml 4 ℃ kaltem Einfriermedium gelöst un d in ein Kryroröhrchen gegeben. Dann wurden die Zellkulturen zunächst in einem mit Ethanol befülltem Einfriercontainer bei –80 ℃ vorgefroren mit einer Abkühlung von 1 ℃ /min.

Nach ca. 24 h wurden die Zellkulturen schließlich bei – 196 ℃ in flüssigem Stickstoff bis zur erneuten Verwendung aufbewahrt.

2.2.2 Qualitätsprüfung und Quantitätsprüfung der isolierten Produkte

2.2.2.1 Qualitäts- und Quantitätsmessung der Proteine

Von den aus den Zellen gewonnenen Proteinen wurde die Konzentration mit dem BIO-RAD-Protein Assay nach Bradford bestimmt. Diese Methode beruht auf einer messbaren Änderung der Absorption des BIO-RAD-Reagenz von 465 nm zu 595 nm bei Bindung an Protein. Durch die Proteinbindung wird das zuvor anionische Reagenz in eine kationische Form überführt, welches eine Farbänderung bewirkt. Die Farbintensität ist proportional der Proteinkonzentration und wurde im Photometer bei 595 nm gemessen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proben wurde zunächst eine Standardreihe aus einer Rinderserumalbumin (bovine serum albumine= BSA)-Stammlösung hergestellt. BSA eignet sich als neutrales Protein hierfür besonders gut. Diese Verdünnungsreihe enthielt Proben mit folgenden Konzentrationen: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/µl, die mit H_2O bidest hergestellt wurden. Die Proben der Verdünnungsreihe wurden mit je 2,5 ml filtriertem BIO-RAD-Reagenz gemischt, gevortext, in Küvetten gegeben und schließlich im Photometer gemessen. Nach der Festlegung der Standardreihe wurden dann die Proben der isolierten Proteinlysate gemessen. Alle Messungen fanden in Doppelbestimmung statt. Die ermittelten Konzentrationen wurden für die Berechnung der einzusetzenden Proteinkonzentrationen im Western Blot verwendet. Dabei wurde die Probe mit der niedrigsten ermittelten Proteinkonzentration gleich 100 % gesetzt und von dieser 25 µl eingesetzt. Alle anderen Proben wurden dann zu dieser Probe in Beziehung gesetzt, so dass eine gleichmäßige Proteinkonzentration (µg) zwischen den einzelnen Proben im Western Blot gewährleistet war.

Die Qualität der Proteinlysate kann im Western Blot überprüft werden. Bei einer Degradation der Proteine entsteht ein Schmier mit verkürzten Produkten unterhalb der erwarteten Bande.

2.2.2.2 Qualitäts- und Quantitätsmessung der mRNA

Für die cDNA-Erststrangsynthese wurde 1 µg Gesamt RNA verwendet. Zur Berechnung wird die Konzentration der isolierten RNA in den Proben der

einzelnen Zelllinien benötigt. Außerdem ist es von großer Bedeutung, dass für weitere Versuche eine gute Qualität der isolierten RNA gegeben ist, weil degradierte RNA weitere Ergebnisse verfälschen würde.
Für die Qualitäts- und Quantitätsprüfung der isolierten RNA wurde das RNA-6000-Nano-Chip-Kit (Agilent) zusammen mit dem Agilent-2100-Bioanalyzer verwendet. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf einer miniaturisierten Kapillarelektrophorese. In einem Chip, der aus einem Netzwerk kommunizierender Kanäle besteht, werden RNA-Fragmente nach ihrer Molekulargröße elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer laserinduzierten Fluoreszenz gemessen. Am Ende eines Messzyklus entsteht für jede eingesetzte RNA-Probe ein Elektropherogramm. Bei einer weitgehend intakten RNA sind in dem Elektropherogramm die 18s und 28s rRNA-Peaks in einem definierten Verhältnis zueinander sichtbar. Weitere Banden deuten auf eine Degradation und damit auf eine schlechte Qualität der RNA hin.
Die Durchführung der Qualitäts- und Quantitätsmessung fand nach dem Protokoll des Herstellers statt. Zunächst wurde ein Gelmix hergestellt, indem 550 µl von der RNA-6000-Nano-Gel-Matrix in einen Zentrifugenfilter bei 1500 rpm zentrifugiert wurden. Anschließend wurde ein Gel-Farbstoff Mix aus 65 µl Gel und 1 µl Farbstoff hergestellt und bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Gelmix wurde dann in den Mikrochip gegeben und mit Hilfe eines Überdruckes in dem Kanalsystem verteilt. Im nächsten Schritt wurden die 12 Vertiefungen mit 5 µl RNA-6000-Nano-Marker beladen und zu 11 Vertiefungen 1 µl der jeweiligen denaturierten RNA-Probe und zu einer Vertiefung 1 µl eines Standards hinzugegeben. Vor der Messung im Agilent-2100-Bioanalyzer wurde der Chip noch einmal 1 min bei 2400 rpm gevortext.
Die Messung und Analyse der Proben fand im Institut der Pathologie der Universität zu Lübeck statt. Für jede Probe wurde nach der Messung ein Elektropherogramm von der Software erstellt, welches die Qualität und Quantität der gemessenen RNA anzeigt. Eine Beschreibung und Darstellung der Qualitätsmessung mit der RNA-Integrity-Number (RIN) befindet sich in Abb.5.

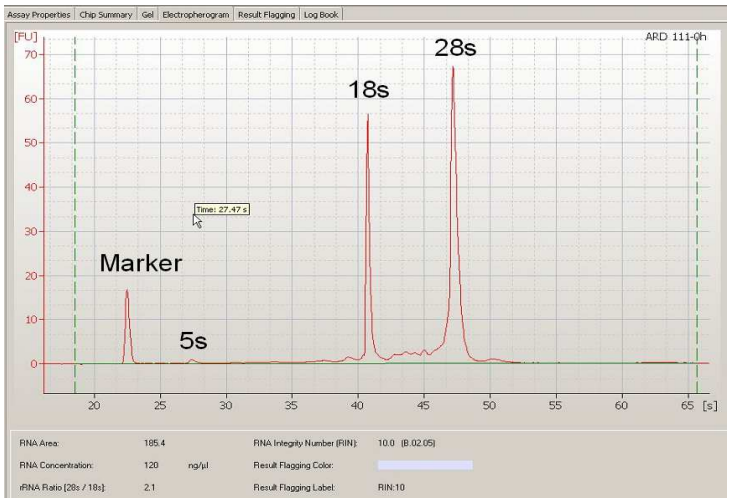


Abb. 5 : Qualitätsprüfung der mRNA im Elektropherogramm

Dargestellt ist ein Elektropherogramm einer Patientenzelllinie (ARD 111). Die Konzentration der mRNA der untersuchten Zelllinie ist 120 ng/µl. Die Qualität der untersuchten mRNA wird mit der RIN angeben. In diesem Beispiel beträgt die RIN= 10. Die RIN-Bestimmung erfolgt durch Analyse verschiedener Faktoren. Ein wichtiger Faktor bei der RIN-Bestimmung ist die Berechnung des Gesamt-RNA-Verhältnis, wobei die Fläche unter der 18s und 28s Bande im Verhältnis zur Fläche unter der gesamten Kurve gesetzt wird. Ein weiterer Faktor bei der RIN Berechnung ist die Höhe der 28s Bande. Ein frühzeitiges Abflachen dieser Bande deutet auf eine Degradation der RNA hin. Neben den 18s und 28s Banden sind weiterhin die Markerbande und die 5s Bande sichtbar, die auch in die Berechnung der RNA-Qualität und der RIN mit einbezogen werden. Die RIN-Skala reicht von 0-10, wobei 10 die höchste RNA-Qualität anzeigt, 0 eine komplette Degradation der RNA.

2.2.3 Fällen der RNA

Falls in einer Probe nicht 1 µg RNA für die cDNA-Erstrangsynthese vorhanden war, wurde die RNA vor der Synthese gefällt. Dazu wurde zu der RNA 1/10 Volumen 5 M NaCl und 2,5 Volumen 100 %iger Ethanol hinzugegeben und die RNA in dieser Lösung über Nacht bei –20 ℃ inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Mischung für 25 min bei 4 ℃ mit 14000 rpm zentrifugiert. Dann wurde die Alkohol/NaCl Mischung abpipettiert und die RNA erneut mit 70 % Ethanol zum Waschen zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Ethanols und dem Trocknen bei 37 ℃ auf dem Heizblock wurde die RNA in 10 µl Diethylpyrocarbonat-H_2O (= DEPC) gelöst und konnte für die cDNA-Erstrangsynthese eingesetzt werden.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

2.2.4.1 Grundlagen

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction= PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA. Die PCR-Reaktion stellt dabei Kopien

von DNA in exponentieller Weise her. Zur Untersuchung der mRNA spezifischer Gene mittels PCR muss diese zunächst in cDNA umgewandelt werden. Die Herstellung der cDNA kann in demselben Zyklus mit der PCR in nur einem Reaktionsgefäß stattfinden oder auch in zwei Schritten in zwei Reaktionsgefäßen. Die Zwei-Schritt-Reverse-Transkriptase (RT)-PCR, die auch in diesen Versuchen verwendet wurde, bietet den Vorteil, dass die hergestellte cDNA in vielen Experimenten mit unterschiedlichen Primern genutzt werden kann (Ginzinger 2002). Für die PCR wurde der Light Cycler von der Firma Roche verwendet. Mit diesem Gerät ist es möglich eine Real-Time-PCR durchzuführen. Bei dieser Form der PCR wird im Gegensatz zur konventionellen PCR keine Endpunktanalyse durchgeführt, sondern die PCR- Produkte kontinuierlich während der log-linear-Phase gemessen (Giulietti et al. 2001; Ball et al. 2003). Dadurch kann direkt auf die Menge der anfänglich vorhandenen cDNA geschlossen werden (Ginzinger 2002).

2.2.4.2 cDNA-Erststrangsynthese

Die cDNA-Erststrangsynthese wurde in einem handelsüblichen Thermocycler durchgeführt. Alle benötigten Reagenzien wurden auf Eis gelagert. Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt. Es wurde das Super-Script Reverse-Transkriptase-Kit (Invitrogen) verwendet. Die cDNA-Erststrangsynthese wurde nach dem Protokoll des Kit-Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde zu der RNA je Probe 1 µl Random Primer gegeben. Random Primer sind synthetisch hergestellte Hexamernukleotidgemische, die sich an den zu transkribierenden RNA-Strang anlagern und der RNA-abhängigen DNA-Polymerase als Synthesestartpunkt dienen.
Die Proben wurden für 5 min bei 70 ℃ im Thermocycler denaturiert. Während der Denaturierung wurde der Mastermix nach Herstellerangaben hergestellt mit folgenden Komponenten: 5x RT- Puffer (250 mM Tris-HCl; 375 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$; pH 8,3); d- NTP (je 10 mM d-ATP; d-CTP; d-GTP; d- TTP); DTT (0,1 M); RNAse Inhibitor (40 U/µl). Nach der Denaturierung wurde der Mastermix mit der RNA gemischt, die Proben gevortext und kurz zentrifugiert und dann in den nun auf 37 ℃ erhitzten Thermocycler gegeben. Nach zwei Minuten wurde zu jeder Probe 40 U reverse Transkriptase gegeben und die Reaktion 1 h bei

37 ℃ inkubiert. Dann kühlte der Thermocycler auf 4 ℃ herunter und die fertige cDNA wurde entnommen. Für die spätere Real-Time-PCR wurden 1:10 Verdünnungen der cDNA mit DEPC-H_20 hergestellt. Die cDNA wurde bei –20 ℃ bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.4.3 Ablauf der Real-Time-PCR mit dem Light Cycler

Mit dem Light-Cycler wurden die Expressionsprofile der mRNA in den isolierten Proben für die 17β-HSD 5 und den AR untersucht.

Die Real-Time-PCR wurde mit dem Light Cycler-DNA-Master-SYBR Green-Kit (Roche) durchgeführt, welches SYBR-Green, H_2O und $MgCl_2$ enthält. Der Mastermix für die PCR wurde nach Herstellerangaben hergestellt und war aus den Komponenten des Kits und dem sense und antisense Primer des zu untersuchenden Transkripts zusammengesetzt. Das $MgCl_2$ dient zur Herstellung effizienter und spezifischer Amplifikation. Die ideale Konzentration für die einzelnen untersuchten Gene können zwischen 1-5 mM variieren. Diese Konzentrationen, die optimalen Primerkonzentrationen (siehe 7.3) und die Bedingungen für die Light-Cycler-Analysen der einzelnen Transkripte wurden zuvor in unserer Arbeitsgruppe etabliert und in dieser Arbeit übernommen (Hoppe et al. 2006). Als Fluoreszenzfarbstoff wurde in diesen Versuchen SYBR-Green verwendet, welches in die sich bildende Doppelstränge interkaliert (Abb.6).

Nachdem der Mastermix hergestellt war, wurde dieser zentrifugiert und pro Probe 18 µl in eine Glaskapillare pipettiert. Dazu wurden dann jeweils 2 µl der zu untersuchenden 1:10 verdünnten cDNA gegeben, bzw. 2 µl H_2O in die Negativkontrolle. Dann wurden die Kapillaren geschlossen, kurz herunterzentrifugiert, in die jeweilige Position des Light-Cycler-Karussells gestellt und der Light-Cycler gestartet.

Ein Light-Cycler-Lauf besteht aus einer Denaturierungsphase mit Aktivierung der Taq-Polymerase bei ca. 95 ℃, der anschließende n Amplifikation und einer abschließenden Schmelzkurvenanalyse. Die Amplifikationsphase lässt sich noch in verschiedene Phasen unterteilen (Abb. 6) und besteht aus ca. 45 Zyklen.

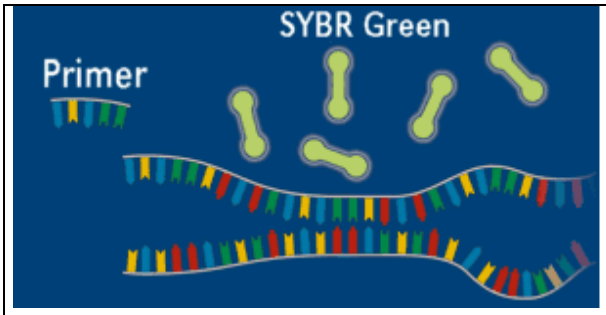
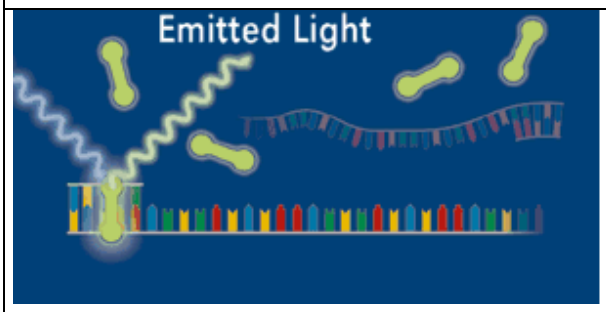
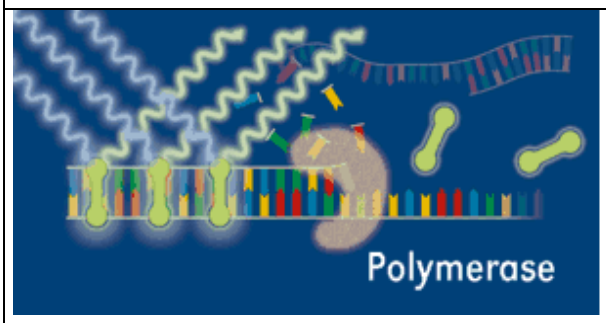
<table>
<tr><td> 
</td><td>a) Durch die Denaturierung liegt die DNA einzelsträngig vor und die Fluoreszenz des ungebunden SYBR-Greens ist kaum detektierbar.</td></tr>
<tr><td> 
</td><td>b) In der Annealingphase lagern sich die Primer an die DNA-Stränge und das SYBR–Green interkaliert in die sich bildenden Doppelstränge.</td></tr>
<tr><td> 
</td><td>c) In der Elongationsphase werden die Primer mit Hilfe der Taq-Polymerase und den d-NTP`s verlängert. Das SYBR-Green interkaliert weiterhin in die doppelsträngige DNA.</td></tr>
<tr><td colspan="2">d) Nach Ablauf eines Amplifikationszykluses wird die Fluoreszenz des SYBR-Greens gemessen und auf dem Bildschirm dargestellt. Das Fluoreszenzsignal tritt jedoch erst nach ca. 20 Amplifikationszyklen aus dem Hintergrund hervor.</td></tr>
</table>

Abb. 6(a-c): Ablauf der Amplifikationsphase bei Real-Time-PCR mit SYBR Green

Die Werte der Fluoreszenzintensität repräsentieren die Produktmenge, die in den aufeinanderfolgenden Zyklen erzeugt wird. Der Zeitpunkt bei dem die Fluoreszenz aus dem Hintergrund hervortritt wird als Crossing Point (CP) bezeichnet und markiert den Übergang von der Basislinie in die log-linear-Phase. Hier erfolgt die Amplifikation nun mit konstanter Geschwindigkeit und somit sind Messungen mit Rückschlüssen auf die Ausgangskonzentrationen zu diesem Zeitpunkt am genausten. Zwischen dem CP und der anfänglichen Konzentration der Ziel-mRNA besteht eine direkte Beziehung. Es werden umso weniger Zyklen benötigt, um den CP zu erreichen, je mehr Zielkopien anfänglich vorhanden waren. Bei einer 100 % Amplifikationseffizienz verändert eine zehnfache Änderung der Ziel-mRNA den CP, also das Hervortreten der Fluoreszenz aus dem Hintergrund, um 3,3 Zyklen. Der CP ist die Grundlage für die spätere relative Quantifizierung.

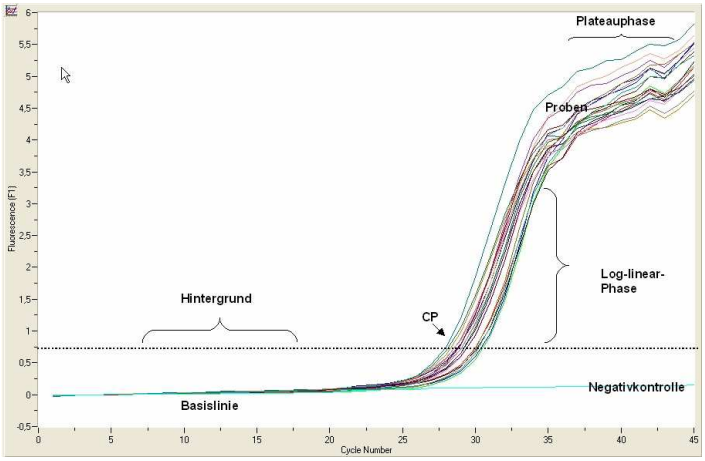


Abb. 7 : Light-Cycler Quantifizierungslauf mit Androgenrezeptor-Primern

Dargestellt ist ein typischer Quantifizierungslauf mit AR-Primern. Auf der X-Achse ist die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen, auf der Y- Achse die Fluoreszenz. Die Fluoreszenz der Proben befindet sich zunächst noch im Hintergrund und erreicht erst nach ca. 27 Zyklen den CP, der den Übergang von der Basislinie in die log-linear-Phase kennzeichnet. In der log-linear Phase finden die Messungen der Fluoreszenz statt. Nach ca. 40 Zyklen findet kein Anstieg der doppelsträngigen cDNA mehr statt und die Plateauphase ist erreicht. Die Negativkontrolle (hellblau) zeigt keinen Fluoreszenzanstieg, da in ihr keine cDNA vorhanden ist.

2.2.4.4 Auswertung der Ergebnisse durch relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Zielmenge der zu untersuchenden Transkripte relativ zu einem Transkript eines Referenzgenes angegeben. Als Referenzgene werden häufig Gene verwendet, von denen eine konstante Expression angenommen wird. In dieser Arbeit diente die Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) als Referenzgen. Dieses Protein wirkt als drittes Enzym in der Hämbiosynthese (Schneider-Yin et al. 2002) und wurde schon zuvor von unserer Arbeitsgruppe als Referenz für die in dieser Arbeit untersuchten Zieltranskripte genutzt. Für die Berechnung der Konzentration unbekannter Proben ist es wichtig Standardkurven für das Referenztranskript als auch für die Zieltranskripte herzustellen. Diese sollten den Konzentrationsbereich abdecken, der für die zu analysierenden Proben zu erwarten ist. Für diese Arbeit wurden die zuvor von unserer Arbeitsgruppe erstellten Standardkurven verwendet. Durch Erstellen eines Koeffizient Files ist es möglich, dass die Standardkurven der Zieltranskripte mit denen der Referenztranskripte verglichen werden können, ohne dass sie zusammenlaufen müssen (Hoppe, 2006). Um mit der Relative Quantification Software eine effizienzkorrigierte Quantifizierung durchzuführen, ist es außerdem wichtig, in jeder Light-Cycler-Analyse neben den Patientenproben eine Kontroll-mRNA mitlaufen zu lassen. Es wird

optimalerweise eine Kontroll-mRNA verwendet, die eine stabile Ziel- zu Referenz-Ratio aufweist. Die Universal-Reference-RNA von Stratagene besteht aus zehn unterschiedlichen menschlichen Zelllinien und ist in unserer Arbeitsgruppe als Kontroll-RNA für die gewählten Zieltranskripte schon etabliert (Hoppe et al. 2006). Die Kontroll-RNA lief in jedem Lauf als Doppelbestimmung mit und wurde auch zum Erstellen der Standardkurven verwendet.
Die relative Quantifizierung der Relative Quantification Software beruht auf dem Prinzip des ΔΔ-CP Model:

ΔCP= CP (Zieltranskript) - CP (Referenztranskript)
ΔΔCP= ΔCP(Proben-RNA) - CP(Kontroll-RNA)
Ratio= $2^{-\Delta\Delta CP}$

Dabei wird der relative Expressionsunterschied (die Ratio) zwischen Proben und Kontrollproben in Bezug auf eine Standardprobe und in Normalisierung zum Referenztranskript berechnet. Bei dieser Formel wird jedoch eine 100 %ige Effizienz vorausgesetzt, also eine Verdopplung der cDNA pro PCR-Zyklus. Dies liegt selbst unter „optimalen Versuchsbedingungen“ selten vor, wo die Effizienz meist zwischen 1,7 und 1,9 schwankt. Die tatsächliche Effizienz wird anhand der Steigung der Standardkurven errechnet mit folgender Formel:

$E= 10^{(-1/Steigung)}$

Mittels der Standardkurven werden die ermittelten CP-Werte schließlich hinsichtlich ihrer Effizienzunterschiede korrigiert und mit der Kontroll-RNA normalisiert. Die von der Software errechneten Ergebnisse werden als Verhältnis Probe zu Kontroll-RNA ausgedrückt.
($Zieltranskript_{Probe}$/$Referenztranskript_{Probe}$/
$Zieltranskript_{Kontrolle}$/$Referenztranskript_{Kontrolle}$)

2.2.4.5 Qualitätsüberprüfung der PCR Produkte

Um sicherzustellen, dass es sich bei den PCR-Produkten um die richtigen Amplifikate handelte und keine Messfehler durch mögliche Verunreinigungen entstanden sind, wurde die Amplifikation mit Hilfe eines 2 % Agarosegels

(2 g Agarose/100 ml TBE Puffer) überprüft. Nach dem PCR-Lauf wurden die Produkte mit LB III- Puffer (30 % Glyercol, 0,25 % Bromphenolblau) versetzt, gevortext und auf das Gel aufgetragen. Um die Länge der Produkte bestimmen und vergleichen zu können, wurde als Orientierung ein 100 bp Marker aufgetragen. Außerdem lief im Gel immer eine Negativkontrolle mit, welche der Reinheitsüberprüfung diente. Wenn anhand der Negativkontrolle eine Kontamination der PCR-Produkte zu vermuten war, wurde der Lauf nicht für die Auswertung verwendet und noch einmal wiederholt. Je nach Länge des PCR-Produktes lief das Gel in der Elektrophoresekammer in 1 x TBE Puffer (0,09 M Tris; 0,09 M Borsäure ; 2,5 mM Na_2- EDTA; pH 7,4) 1-2 h bei 100 Volt. Nach dem Lauf wurde es für ca. 15 min in eine Ethidiumbromidfärbelösung (2 µg /ml) gegeben und schließlich mit Hilfe einer UV-Kamera ausgewertet.
Eine weitere Überprüfung auf unspezifische Produkte fand mit Hilfe der Schmelzkurve der Light-Cycler Software statt.

2.2.5 Western Blot

2.2.5.1 Grundlagen

Der Western Blot ist eine Methode zur Darstellung und späteren Quantifizierung von Proteinen. Diese werden zunächst nach ihrer Größe mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Dann erfolgt das eigentliche Blotten, das die Übertragung und irreversible Fixierung der Proteine auf einer Nitrozellulose-membran beinhaltet. Anschließend werden die Proteine mit für das Zielprotein spezifischen primären und sekundären Antikörpern inkubiert. Eine Detektion der gesuchten Proteine erfolgte schließlich über ein Lumineszenzsignal des zweiten Antikörpers, das auf einem Film oder mit einer CCD (charged-coupled-device)-Kamera sichtbar gemacht werden kann.

2.2.5.2 Gießen der Gele und Vorbereitung der Proben

Für jede Gelelektrophorese wurden jeweils ein Trenn- und ein Sammelacrylamidgel hergestellt. Diese Gele haben unterschiedliche Funktionen und unterscheiden sich v.a. durch ihre Zusammensetzung, den pH-Wert und die Größe der Poren. Das Sammelgel dient zur Ladung der Proteingemische. Durch die größeren Poren des Sammelgels laufen die Proben hier nach Start der Elektrophorese schneller und ohne Auftrennung. Nach

Übergang der Proteingemische in das Trenngel findet durch die kleineren Poren eine Verringerung der Laufgeschwindigkeit und eine Auftrennung nach der Größe der Proteine statt.
Zunächst wurde das Trenngel (siehe 7.2) gegossen, welches abhängig von dem zu untersuchendem Protein in unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen hergestellt wurde. Je höher die Acrylamidkonzentration war, umso kleiner waren die Poren und desto besser war die Auftrennung der Proteine mit geringerem Molekulargewicht. Mittels Western Blotting sollte festgestellt werden, ob die Proteine von der 17β-HSD 5 (= AKR1C3), dem AR und Aktin in den abgenommenen Proteinlysaten vorhanden waren. Das Molekulargewicht des AKR1C3-Proteins ist eher gering mit 35 kDa. Somit läuft dieses Protein sehr schnell, weswegen ein 12 %iges Gel verwendet wurde. Das Molekular-gewicht des AR-Proteins liegt mit 100 kDa höher, weshalb ein 7 %iges Gel ausgewählt wurde, um eine optimale Auftrennung auch der größeren Proteine zu gewährleisten.
Um einen möglichst glatten Rand des Trenngels zum Sammelgel zu erreichen, wurde das Trenngel nach dem Gießen mit 100 %igem Ethanol beschichtet. Nach ca. 45 min war das Trenngel getrocknet und der Ethanol wurde mit Aqua bidest entfernt. Dann wurde das Sammelgel (siehe 7.2) hergestellt und zwischen die Glasplatten pipettiert. Zur Herstellung von Taschen für die 9 Proben und den Marker wurde ein Kamm mit 10 Zähnen zwischen die beiden Glasplatten gesteckt. Während das Sammelgel polymerisierte, wurden die Proben aufgetaut, mit Laemmli Puffer gemischt und schließlich 3 min bei 99 ℃ denaturiert, bevor sie in die Taschen pipettiert wurden.
Die Laufgeschwindigkeit und Auftrennung der Proteingemische sollte beim Western Blot nur von der Molekulargröße abhängen. Ein weiterer beeinflussender Faktor in der Gelelektrophorese ist jedoch die Ladung der Proteine. Um diese Eigenladung zu überdecken, wurden die Proteine vorbehandelt, bevor sie in das Sammelgel pipettiert wurden. Zunächst wurden die Proben mit 2 x Laemmli Puffer (100 mM Tris; 4 % SDS; 20 % Glyercol; 0,002 % Bromphenolblau; pH 6,8) mit einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Der Laemmli Puffer enthält Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate= SDS) und β2- Mercaptoethanol. Das β2- Mercaptoethanol bewirkt eine Reduktion der Dissulfidbrücken in den Proteinen. Das SDS lagert sich an die Proteine und

denaturiert diese. Dadurch entstehen Komplexe, die durch die Sulfatgruppe des SDS eine gleichmäßig negative Ladung aufweisen. Durch Erhitzung des Protein-Puffergemisches werden Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Brechen von Wasserstoffbrücken aufgelöst. Am Ende der Vorbereitung entstehen denaturierte Proteinproben mit einer gleichmäßig negativen Ladung, welche somit nur abhängig von ihrer Molekulargröße aufgetrennt werden.

2.2.5.3 Elektrophorese

Die gegossenen Gele wurden mit den Glasplatten in eine Elektrophorese-kammer eingebaut, welche mit 1 x Elektrodenpuffer (25 mM Tris; 0,192 M Glycin; 0,1 % SDS) befüllt war. Dann wurde in die Taschen des Sammelgels die vorbereiteten Proben und ein Marker pipettiert. Als Marker wurde bei allen untersuchten Proteinen der Kaleidoskopemarker verwendet, welcher aus Proteinen verschiedener Größe besteht. Dadurch wird dieser in unterschiedliche Banden aufgetrennt, die später zur Orientierung bei der Untersuchung der gesuchten Proteinbande dienen.
Nach Beladung des Gels wurde eine elektrische Spannung von 100 V angelegt, welche eine Wanderung der negativ geladenen Proteine im Gel bewirkt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn eine ausreichende Auftrennung der gesuchten Proteinbanden anhand des Markers sichtbar war und die Proteinproben bis fast ans Ende des Trenngels gelaufen waren.

2.2.5.4 Blotten

Das Gel wurde am Ende der Elektrophorese aus den Glasplatten genommen und auf eine Nitrozellulosemembran gelegt. Der Gel-Membrankomplex wurde von einer Filtermatte und einem Filterpapier beidseits eingerahmt. Die Blotkomponenten wurden zuvor in 1 x Blottingpuffer (16,5 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % Methanol; pH=8) getränkt. Der Blot wurde dann in die Halterung geschoben und in den Blottingtank gestellt. Dann wurde ein senkrecht zum Acrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, um den Transfer der Proteine von dem Gel auf die Membran zu gewährleisten. Der Transfer fand für 80 min bei 100 V statt. Die irreversible Bindung der Proteine an die Membranfläche erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. Durch das Methanol in dem 1 x Blottingpuffer wird das

SDS ausgewaschen und die Proteine können wieder ihre Sekundär- oder Tertiärstruktur einnehmen, wodurch eine noch stabilere Bindung der Proteine an die Membran gewährleistet ist. Nach dem Blotten wurde die Effektivität des Proteintransfers mit Coomassie Orange (Invitrogen) überprüft. Hierfür wurde das Gel nach Angaben des Herstellers ca. 30 min in die Färbelösung eingelegt. Die Coomassie-Orange-Lösung bindet an die Proteine im Gel und erzeugt im UV-Licht ein detektierbares Fluorszenzsignal. Die Western Blots wurden nur weitergeführt, wenn keine Proteine auf dem Gel verblieben waren und somit ein kompletter Transfer der Proteine von dem Gel auf die Membran stattgefunden hatte. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese über Nacht in 5 %iger Magermilch (5 g Magermilchpulver/ 100 ml PBS - Tween) geblockt. Die Magermilch dient der Blockierung unspezifischer Antikörper-bindungsstellen auf der Membran, so dass sich die später zugegeben spezifischen Antikörper nur an die Zielproteine der eingesetzten Proben binden können.

2.2.5.5 Markierung der Membran mit Antikörpern

Es wird zwischen Primär- und Sekundärantikörpern unterschieden. Die Primär-Antikörper binden direkt an ein spezifisches Epitop des Proteins auf der Membran. Die Sekundär-Antikörper binden an das Fc-Fragment der Primär-Antikörper. Für alle Antikörper wurde eine Verdünnung nach Angabe des Herstellers mit 5 %iger Magermilch hergestellt, bevor sie auf die Membran gegeben wurden. Als Referenzprotein wurde bei diesen Versuchen β-Aktin verwendet. Es dient in der späteren Quantifizierung zum Abgleich der tatsächlichen aufgetragenen Proteinmenge.

Antikörper (Produkt Nr.)	**Hersteller**	**Eigenschaften**	**Verdünnung**	**Zielprotein bei (kDA)**
AR (F.39.4.1.)	BioGenex (USA)	Primär- Ak aus Maus	1: 600	100
AKR1C3 (17-β-HSD 5)	Novus (USA)	Primär Ak aus Ziege	1:5000	35
Anti-Aktin	Sigma- Aldrich (Steinheim)	Primär-Ak aus Kaninchen	1:1000	42

Anti mouse	Amersham (Grossbrittaninen)	Sekundär-Ak aus Schaf	1:2000	
Anti goat	Dako (USA)	Sekundär-Ak aus Kaninchen	1:2000	
Anti rabbit	Sigma- Aldrich (Steinheim)	Sekundär-Ak aus Ziege	1:4000	

Tab. 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot

Aufgeführt sind die für die durchgeführten Western Blots verwendeten Primär- und Sekundärantikörper. Es wurde die Proteinexpression der 17β-HSD 5 (AKR1C3) und des ARs untersucht. Als Referenzprotein diente β-Aktin. (Ak= Antikörper)

Die Membran wurde nach der Blockierung zunächst mit der Primärantikörper-verdünnung in eine Plastiktüte eingeschweißt. Diese wurde dann für ca. 1 h auf den Schüttler gelegt, um eine optimale Inkubation und Verteilung des Primär-Antikörpers zu gewährleisten. Dann wurde die Membran in eine PBS-Tween-Waschlösung (1 x PBS versetzt mit 0,1 % Tween) gegeben, welche innerhalb einer Stunde viermal gewechselt wurde und der Entfernung von unspezifisch gebundenen Antikörpern diente. Dasselbe Verfahren wurde anschließend für den entsprechenden Sekundär-Antikörper durchgeführt. Das Molekulargewicht des AR-Proteins liegt bei 100 kDa, das des Aktin Proteins bei 42 kDa. Somit kann die Membran zur Markierung und Detektion auseinandergeschnitten werden, ohne die gesuchten Proteinbanden zu beschädigen. Dadurch fand die Markierung mit dem Aktin-Antikörper und dem AR-Antikörper und den entsprechenden Sekundär-Antikörpern in zwei unterschiedlichen Plastiktaschen zum gleichen Zeitpunkt statt. Eine Detektion konnte am selben Tag durchgeführt werden. Das Molekulargewicht des AKR1C3-Proteins ist nur 7 kDa höher als das Molekulargewicht des Aktin-Proteins. Damit bestünde die Gefahr, die gesuchten Proteinbanden beim Auseinanderschneiden zu beschädigen. Aus diesem Grund fand zunächst eine Detektion des AKR1C3-Antikörper und erst nach einem erneuten Blockieren über Nacht eine Markierung und Detektion mit dem Aktin-Antikörper statt.

2.2.5.6 Detektion

Die Detektion wurde mit der Chemilumineszenzmethode durchgeführt. Der zugebene Sekundär-Antikörper ist an das Enzym der Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase= HRP) gekoppelt, welche mit dem Primär-Antikörper

reagiert. Nach Zugabe eines Chemilumineszenzreagenz katalysiert die HRP die Oxidation von Luminol, wodurch ein Lichtsignal von 428 nm frei wird. Dieses Lichtsignal kann durch einen Film oder mit einer CCD-Kamera sichtbar gemacht werden.

In diesen Versuchen wurden beide Auswertungsmöglichkeiten genutzt. In der nach Herstellerangaben hergestellten Chemilumineszenzlösung (Perkin Elmer) wurde die Membran für mindestens 2 min inkubiert und dann zunächst mit einer CCD-Kamera detektiert. Die Belichtungszeit war abhängig von der Signalstärke der gewünschten Proteinbande und lag zwischen 1-20 min. Bei einer Übersättigung wurde die Belichtungszeit verkürzt, weil ansonsten eine Quantifizierung nicht durchführbar wäre. Durch die Kamera werden digitale Bilder erstellt, die zur späteren relativen Quantifizierung der Proteine verwendet werden konnten. Zur Kontrolle der Ergebnisse der Kamera wurde anschließend noch eine Detektion in der Dunkelkammer vorgenommen. Dabei wurden die Proteinbanden auf einem Film visualisiert.

Zur Kontrolle, ob eine gleichmäßige Proteinübertragung auf die Membran stattgefunden hat, wurde diese nach der Detektion in Ponceau-S-Lösung (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure) über Nacht eingelegt. Durch eine reversible Bindung dieser Substanz an die positiven Aminogruppen der Proteine werden diese auf der Membran sichtbar angefärbt.

2.2.5.7 Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung fand mit der Software Quantity One (BIO-RAD) statt. Mit diesem Programm kann eine densitometrische Auswertung der Proteinbanden durchgeführt werden. Das Programm quantifiziert die von der Kamera aufgezeichneten Graustufen. Die gewünschten Proteinbanden auf der Membran werden markiert und von dem Programm wird die Intensität dieser Banden pro mm^2 gemessen (Abb. 8). Neben den markierten Banden wird auch der Hintergrund der Banden auf der Membran markiert. Dieser wird von der Probenbandenintensität abgezogen, um möglichst genaue Daten zu erhalten. Die Ergebnisse dieser Quantifizierung werden in einem Volumenanalysereport für die einzelnen Proben angegeben. Es wurde pro Blot jeweils eine Quantifizierung für Aktin und eine für das Zielprotein: 17β-HSD 5 oder AR, durchgeführt. Dann wurden die von dem Programm angegebenen Volumen der

beiden Proteine zueinander in Beziehung gesetzt und eine Ratio Zielprotein/Aktin gebildet. Die Ergebnisse dieser relativen Quantifizierung dienten schließlich als Auswertungsgrundlage.

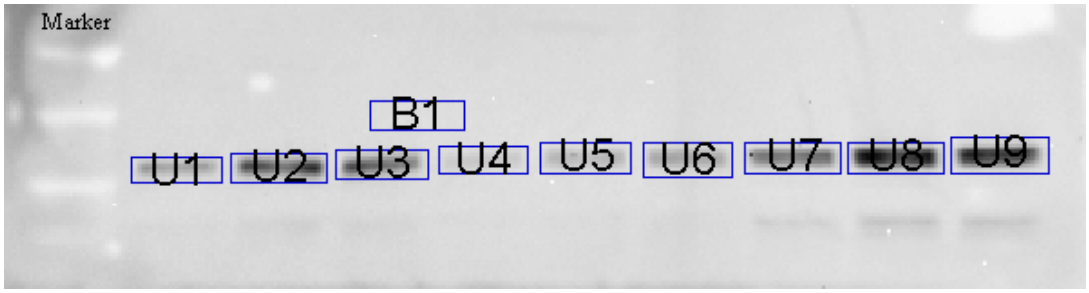


Abb. 8: Darstellung einer Western-Blot Quantifizierung

Auf dem Bild dargestellt ist ein mit einer CCD-Kamera fotografierter Western Blot. Die Quantifizierung erfolgt mit der Software Quantity One (BIO-RAD). Dabei werden die Probenproteinbanden markiert und deren Farbintensität gemessen. Um möglichst genaue Werte zu erhalten, wird auch die Intensität des Hintergrundes gemessen und von den Probenwerten abgezogen. (B= Hintergrund; U1-10= Proteinbanden der Proben)

2.2.6 Untersuchung der Mediumüberstände auf Hormone und Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese

Die in den Inkubationsversuchen gewonnen Überstände wurden zur Hormonbestimmung zu unseren Kooperationspartnern A.E. Kulle, F.G. Riepe und P.M. Holterhus nach Kiel geschickt (Adressenverzeichnis siehe 7.5). Dort wurden die Überstande mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry = LC-MS/MS) auf Hormone der Sexualsteroidbiosynthese untersucht.

Die Massenspektrometrie beruht auf dem Prinzip gasförmige Ionen mit unterschiedlichen physikalischen Techniken nach ihrem Masse/ Ladungsverhältnis zu trennen. Das Massenspektrometer besteht aus drei Komponenten: der Ionenquelle, dem Massenanalysator und dem Detektor.Zunächst werden die Ionen in einer Ionenquelle gebildet. In diesen Versuchen wurde als Ionisationsmethode die Elektrospray-Ionisierung genutzt. Nachdem die Ionen in der Ionenquelle entstanden sind, werden sie in einem elektrischen Feld auf eine definierte kinetische Energie beschleunigt. Dann werden sie in dem Analysator nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt. Anschließend gelangen die getrennten Ionen nacheinander auf den Detektor, der die Ladung bzw. den Strom misst. Die für diese Versuche verwendete Tandemmassenspektrometrie ist gekennzeichnet durch die Kopplung von mehreren Stufen der

Massenanalyse hintereinander. Zunächst wird die Ionensorte aus einer Mischung im ersten Massenanalysator ausgewählt, um dann in der folgenden Stoßkammer durch Stoß mit inerten Gasmolekülen fragmentiert zu werden. Im nächsten Massenanalysator werden die Fragmentionen dann anhand ihrer Massen aufgetrennt. Vorteile der Methode sind eine hohe Spezifität, die Möglichkeit der Analyse mehrere Stoffe gleichzeitig und ein höheres Analytenspektrum im Gegensatz zu den konventionellen Methoden der Massenspektrometrie (Bowers 1989; Griffiths et al. 2001; Vogeser 2003; Vogeser und Parhofer 2007).
Für die Hormonmessungen in Kiel wurde das LC-MS/MS-Gerät UPLC Quattro Premier/Xe (Waters) verwendet. Die verwendete Methodik zur Analyse verschiedener Hormone und Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese wurde kürzlich von A.E. Kulle veröffentlicht (Kulle et al. 2010) und auch für die Analyse der von uns zugesandten Überstände verwendet. Die androstendion-haltigen Überstände wurden auf Androstendion, Testosteron und weitere Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese untersucht. Dazu gehörten: DHT, 17α- Hydroxyprogesteron, Progesteron, Deoxycorticosteron, 11-Deoxycortisol, Corticosteron und Cortison. Vor der Untersuchung mussten die Proben jedoch mit Festphasenextraktion aufgereinigt werden. Dafür wurden je 100 µl Überstand benötigt, der im Verhältnis 1:1 mit einer 5 % Phosphorlösung gemischt wurde. Dieser Mix wurde dann gevortext, zentrifugiert und die Probe dekantiert. Das Beladen der Platten mit den vorbereiteten Proben fand erst nach einer Konditionierung der Platten mit Methanol und einer Equilibrierung mit H_2O statt. Danach folgten hintereinander zwei Waschvorgänge mit 5 % Ammoniak in H_2O und 10% Methanol. Dann wurden die Steroide mit jeweils 2x 30 µl Isopropanol von der Festphase eluiert und anschließend mit 100 µl H_20 gemischt. Nach dieser Festphasenextraktion wurden die Proben dann im Tandemmassenspektrometer auf die jeweiligen Hormone untersucht. Es wurden pro Zeitpunkt und Zelllinie Mediumüberstände aus drei verschieden Sechs-Loch-Platten untersucht. Die Messungen im Tandemassenspektrometer wurden zweimal wiederholt.

Neben der LC-MS/MS wurde der Überstand außerdem mit gaschromato-graphischen Verfahren (GC-MS) von S. Wudy aus Giessen untersucht

(Adressenverzeichnis siehe 7.5). Die verwendete Methode ist etabliert für die Analyse von Hormonen und Metaboliten der Sexualsteroidbiosynthese und wird überwiegend für klinische Fragestellungen genutzt (Shackleton 1993; Remer et al. 2005). Der Überstand wurde hier auf folgende Produkte der Sexualsteroid-biosynthese untersucht: Testosteron, Östron, Östradiol , Östriol, DHEA, 5-Androsten-3b17a und 3b17b, sowie Androstandiol-Isomere.

2.2.7 Reportergenassay

2.2.7.1 Grundlagen

Als transiente Transfektion wird das zeitweilige Einbringen von Fremd-DNA in eine eukaryontische Zelle bezeichnet. Zur Überwindung der Zellmembran beim Transfer der DNA in die Zelle existieren verschiedene Methoden. In diesen Versuchen wurde hierfür das lipidbasierte aus mehreren Komponenten bestehend FUGENE-HD (Roche) verwendet. FUGENE-HD kann mit DNA Komplexe bilden, welche mit der Zellmembran fusionieren und die DNA somit in die Zelle einschleusen. Vorteile von FUGENE-HD sind die große Transfektionseffizienz bei geringer Toxizität für die Zelle. Mittels FUGENE-HD wurden der AR-Expressionsvektor pSVAR0 und das androgenresponsive Leuchtkäfer-Luziferase Reporterkonstrukt $(ARE)_2$-TATA-Luc sowie ein konstitutiv exprimierendes Renilla-Luziferase Reporterkonstrukt phRGTK (Promega) in CHO-Zellen kotransfiziert. Das pSVAR0- und das $(ARE)_2$-TATA-Luc-Plasmid wurden uns freundlicherweise von Dr. Brinkmann und Dr. G. Jenster (Rotterdam) zur Verfügung gestellt (Jenster et al. 1993). In Abwesenheit von Liganden liegt der AR im Zytoplasma an Hitze-Schock-Proteine gebunden vor. Bei einer Bindung von Hormonen an den AR findet jedoch eine Konformationsänderung statt, wodurch sich der AR von den Hitze-Schock-Proteinen löst und in den Zellkern wandert (Hiort und Holterhus 2000). Im Zellkern bindet der AR an die AREs des $(ARE)_2$-TATA-Luc-Plasmids und führt über Bindung von Kofaktoren zu einer Rekrutierung des RNA-Polymersase II-Komplexes und somit zu einer androgenabhängigen Transkription der Leuchtkäfer-Luziferase. Das entstehende Leuchtkäfer-Protein kann mit seinem Substrat (Luziferin) eine Lichtreaktion katalysieren, deren Intensität gemessen werden kann. Das Lumineszenzsignal korreliert dabei mit der Menge des hormongebunden ARs. Das Lumineszenzsignal hängt jedoch

auch von der Transfektionseffizienz ab. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Reportergenassays mit unterschiedlichen Transfektions-effizienzen untereinander zu erreichen, wurde neben dem androgen-abhängigen$(ARE)_2$-TATA-Luc-Plasmid auch das phRGTK-Plasmid eingebracht. Auf diesem Plasmid ist die Renilla-Luziferase kodiert. Dieses Gen wird konstitutiv exprimiert. Durch Bildung einer Ratio der Lumineszenzsignale Leuchtkäfer-Luziferase/Renilla-Luziferase findet eine Normalisierung der gemessenen Lumineszenzsignale statt. Die Ratio ist somit unabhängig von der Transfektionseffizienz. Die Lumineszenzsignale werden nach Lyse der Zellen der einzelnen Luziferasen getrennt voneinander gemessen.
Jede Probemessung fand in Triplikaten statt und es wurden je drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

2.2.7.2 Vorbereitungen der Zellen

Für die durchgeführten Reportergenassay-Versuche wurden CHO-Zellen verwendet. Diese wurden bei 37 ℃ mit einer 5 %igen CO_2- Atmosphäre zunächst in 175 cm^2 Flaschen vorkultiviert. Bei Erreichen von einer 90 %igen Konfluenz wurden sie trypsiniert, gezählt, in DCC-FCS Medium mit P/S aufgenommen und auf 24-Loch-Platten verteilt. In jede Vertiefung wurden 80.000 Zellen in 500 µl Medium gegeben. Dann wurden die 24-Loch-Platten erneut in den Brutschrank gestellt und die Zellen dort für ca. 22 h zum Wachsen inkubiert.

2.2.7.3 Transfektion

Vor der Transfektion der Plasmide wurden die Zellen noch einmal unter dem Mikroskop auf ihr Wachstum kontrolliert, bevor das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und je 300 µl neues Medium hinzugegeben wurde. Zu den Vertiefungen, die für die Negativkontrollen bestimmt waren, wurden jeweils 500 µl Kulturmedium hinzugegeben, da hier später keine Plasmide und kein Hormon zugefügt wurden.
Aus den ausgewählten Plasmiden (siehe 2.2.7.1) wurde ein DNA-Mix hergestellt, der pro Vertiefung 200 ng $(ARE)_2$-TATA Luc, 5 ng phRGTK und 30 ng pSVAR0 enthielt.

Das FUGENE–HD Transfektionsreagenz wurde unter sterilen Bedingungen nach Herstellerangaben vorbereitet und nach 5 min Inkubationszeit mit dem Plasmidmix gemischt. Dann fand eine Inkubation der Reagenzien für 20 min statt, in der die Komplexe von FUGENE-HD und den DNA-Komponenten gebildet werden konnten. Schließlich wurden je 100 µl/Vertiefung der Reagenzienmischung zu den Zellen gegeben.

2.2.7.4 Hormonzugabe

Nach einer Inkubationszeit von 5 h wurden je 100 µl des Mediumüberstandes, der in den Inkubationsversuchen mit Androstendion gewonnen wurde, (siehe 2.2.1.5) auf die CHO-Zellen gegeben. Dabei wurden für die Triplikatbestimmung Hormonüberstände verwendet, die zwar von demselben Patienten und Zeitpunkt stammten, jedoch aus unterschiedlichen Vertiefungen der 6-Loch-Platten bei der Zellkultur gewonnen wurden. Diese Untersuchung hatte das Ziel, herauszufinden, wie stark die Aktivierungskapazität des ARs durch den Hormonüberstand ist. Dann fand eine Inkubation der Zellen mit dem Hormonüberstand und den Plasmiden für ca.18 h statt.

2.2.7.5 Lysieren der Zellen und Messen im Luminometer

Die Lumineszenzmessung und das Lysieren der Zellen wurde mit Hilfe des Dual-Luziferase-Assay-Kits (Promega) durchgeführt. Dieses Kit enthält Substanzen zur Lyse der Zellen und zur Messung der Lumineszenz sowohl von der Leuchtkäfer- als auch von der Renilla-Luziferase. Die Vorbereitung der Substanzen fand nach Angaben des Herstellers statt. Von den Zellen wurde das Medium abgesaugt, dann wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und schließlich je 100 µl Lysispuffer pro Vertiefung auf die Zellen pipettiert. Nach einer 20 minütigen Inkubationszeit auf dem Schüttler hatten sich die Zellen in dem Lysispuffer vom Boden der Vertiefungen gelöst. Von dieser Lösung wurden jeweils 25 µl/well abgenommen und auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Das Luminometer wurde nach Herstellerangaben vorbereitet, gereinigt und die Platte wurde zur Messung der Proben in die vorgesehene Halterung eingefügt. Die Substrate für die Messung der Leuchtkäfer-Luziferase und der Renilla-Luziferase wurden nach Angaben des Hersteller hergestellt und in die vorgesehene Halterung des Luminometers gestellt. Für jede Probe wurde

zunächst die Lumineszenz der Leuchkäferluziferase gemessen. Hierbei diente als Substrat das Luziferase-Reagenz (Luziferin). Im unmittelbaren Anschluss daran wurde das Stop and Glow Reagenz (Coelenterazin) von dem Luminometer hinzugefügt, welches das Substrat der Renillaluziferase ist, und somit die Lumineszenz der Renillaluziferase gemessen.
Nach der Messung wurde das Gerät gereinigt und die Messergebnisse ausgedruckt.

2.2.7.6 Auswertung der Ergebnisse

Um eine Vergleichbarkeit der drei Wiederholungen untereinander zu gewährleisten, wurden die Ergebnisse mit dem Programm Excel von Microsoft normalisiert. Dabei wurde zunächst der Mittelwert von Scrotum 3/0 h= 100% gesetzt und alle anderen Werte hierzu in Beziehung gesetzt. Dann wurden von den Triplikatbestimmungen jedes einzelnen Versuches für jede Probe der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Von den Ergebnissen der einzelnen Versuche wurden schließlich die endgültigen Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet und graphisch dargestellt.

.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine intrakrine Testosteronsynthese in Genitalhautfibroblasten von 17βHSD 3-Mangel Patienten stattfindet.
Bei gesunden Männern wird Androstendion in den Leydigzellen des Hodens durch die 17β-HSD 3 in Testosteron umgewandelt (Geissler et al. 1994).
In Skrotalhautfibroblasten gesunder Männer findet nur eine minimale Expression der 17β-HSD 3 statt (Hoppe et al. 2006). Die hier verwendeten Genitalhautfibroblasten von Patienten mit 17β-HSD 3-Mangel haben alle die gleiche homozygote Spleißstellenmutation (325 +4 A→T) im HSD17B3 Gen, die zu einer kompletten Inaktivierung der 17β-HSD 3 führt (Boehmer et al. 1999).
Als ein möglicher Testosteronsyntheseweg wird in den betroffenen Individuen eine Umwandlung des Androstendions durch die 17β-HSD 5 diskutiert (Lee et al. 2007). Um diese These zu überprüfen, wurden die Fibroblasten mit Androstendion inkubiert und das Medium nach 0 h, 48 h und 96 h auf einen Abbau von Androstendion und die Synthese von Testosteron und DHT mittels massenspektrometrischen Methoden untersucht. Zusätzlich wurde die Expression der 17βHSD 5 und des AR durch RT-PCR und Immunblots analysiert. Eine Übersicht über den Versuchsaufbau zeigt Abb. 9.

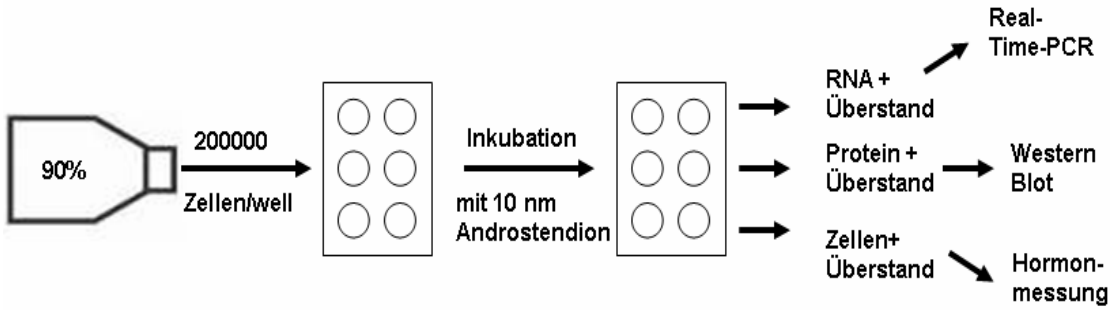


Abb. 9: Zusammenfassende Darstellung der Versuchsdurchführung

Dargestellt ist eine Übersicht des Versuchsaufbaus. Nach einer Vorkultur der Zellen in 175 cm^2 Flaschen wurden je 200000 Zellen/Vertiefung auf 6-Loch-Platten verteilt. Bei einer 90 %igen Konfluenz der Zelllinien in den 6-Loch-Platten fand eine Inkubation mit 10 nM Androstendion statt. Dann wurde nach 0 h, 48 h und 96 h aus je zwei Vertiefungen RNA isoliert, Zellen und Proteine abgenommen und eingefroren. Aus allen Vertiefungen wurde ein Teil des androstendionhaltigen Kulturmediums entnommen. Die RNA und Proteine wurden mit RT-PCR und Western Blot auf die Expression der 17βHSD 5 und des AR untersucht, der Mediumüberstand und die Zellen mit Tandemmassenspektrometrie auf Hormone und Abbauprodukte der Sexualsteroidbiosynthese. Der gesamte Versuch wurde zweimalig durchgeführt.

3.1 Zellkultur der Fibroblasten

Das Wachstum der einzelnen Zelllinien war unterschiedlich, wodurch bis zum Erreichen einer vollständigen Konfluenz eine Wachstumsdauer von ca. 2-4 Wochen erforderlich war. Zur Gewinnung der erforderlichen Zellzahl für die Inkubationsversuche war es vereinzelt nötig, die Zellen in Zellkulturflaschen mit kleineren Volumina anzuzüchten und nach einer erneuten Trypsinierung auf 175 cm^2-Flaschen zu verteilen. Deswegen befanden sich die untersuchten Zelllinien bei der Inkubation mit Androstendion teilweise in unterschiedlichen Passagen. Im ersten Versuch befanden sich alle Zelllinien in der 4.-5. Passage, im zweiten Versuch in der 6.-9. Passage.

3.2 RT-PCR-Analysen

Mit der RT-PCR wurde die mRNA-Akkumulation der 17β-HSD 5 und des ARs in den einzelnen Zelllinien nach 0 h, 48 h und 96 h untersucht. Nach der RNA Isolierung wurde die RNA jeder Zelllinie zunächst mit einem Bioanalyzer (Agilent) hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität überprüft. Die Qualität wurde anhand eines Elektropherogramms mit der RIN bestimmt (siehe 2.2.2.2). Als Qualitätskriterium wurde in diesen Versuchen eine RIN von mindestens 9 vorausgesetzt. Alle verwendeten mRNAs zeigten eine RIN zwischen 9-10. Die Konzentrationen der isolierten RNA variierten zwischen den einzelnen Zelllinien und Zeitpunkten zwischen 50 ng/µl - 350 ng/µl. Für die nachfolgende cDNA-Synthese wurden jeweils 1 µg RNA pro Reaktion eingesetzt. Falls die ermittelte Konzentration zu niedrig war, wurde die RNA gefällt. Nach der cDNA-Synthese wurde die RNA noch einmal 1:10 verdünnt, so dass für die RT-PCR pro Probe eine cDNA-Menge vorhanden war, die 10 ng Gesamt-RNA entsprach. Mit der RT-PCR wurde die mRNA-Akkumulation der 17β-HSD 5, des AR und der PBGD untersucht. Die PCR-Bedingungen für die untersuchten Gene wurden zuvor in unserer Arbeitsgruppe optimiert (Hoppe et al. 2006) und für diese Arbeit verwendet. Ein Probe PCR-Lauf mit 1:10 verdünnten cDNA-Proben und den verwendeten Primern (siehe 7.3; Tab. 32) ergab, dass auch bei verdünnter cDNA ein Nachweis der mRNA-Akkumulation der 17β-HSD 5 und des ARs in allen Zelllinien möglich war. Dabei lagen die CP-Werte für die 17β-HSD 5 bei 21-24, für den AR und PBGD jeweils bei 27-30.

Die Spezifität der gewonnen PCR-Produkte wurde am Ende jedes PCR-Laufes mit einer Schmelzkurve überprüft (Abb.10) .

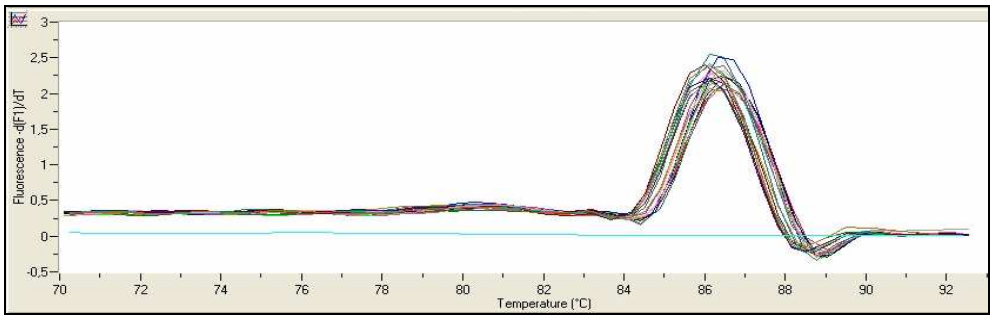


Abb. 10: Schmelzkurvenanalyse zur Spezifitätsprüfung von PCR-Produkten

Dargestellt ist eine typische Schmelzkurve nach Messung der mRNA-Akkumulation des AR mit Real-Time-PCR in den untersuchten Normalkontrollen. Die Schmelztemperatur des AR-Fragmentes liegt bei 86℃ (Hoppe et al. 2006). Durch den einheitlichen Anstieg der Kurven bei dieser Temperatur kann gesehen werden, dass es sich um spezifische Produkte handelt. Bei einem Entstehen von unspezifischen Produkten wäre ein mehrgipfelige Schmelzkurve vorhanden. Die Negativkontrolle (hellblau) enthält kein Produkt und zeigt somit keinen Anstieg.

Eine weitere Spezifitätsprüfung fand durch das Auftragen der gewonnenen PCR-Produkte auf ein Agarosegel statt (Abb.11). Hierdurch konnte die spezifische Fragmentlänge der PCR-Produkte (Tab.34) ermittelt und die Entstehung von Primerdimeren ausgeschlossen werden.

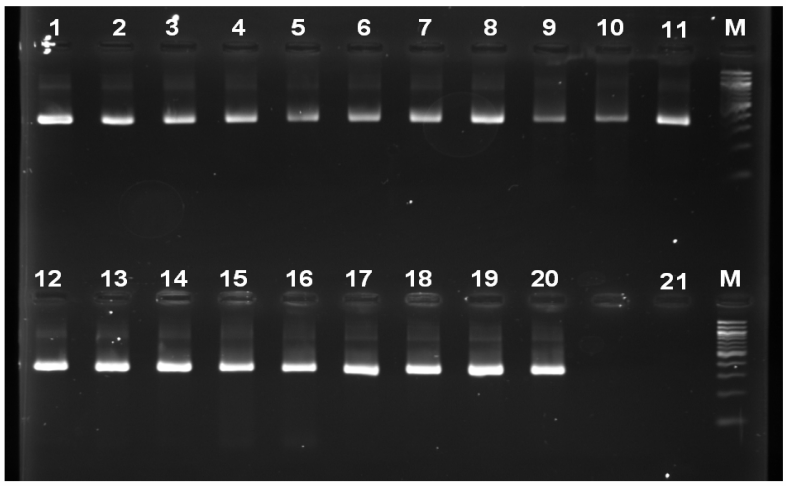


Abb. 11: Agarosegel zur Prüfung der spezifischen Fragmentlänge von PCR-Produkten

Dargestellt ist ein 2 %iges Agarosegel, auf das die PCR-Produkte von Patientenzellen nach Messung der mRNA-Akkumulation der 17βHSD 5 aufgetragen wurden. Die Fragmentlänge des spezifischen PCR-Produktes der 17βHSD 5 liegt bei 328 bp. (Proben 1-20= PCR-Produkte der Patientenzellen jeweils zu 0 h, 48 h und 96 h in Duplikaten, Probe 21= Negativkontrolle; M= 100 bp Marker).

Die Bestimmung der mRNA-Akkumulation fand in Duplikaten statt. Jeder PCR-Lauf wurde zweimal wiederholt.

3.3 mRNA-Expressionsprofil nach Inkubation mit Androstendion

Die relativen mRNA-Mengen wurden mit der Relative Quantification Software (Roche) ausgewertet. Dabei wird der relative Expressionsunterschied als Verhältnis zwischen Proben und Kontrollproben in Bezug auf eine Standardprobe und in Normalisierung zum Referenzgen angegeben. Es wurden pro untersuchtem Transkript immer zwei Real-Time-PCR-Analysen durchgeführt, so dass je zwei Analysen von der Referenz-cDNA mit je zwei Analysen von der Ziel-cDNA miteinander verglichen werden konnten. Daraus ergaben sich schließlich pro Transkript vier verschiedene normalisierte effizienzkorrigierte CP-Verhältnisse, deren Mittelwert als Auswertungsgrundlage diente (siehe 7.4; Tab. 35-38).

3.3.1 Expressionsprofil der 17β-HSD 5 mRNA

Die 17β-HSD 5 katalysiert die Umwandlung von Androstendion zu Testosteron im peripheren Geweben (Labrie et al. 2000). In den untersuchten Zellen konnte die mRNA der 17β-HSD 5 sowohl in den Skrotalhautfibroblasten der Normalkontrollen als auch in den Genitalhautfibroblasten der Patienten mit 17β-HSD 3 Mangel zu 0 h, 48 h und 96 h nach Androstendioninkubation nachgewiesen werden. In der Basalexpression zu 0 h nach Androstendioninkubation waren Unterschiede im Expressionsprofil zwischen den einzelnen Zelllinien sichtbar (Abb. 12; Tab 35-36). So zeigten sich im ersten Versuch Streubreiten in der basalen mRNA-Akkumulation der 17β-HSD 5 mit relativen Expressionswerten zwischen 1,31-9,26 und im zweiten Versuch zwischen 2,4-25,87. Ein Vergleich der beiden durchgeführten Versuche machte deutlich, dass außerdem Schwankungen in der Basalexpression der 17-HSD 5 innerhalb derselben Zelllinie bestehen. Die stärksten Schwankungen zeigte hierbei die Zelllinie ARD 1373, die im ersten Versuch eine relative Expression mit Ratio-Werten von 3,96 und im zweiten Versuch mit Ratio-Werten von 25,87 aufwies. Die geringsten Schwankungen wies die Zellinie ARD 1318 auf, die in beiden Versuchen ein eher niedriges basales Expressionslevel mit Ratio-Werten von 2,37 zeigte. Nach Androstendioninkubation ist im ersten Versuch in allen Zelllinien eine geringfügige Zunahme der mRNA-Akkumulation der 17β-HSD 5 mit Steigerungsraten von 2,2-6,5 sichtbar. Diese ist besonders ausgeprägt bei der Patientenzelllinie ARD 111, bei der eine Steigerung des Transkriptionslevels auf

das Sechsfache des Ausgangswertes vier Tage nach Androstendioninkubation sichtbar war. Im Wiederholungsversuch zeigte sich bei ARD 111 nach 96 h jedoch nur noch eine Steigerung auf das Dreifache des Ausgangswertes und auch bei den anderen Zelllinien ist die Expressionssteigerung der 17β-HSD 5 mRNA im zweiten Versuch geringer ausgeprägt als im ersten Versuch (Abb.12; Tab. 35-36).

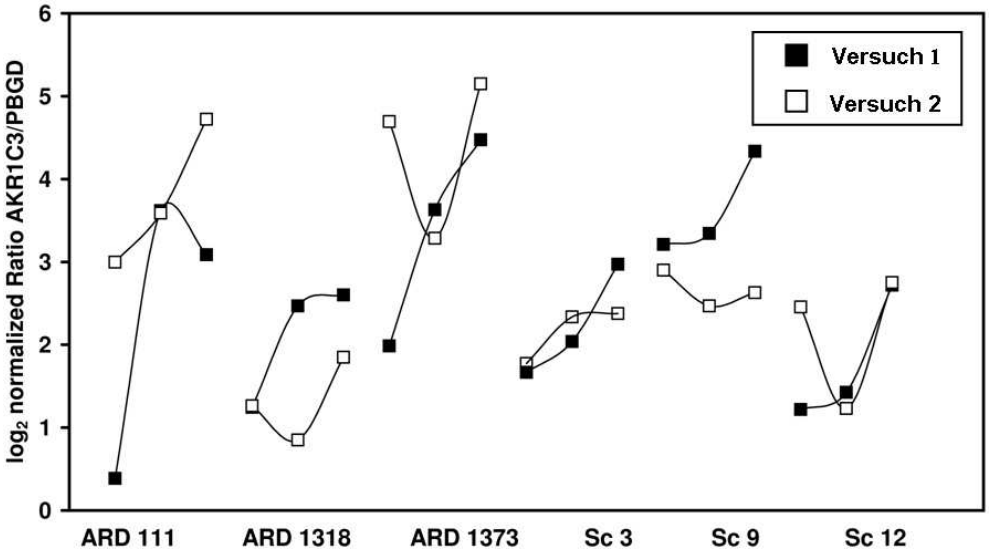


Abb. 12: Einfluss von Androstendion auf die mRNA-Akkumulation der 17ß-HSD 5
Dargestellt ist die relative Expression der 17βHSD 5 (AKR1C3) nach Inkubation mit 10 nM Androstendion zu den Zeitpunkten 0 h, 48 h und 96 h in den Genitalhautfibroblasten der Patienten mit 17βHSD 3-Mangel (ARD) und in den Skrotalhautzellen der Normalkontrollen (Sc). Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (Versuch 1→ schwarze Kästen, Versuch 2 → weiße Kästen) Die ermittelten normalisierten relativen Expressionsverhältnisse der 17βHSD 5-mRNA befinden sich in Tab. 35-36.

3.3.2 Expressionsprofil der Androgenrezeptor mRNA

Neben der 17β-HSD 5 wurde auch die mRNA-Akkumulation des ARs, der die androgene Wirkung in den Zellen vermittelt, untersucht. Die mRNA des ARs wird sowohl in den Patienten- als auch in den Normalkontrollzelllinien zu den Zeitpunkten 0 h, 48 h und 96 h nach Androstendioninkubation exprimiert. In beiden Versuchen waren Unterschiede im basalen Expressionslevel der AR mRNA sichtbar. Im ersten Versuch schwankten die relativen Expressionslevel zwischen 2,87-14,21 und im zweiten Versuch zwischen 2,16-25,68 (Abb. 13; Tab. 37-38). Dabei wies in beiden Versuchen die Patientenzelllinie ARD 1318 das niedrigste und die Patientenzelllinie ARD 1373 das höchste basale AR-Expressionslevel auf. Insgesamt waren nur geringe Schwankungen innerhalb einer Zelllinie zwischen den beiden Versuchen in der Basalexpression des ARs sichtbar.

Nach Androstendioninkubation zeigte sich v.a. im ersten Versuch ein leichter Anstieg des mRNA-Expressionslevels in allen Zelllinien. Im Wiederholungsversuch war dieser nicht sichtbar, bzw. geringer ausgeprägt. Bei den Zelllinien ARD 1318, Scrotum 9 und Scrotum 12 war im zweiten Versuch kein Unterschied der relativen Expressionsverhältnisse zwischen 0h und 96 h sichtbar. (Abb. 13; Tab. 37-38)

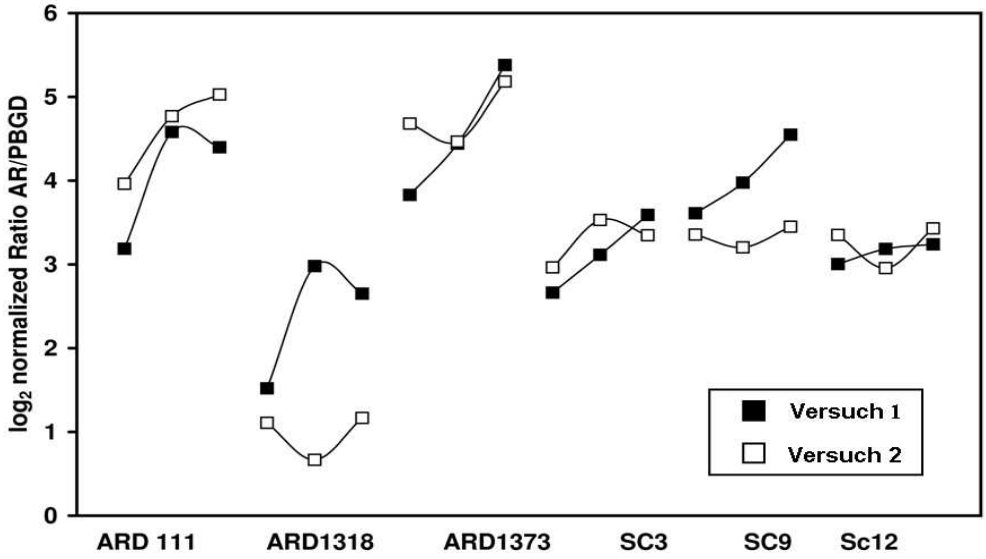


Abb. 13: Einfluss von Androstendion auf die mRNA-Akkumulation des ARs

Dargestellt ist die mRNA-Akkumulation des ARs zu den Zeitpunkten 0 h, 48 h und 96 h in den Genitalhautfibroblasten der Patienten mit 17β-HSD 3 Mangel (ARD) und in den Skrotalhautzellen der Normalkontrollen (Sc) nach Inkubation mit 10 nM Androstendion. Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (schwarze Kästen→ erster Versuch, weiße Kästen→ zweiter Versuch). Die ermittelten normalisierten relativen Expressionsverhältnisse der AR-mRNA befinden sich in Tab. 37-38.

3.4 Protein-Expressionsprofil nach Inkubation mit Androstendion

Den Ergebnissen der RT-PCR Untersuchungen zufolge ist in allen untersuchten Zelllinien eine Expression der mRNA des ARs und der 17β-HSD 5 vorhanden (Abb. 12-13). Zur Überprüfung, ob die mRNA translatiert wird, wurden Western Blots mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Für den AR wurde der Antikörper AR (F.39.4.1) verwendet, welcher schon zuvor in Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit Proteinlysaten von Genitalhautfibroblasten genutzt wurde (Bebermeier et al. 2006). Für die 17βHSD 5, bzw. AKR1C3, wählten wir den Antikörper von Novus aus. Mit diesem Antikörper wurden zuvor noch keine Western Blots mit Genitalhautfibroblasten durchgeführt. Aus diesem Grund wurde ein Probe-Western Blot mit dem AKR1C3-Antikörper und seinem

Sekundärantikörper durchgeführt. Als Proben verwendeten wir die hierfür von dem Hersteller beschriebenen Positivkontrolle (Leber) und schon vorhandene Proteinlysate von humanen Vorhautfibroblasten (hVhF). In dem Probe-Western Blot zeigte sich bei allen Proben eine spezifische Bande bei 35 kDa, welches dem 17β-HSD 5 Protein entspricht (Abb.14). Somit wurde dieser Antikörper auch für den Proteinnachweis in den Patientenproben genutzt.

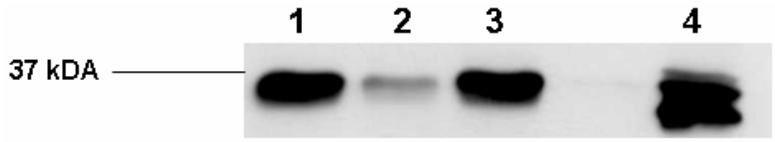


Abb. 14: Expressionsprüfung des 17β-HSD 5 Proteins in Leber und Vorhaut

Das Protein der 17β-HSD 5 kann mit dem Antikörper AKR1C3 und seinem entsprechendem Sekundärantikörper (Anti-goat) nachgewiesen werden. Die Größe des 17β-HSD 5 Proteins liegt bei 35 kDa, welches in allen Proben vorhanden ist. Probe 4 (Leber) war aufgrund eines wiederholten Auftauens teilweise degradiert (1-3: hVhF; 4: Leber).

Die durchgeführten Western Blots wurde mit einer CCD-Kamera detektiert. Die Auswertung der Western Blots, die mit den aus den Zellkulturversuchen gewonnen Proteinlysaten durchgeführt wurden, fand mit der Quantity-One-Software (BIO-RAD) statt. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde eine Ratio Zielprotein/Aktin gebildet, welche als Auswertungsgrundlage diente (siehe 7.4; Tab. 39-42)

3.4.1 Expressionsprofil des 17β-HSD 5 Proteins

Die Ergebnisse des Western Blots mit dem AKR1C3-Antikörper zeigten, dass in allen untersuchten Zelllinien zu den Zeitpunkten 0 h, 48 h und 96 h eine Expression des 17β-HSD 5 Proteins vorhanden ist (Abb.15; Tab.39-40). Dabei waren in beiden Versuchen starke Unterschiede im basalen Expressionslevel des 17β-HSD 5 Proteins zwischen den einzelnen Zelllinien sichtbar. Zum Zeitpunkt 0 h nach Androstendioninkubation waren Streubreiten der relativen Expression mit Ratio-Werten zwischen 0,05-0,76 im ersten Versuch und 0,1-1,76 im zweiten Versuch vorhanden. Bei einem Vergleich der beiden Versuche untereinander zeigten sich auch zwischen den einzelnen Zelllinien starke Unterschiede in der Basalexpression. So wies die Patientenzelllinie ARD 1373 im ersten Versuch eine basale Expression mit einem Ratio-Wert von 0,13 und im zweiten Versuch mit einem Ratio-Wert von 1,76 auf. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis der RT-PCR, in dem bei der Zelllinie ARD 1373

auch ein höheres basales Expressionslevel im zweiten Versuch im Vergleich zum ersten Versuch sichtbar war. Vier Tage nach Androstendioninkubation war im ersten Versuch in allen Zelllinien, bis auf Scrotum 9, eine geringe Expressionssteigerung des 17β-HSD 5 Proteins zu erkennen. So zeigten die Zelllinien ARD 111 und Scrotum 12 nach 96 h eine Steigerung bis auf das 5-fache der basalen Expressionsrate. Im zweiten Versuch war die Expressionssteigerung insgesamt jedoch geringer ausgeprägt und bei der Zelllinie ARD 1373 war sogar eine Abnahme der Proteinexpression nach 96 h sichtbar (Abb.15+16; Tab. 39-40).

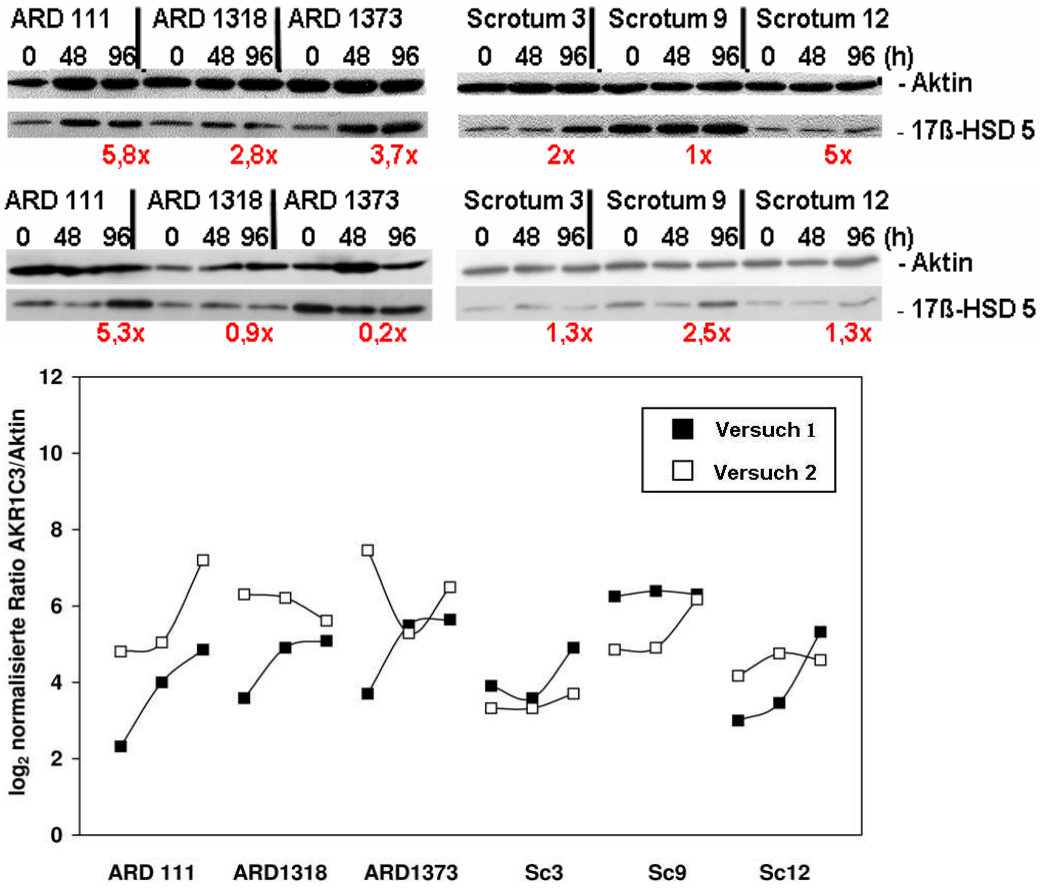


Abb. 15+16: Einfluss von Androstendion auf die Akkumulation des 17β-HSD 5-Proteins

Abb.15: Dargestellt ist die Proteinexpression der 17β-HSD 5 zu 0 h, 48 h und 96 h in Genitalhautfibroblasten von 17β-HSD 3-Mangel Patienten (ARD) und in Skrotalhautfibroblasten der Normalkontrollen (Sc) nach Inkubation mit 10 nM Androstendion. Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche (1 → oberer WB und 2→ unterer WB) durchgeführt. Die Größe des Zielproteins der 17β-HSD 5 liegt bei 35 kDa; die des Referenzproteins Aktin bei 42 kDA . Die roten Ziffern kennzeichnen den Expressionsanstieg 96 h nach Inkubation mit Androstendion.

Abb. 16: Zum besseren Verständnis wurden die Ratio-Werte außerdem graphisch dargestellt. Die ermittelten relativen Expressionsverhältnisse des 17β-HSD 5-Proteins befinden sich in Tab. 39-40.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse des Western Blots eine gute Korrelation mit denen der RT-PCR. Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA Ebene ist in allen Zelllinien eine interindividuelle Expression der 17β-HSD 5 und eine geringe Expressionssteigerung nach Androstendioninkubation sichtbar.

3.4.2 Expressionsprofil des Androgenrezeptor Proteins

Das Protein des AR wurde sowohl in den Patientenproben als auch in den Normalkontrollen exprimiert. Dabei waren starke Unterschiede im basalen Expressionsprofil zwischen den einzelnen Zelllinien vorhanden (Abb. 17+18, Tab. 41-42). Im ersten Versuch waren Streubreiten der relativen Expression mit Ratio-Werten von 0,34-2,03 sichtbar und im zweiten Versuch mit Ratio-Werten von 0,65-1,27. Dabei zeigte in beiden Versuchen die Patientenzelllinie ARD 1373 die höchste basale relative Expression des AR-Proteins. Beim Vergleich zwischen den einzelnen Versuchen konnten auch geringe Unterschiede in der basalen relativen Expression des AR-Proteins innerhalb einzelner Zelllinien gesehen werden. Diese waren am stärksten ausgeprägt bei der Normalkontrollzelllinie Scrotum 9, die im ersten Versuch ein basale relative Expression mit einem Ratio-Wert von 1,78 und im zweiten Versuch mit einem Ratio-Wert von 0,76 zeigte. Die basale Expressionsrate ist im zweiten Versuch in allen Zelllinien geringer als im ersten Versuch.
Vier Tage nach der Inkubation der Zellen mit Androstendion war bei allen Zelllinien eine geringe Steigerung der Proteinakkumulation zu erkennen. So waren im ersten Versuch bei den Normalkontrollzelllinien Scrotum 3 und 9 relative Steigerungen der Proteinakkumulation auf das Fünffache des Ausgangswertes sichtbar. Die Steigerungsraten waren im zweiten Versuch jedoch insgesamt geringer ausgeprägt (Abb.17+18; Tab.41-42).

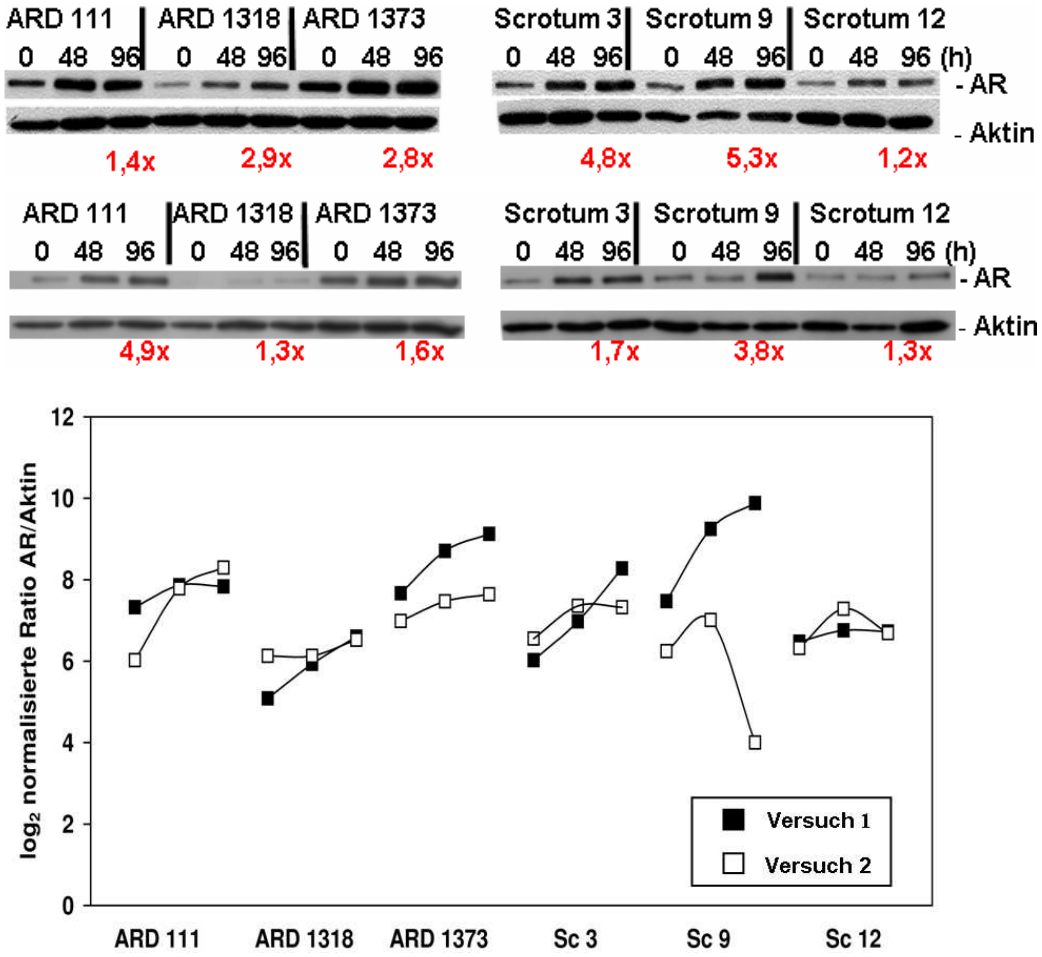


Abb. 17+18: Einfluss von Androstendion auf die Akkumulation des AR Proteins

Abb. 17: Dargestellt ist die Proteinexpression des AR-Proteins zu 0 h, 48 h und 96 h in Genitalhautfibroblasten der Patienten mit 17β-HSD 3 Mangel (ARD) und in Skrotalhautfibroblasten der Normalkontrollen (Sc) nach Inkubation mit 10 nM Androstendion. Die Größe des Zielproteins des ARs liegt bei 100 kDa, die des Referenzproteins Aktin bei 42 kDa. Die roten Ziffern kennzeichnen den Expressionsanstieg 96 h nach Inkubation mit Androstendion.

Abb. 18: Zum besseren Verständnis wurden die Ratio-Werte außerdem graphisch dargestellt. Die ermittelten relativen Expressionsverhältnisse des AR-Proteins befinden sich in Tab. 41-42.

3.5 Untersuchung der Mediumüberstände auf Hormone und Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese

An den bisherigen Ergebnissen ist sichtbar, dass eine Expression der 17β-HSD 5 und des ARs in allen untersuchten Zelllinien sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene vorhanden ist. Im ersten Versuch konnte außerdem in allen Zelllinien eine geringe Steigerung der Expression der 17β-HSD 5 und des ARs vier Tage nach Inkubation mit Androstendion nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob in den Genitalhautfibroblasten eine Umwandlung des hinzugefügten Androstendions in Testosteron stattgefunden hat, wurde die Konzentration von Androstendion, Testosteron und DHT von A.E. Kulle

(Adressenverzeichnis siehe 7.5) mittels LC-MS/MS bestimmt. In den Untersuchungen war ein kontinuierlicher Abfall des Androstendions über den Zeitraum von vier Tagen in allen untersuchten Proben sichtbar (Abb.19). Unmittelbar nach der Androstendioninkubation konnten Konzentrationen von 11,8-15,5 nmol/l in den einzelnen Proben gemessen werden. Nach zwei Tagen konnte im ersten Versuch jedoch nur in der Patientenzelllinie ARD 1318 eine relevante Androstendionkonzentration mit 4,8 nmol/l gemessen werden, während in den anderen Zelllinien die Androstendionkonzentrationen an der Nachweisgrenze des Tandemmassenspektrometers lagen (Abb.19, Tab.43-44). Dagegen waren im zweiten Versuch zwei Tage nach Hormoninkubation noch in allen Zelllinien messbare Androstendionkonzentrationen mit Werten zwischen 1,8-5,6 nmol/l nachweisbar, welche nach vier Tagen auf Werte zwischen 0,2-1,5 nmol/l fielen. Die geringste Abnahme der Androstendionkonzentration zeigte in beiden Versuchen die Patientenzelllinie ARD 1318, die vier Tage nach der Hormoninkubation im ersten Versuch noch eine Androstendionkonzentration von 2,0 nmol/l und im zweiten Versuch von 1,5 nmol/l, aufwies (Abb.19; Tab. 43-44).

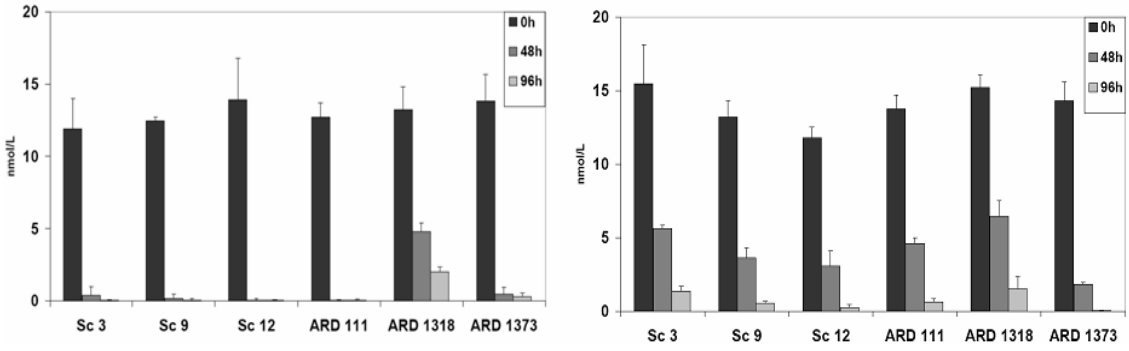


Abb. 19: Abnahme der Androstendionkonzentration in den gewonnen Mediumüberständen nach Inkubation der Zellen mit 10 nM Androstendion

Die untersuchten Zellen wurden zu 0 h mit 10 nM Androstendion inkubiert. Zu 0 h, 48 h und 96 h fand eine Messung der Androstendionkonzentrationen (nmol/l) in den gewonnen Zellkulturüberständen sowohl bei den Patientenzelllinien (ARD) als auch bei den Normalkontrollzelllinien (Sc) statt. Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche (1→ links; 2→ rechts) durchgeführt. Die Werte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar (Tab.43-44). Die Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an.

Trotz der abnehmenden Androstendionkonzentrationen war kein Anstieg von Testosteron innerhalb des Zeitraumes von vier Tagen sichtbar. Die gemessenen Testosteronkonzentrationen lagen in beiden Versuchen überwiegend an der Nachweisgrenze des Tandemmassenspektrometers zwischen 0,1-0,5 nmol/l und unterlagen somit großen Schwankungen (Abb.20,

Tab. 45-46). Insgesamt zeigte sich keine Korrelation zwischen den gemessenen Androstendion- und Testosteronkonzentrationen. Ein kontinuierlicher Anstieg der Testosteronkonzentrationen über den Zeitraum von vier Tagen konnte nicht nachgewiesen werden.

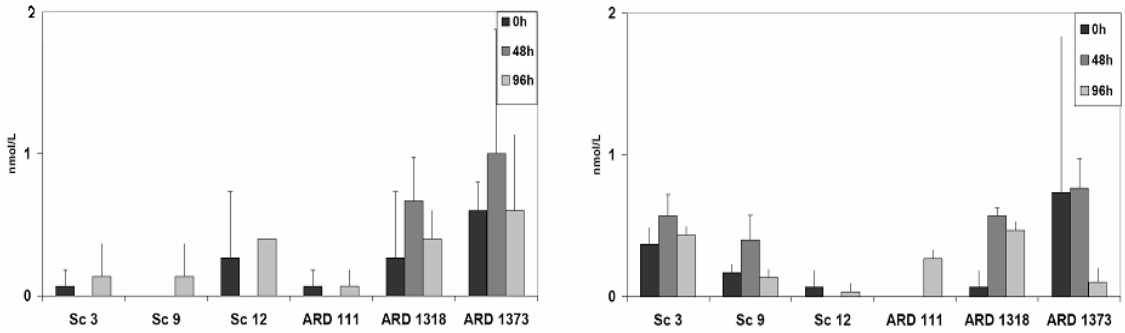


Abb. 20: Testosteronkonzentrationen in den gewonnen Mediumüberständen nach Inkubation der Zellen mit 10 nM Androstendion

Die untersuchten Zellen wurden zu 0h mit 10 nM Androstendion inkubiert. Zu 0h, 48 h und 96 h fand eine Messung der Testosteronkonzentration (nmol/l) im Zellkulturmedium sowohl bei den Patientenzelllinien (ARD) als auch bei den Normalkontrollen statt (Sc). Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche (1→ links; 2→ rechts) durchgeführt. Die Werte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar (Tab.45-46). Die Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an.

Um eine Umwandlung des Testosterons oder Androstendions in das potentere Androgen DHT oder einen Abbau dieser Hormone innerhalb von zwei Tagen auszuschließen, wurde der Mediumüberstand außerdem auf DHT und sechs weitere Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese untersucht. Zu diesen gehören: 17α-Hydroxyprogesteron, Progesteron, Deoxycorticosteron, 11-Deoxycortisol, Corticosteron, Cortisol. Es konnten aber mittels LC-MS/MS in den Mediumüberständen keine weiteren Hormone oder Abbauprodukte identifiziert werden. Zusätzlich fand eine tandemmassenspektrometrische Untersuchung der extrahierten Zellen hinsichtlich eventuell intrazellulär gebundener Androgene statt. Hierbei konnten ebenfalls keine Androgene nachgewiesen werden. Eine weitere Untersuchung auf Hormone und Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese im Überstand wurde mit gaschromato-graphischen Methoden von Stefan A. Wudy (Adressenverzeichnis siehe 7.5) durchgeführt. Hierbei wurde der Überstand auf folgende Metabolite untersucht: Testosteron, Östron, Östradiol, Östriol, DHEA, 5-Androsten-3b17a und 3b17b, sowie Androstandiol-Isomere. Die Ergebnisse bestätigten einerseits, dass keine relevanten Mengen von Testosteron von den untersuchten Zellen produziert wurden und zeigten anderseits, dass auch weitere Metabolite der

Sexualsteroidbiosynthese nicht oder in nur sehr geringen Konzentrationen in den Überständen vorhanden waren.

Für die durchgeführten Inkubationsversuche wurden mit 10 nM Androstendion Konzentrationen verwendet, die der physiologischen Konzentration im Serum von gesunden Männern entsprechen (Mendonca et al. 2000). Im Serum von Patienten mit 17βHSD 3-Mangel können jedoch teilweise Androstendion-konzentrationen von bis zu 50 nM gemessen werden (Lee et al. 2007). Um zu überprüfen, ob unter supraphysiologischen Substratdruck eine Testosteron-synthese in den Genitalhautfibroblasten stattfindet, führten wir einen weiteren Inkubationsversuch mit 700 nM Androstendion durch. Hierbei war im Gegensatz zu den 10 nM Inkubationsversuchen ein kontinuierlicher Anstieg von Testosteron über den Zeitraum von vier Tagen sichtbar. Nach 96 h konnten durchschnittlich Testosteronwerte von 16 nM nachgewiesen werden (Abb. 21; Tab. 47)

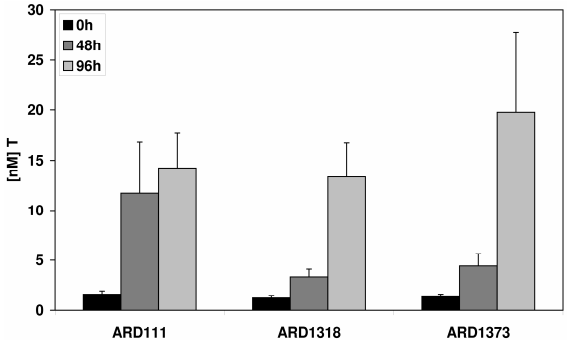


Abb. 21: Testosteronkonzentrationen in den gewonnen Mediumüberständen nach Inkubation der Zellen mit 700 nM Androstendion

Die untersuchten Zellen wurden zu 0h mit 700 nM Androstendion inkubiert. Zu 0 h, 48 h und 96 h fand eine Messung der Testosteronkonzentration (nmol/l) im Zellkulturmedium statt. ARD bezeichnet die jeweilige Patientenzelllinie. Die Werte stellen die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Messungen dar (Tab.47). Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an.

3.6 Androgene Wirkung der Kulturüberstände

In den vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass in den Überständen nach Inkubation der Zellen mit physiologischen Androstendionkonzentrationen kein wesentlicher Anstieg von Testosteron oder DHT stattgefunden hat. Um herauszufinden, ob im Überstand androgen wirksame Substanzen vorhanden waren, wurde ein Reportergenassay durchgeführt. Dazu wurde in CHO-Zellen ein AR-Expressionsplasmid zusammen mit einem androgenresponsiven Leuchtkäfer-Luziferase-Reportergen und einem konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase-Reportergen kotransfiziert. Nach Zugabe des androstendionhaltigen

Mediums aus den Inkubationsversuchen wurde die AR-Aktivierungskapazität anhand der relativen Leuchtkäfer-Luziferaseexpression gemessen.
Die Ergebnisse der beiden durchgeführten Versuche zeigten, dass in allen untersuchten Zelllinien die AR-Aktivierungskapazität über den Zeitraum von vier Tagen abnimmt. Diese Abnahme war zwischen den einzelnen Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt. Die Patientenzelllinie ARD 111 zeigte in beiden Versuchen nach vier Tagen die stärkste Abnahme der androgenen Aktivierungskapazität um ca. 60-70 %. Dagegen war bei der Normalkontroll-zelllinie Scrotum 9 nur eine geringe Abnahme der AR-Aktivierungskapazität sichtbar, die im ersten Versuch 21 % und im zweiten Versuch sogar nur 7,5 % betrug (Abb. 22; Tab. 48-49).

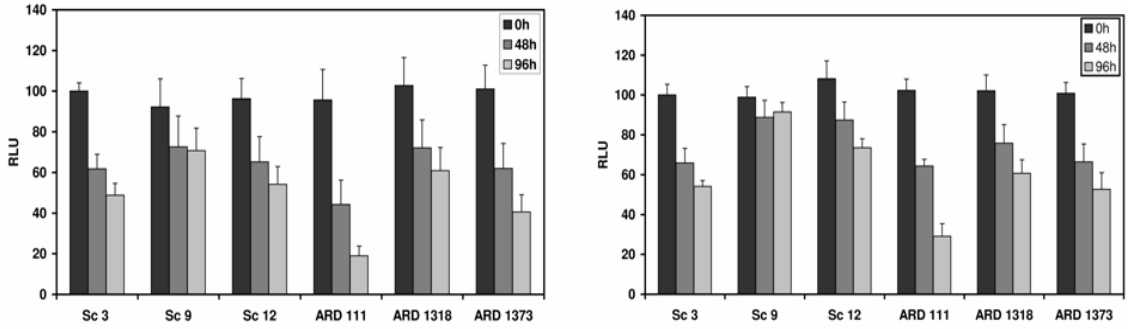


Abb. 22: Abnahme der AR-Aktivierungskapazität des androstendionhaltigen Mediums

Dargestellt sind die relativen Werte der AR-Aktivierungskapazität des aus den Inkubationsversuchen gewonnen Mediums der einzelnen Zelllinien. Es zeigt sich in allen Zelllinie eine kontinuierliche Abnahme der AR-Aktivierungskapazität des Mediums innerhalb des Zeitraumes von vier Tagen. Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (1→ links; 2→ rechts). Die Werte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Triplikatbestimmungen dar (Tab. 48-49). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. (RLU= relative Luziferaseeinheiten)

Insgesamt zeigte sich eine Korrelation der Ergebnisse des Reportergenassays mit denen der Androstendionmessung. Im zweiten Versuch konnten nach 48 h noch Androstendionkonzentrationen von 1,8-5,6 nmol/l gemessen werden. In den Mediumüberständen von der Patientenzelllinie ARD 1373 konnte im zweiten Versuch z.B. noch eine Androstendionkonzentration von 1,8 nmol/l bestimmt werden. Bei Anwenden dieser Konzentration auf die Dosis-Antwort-Kurve von Androstendion (Kap.1.3, Abb. 5) würde diese unter Zellkultur-bedingungen eine 50-60 %ige AR-Aktivierungskapazität bewirken. In den Ergebnissen des Reportergenassays zeigte ARD 1373 im zweiten Versuch eine AR-Aktivierungskapazität von 52,7 %. Jedoch kann vier Tage nach Androstendioninkubation keine Korrelation mehr zwischen den im Überstand

gemessenen Androstendionwerten und der AR-Aktivierungskapazität der Überstände hergestellt werden. Die Androstendionwerte liegen hier überwiegend an der Nachweisgrenze der Tandemmassenspektrometrie, während der Reportergenassay dagegen eine deutlich höhere Sensitivität aufweist.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob unter *in-vitro* Bedingungen eine intrakrine Testosteronsynthese in Genitalhaut- und Skrotalhautfibroblasten stattfindet. Als verantwortliches Enzym für die Testosteronsynthese wird in dieser Lokalisation die 17β-HSD 5 vermutet (Lee et al. 2007). Zur Klärung der Fragestellung wurde das Expressionsprofil der 17β-HSD 5 nach Androstendioninkubation sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in Genitalhautfibroblasten von Patienten mit 17β-HSD 3-Mangel und in Skrotalhautfibroblasten von gesunden Männern untersucht. Zusätzlich fand eine Untersuchung der mRNA- und Proteinakkumulation des ARs nach Androstendioninkubation statt, der die androgene Wirkung in den Zielzellen vermittelt. Eine mögliche Testosteronsynthese in der Genitalhaut wurde mittels massenspektrometrischen Methoden geprüft. Weiterhin wurde die androgene Aktivierungskapazität des Kulturmediums mit einem Reportergenassay bestimmt.

Um möglichst vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, war in dieser Arbeit die Auswahl geeigneter Zelllinien von besonderer Bedeutung. Als Einschluss-kriterium für die Zelllinien galt, dass sie aus demselben androgenabhängigen Gewebe stammten. Für die Patientenzelllinien wurden Genitalhautfibroblasten ausgewählt, welche sich unter dem Einfluss von Androgenen in der Embryonalentwicklung differenzieren (Hiort 2000). Aufgrund ihrer Funktion in der Sexualentwicklung wurden Genitalhautfibroblasten schon in zahlreichen Studien zur Untersuchung geschlechtsspezifischer Genexpression verwendet (Brown und Migeon 1981; Theintz et al. 1989; Elmlinger et al. 2001; Holterhus et al. 2003; Thiele et al. 2005; Hoppe et al. 2006). Die Bedingungen für die Zellkultur von Genitalhautfibroblasten sind somit etabliert. Als Normalkontrollen wurden Skrotalhautfibroblasten gesunder Männer ausgewählt, welche aus demselben embryonalen Strukturen wie Genitalhautfibroblasten entstammen und somit ähnliche Gen-Expressions-Muster zeigen (Holterhus et al. 2007). Als weiteres Einschlusskriterium für die Fibroblasten galt, dass nur eine minimale Expression der 17β-HSD 3 in den ausgewählten Zelllinien vorhanden war. Die Patientenzelllinien wiesen alle die homozygote Spleißstellen-Mutation

325+4 A→T auf. Diese Mutation führt zu einem kompletten Funktionsverlust des 17β-HSD 3-Enzyms, wodurch eine Testosteronsynthese durch die 17β-HSD 3 ausgeschlossen werden konnte (Boehmer et al. 1999). In Skrotalhaut-fibroblasten wird die 17β-HSD 3 nur minimal exprimiert (Hoppe et al. 2006). Die Gewinnung von Genitalhautproben setzt eine Operation und eine Einwilligung des Patienten zur Verwendung des gewonnen Materials zur Forschungs-zwecken voraus, weswegen nicht unbegrenzt Material zur Verfügung steht. Die in dieser Arbeit definierten Einschlusskriterien schränkten die Auswahl von geeigneten Zellkulturen weiterhin ein. Jedoch konnten wir für unsere Untersuchungen trotz der geringen Inzidenz des 17β-HSD 3-Mangels drei Zelllinien auswählen, die den definierten Einschlusskriterien entsprachen. Zusätzlich waren in dem Zellkulturbestand des endokrinologischen Labors der Kinderklinik drei Normalkontrollen vorhanden, die ein ähnliches Altersprofil wie die ausgewählten Patientenzelllinien zeigten.
Es wurde darauf geachtet, Zellkulturen in möglichst niedrigen Passagen zu verwenden, da durch eine Schädigung der Zellen und des Zellkulturverbandes beim Trypsinieren die Zellen mit zunehmender Passage ein verändertes Wachstums- und Expressionsmuster zeigen (Rubin 1997).

Für die weiteren Untersuchungen der aus den Zellkulturen gewonnen Produkte wurden verschiedene Methoden verwendet. Vor der Diskussion der Ergebnisse werden im Folgenden kurz die Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden dargestellt und somit die Begründung für deren Auswahl näher erläutert.

Real-Time-PCR

Für die Untersuchung des mRNA Expressionsprofils der 17β-HSD 5 und des ARs wurde die Zwei-Schritt-Real-Time-PCR ausgewählt.
Der Vorteil des Durchführens der Real-Time-PCR in zwei Schritten liegt darin, dass bei Gewinnung einer ausreichenden Menge an cDNA, diese für mehrere Versuche mit verschiedenen Primern weiterverwendet werden kann (Ginzinger 2002). In diesen Versuchen fand im ersten Schritt eine einmalige cDNA-Synthese aus jeweils 1 µg Gesamt-RNA pro Probe statt. Die gewonnene cDNA wurde dann 1:10 verdünnt, so dass im zweiten Schritt eine ausreichende Menge an cDNA für die Untersuchung der 17β-HSD 5, des ARs und der PBGD

im Light Cycler vorhanden war. Durch Verwendung dieser Methode wurde das Risiko der Degradation der empfindlichen mRNA durch wiederholtes Auftauen vermindert. Außerdem war es möglich, für alle untersuchten Gene dieselbe cDNA-Probe zu verwenden. Somit konnte eine Verfälschung der Ergebnisse durch Unterschiede in der Effizienz der cDNA-Erstrangsynthese ausgeschlossen werden.
Die in diesen Versuchen verwendete Real-Time-PCR gilt als die sensitivste Methode für die Messung von geringen mRNA-Mengen (Bustin 2000; Overbergh et al. 2003; Deepak et al. 2007). Sie unterscheidet sich von der konventionellen PCR durch den Zeitpunkt der Quantifizierung. Während bei der konventionellen PCR erst am Ende des PCR-Zyklus eine Quantifizierung stattfindet, wird bei der Real-Time-PCR die Menge der PCR-Produkte in der exponentiellen Phase gemessen (Ginzinger 2002). Dadurch können die PCR-Effizienzen berechnet werden, wodurch ein genauerer Rückschluss auf die cDNA-Ausgangsproduktmenge möglich ist als bei der konventionellen PCR (Pfaffl 2001). Als Fluoreszenzfarbstoff für die PCR-Untersuchungen wurde SYBR-Green ausgewählt, welches in jeden sich bildenden DNA-Doppelstrang interkaliert. Der Vorteil der unspezifischen Bindung von SYBR-Green ist, dass es mit allen Primerpaaren für alle Zieltranskripte verwendet werden kann. Jedoch ist eine Verfälschung der Messergebnisse durch eine Detektion von Primerdimeren möglich (Giulietti et al. 2001; Ball et al. 2003). Deswegen wurde bei diesen Versuchen die Fluoreszenz nicht direkt nach der Amplifikation gemessen sondern erst bei einer erhöhten Temperatur, die zwischen der Schmelztemperatur der Primerdimere und der Schmelztemperatur der gesuchten spezifischen Produkte lag. Die PCR-Konditionen wurden für die 17β-HSD 5, den AR und das Referenzgen PBGD zuvor von unserer Arbeitsgruppe (Hoppe et al. 2006) optimiert und in dieser Arbeit verwendet. Trotzdem fand eine Überprüfung der Spezifität der Produkte nach jedem Light-Cycler-Lauf mit einer Schmelzkurve und einem Agarosegel statt, um gegebenenfalls eine weitere Optimierung der PCR-Konditionen durchführen zu können.
Von Stahlberg et al. wurde gezeigt, dass Real-Time-PCR Ergebnisse nur vergleichbar sind, wenn die Proben wenigstens in Duplikaten bestimmt werden (Stahlberg et al. 2004). In diesen Versuchen fand sowohl eine

Duplikatbestimmung als auch eine Wiederholung jeder Light-Cycler-Analyse statt, um mögliche technische Fehler auszuschließen.

Western Blot

Die 17β-HSD 5-Expression wurde bisher in verschiedenen Geweben auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Moeller und Adamski 2006). Von Hoppe et al. wurde gezeigt, dass eine mRNA-Expression dieses Enzyms auch in Skrotal- und Genitalhautfibroblasten stattfindet (Hoppe et al. 2006; Hoppe et al. 2007). Diese Untersuchungen beschränkten sich bisher jedoch auf einen Nachweis der mRNA-Akkumulation der 17β-HSD 5 in diesen Lokalisationen. Die entstandene mRNA wird aber nicht immer in Protein umgesetzt (Hagiwara und Nojima 2007), weswegen in diesen Versuchen neben der Untersuchung der mRNA auch eine Untersuchung der Proteinakkumulation der 17β-HSD 5 und des ARs stattfand.

Die Western Blots wurde anhand eines etablierten standardisierten Protokolls der Arbeitsgruppe durchgeführt. Eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse kann durch einen ineffizienten Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran geschehen (Bolt und Mahoney 1997). Deswegen wurde in diesen Versuchen der Proteintransfer mit Coomassie-Orange und Ponceau-S überprüft. Es konnte bei allen durchgeführten Blots ein gleichmäßiger Transfer der Proteine auf die Membran nachgewiesen werden. Als Referenzprotein für die spätere relative Quantifizierung wurde β-Aktin ausgewählt. Von einigen Autoren wird die Nutzung von β-Aktin als Referenzprotein nicht mehr empfohlen, weil es durch biochemische Stimuli, Wachstum und Differenzierung seine Expression ändern kann (Ruan und Lai 2007). Jedoch ist eine Verwendung von β-Aktin als Referenzprotein möglich, wenn unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Anzeichen für eine Regulation vorhanden sind (Selvey et al. 2001). In diesen Versuchen fand nur eine relative Messung der Proteinakkumulation statt, so dass keine direkte Aussage zu einer möglichen Regulation des β-Aktins gemacht werden kann. Die gleichmäßigen Proteinbanden in den durchgeführten Western-Blots deuten jedoch auf keine wesentliche Regulation des β-Aktins in diesen Versuchen hin.

Massenspektrometrie

Der Nachweis der Expression der 17β-HSD 5 in den Fibroblasten lässt nicht direkt auf eine Androgenproduktion in den untersuchten Geweben schließen, weswegen eine Hormonmessung in den gewonnen Zellüberständen stattfand. Nach der Inkubation der Zellen mit Androstendion wurden die gewonnen Überstände der Zellkulturversuche mit LC-MS/MS im endokrinologischen Labor der Kinderklinik Kiel auf Androgene und deren Metabolite untersucht.
Das Hauptziel dieser Untersuchung war, herauszufinden, ob eine Umwandlung des Androstendions in Testosteron oder in weitere Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese in den Zelllinien stattgefunden hat. Der Vorteil der LC-MS/MS im Gegensatz zur Immunoassays liegt in der hohen Spezifität und der Möglichkeit der Quantifizierung vielfältiger Analyten in nur einem analytischem Lauf. Aufgrund dieser Vorteile wird diese Methode seit ihrer Entwicklung in den 90er Jahren nicht nur in der Forschung sondern auch zunehmend in der Routinediagnostik verwendet (Vogeser 2003; Vogeser und Parhofer 2007). Die Möglichkeit der Quantifizierung mehrerer Analyte aus nur einer Blutprobe macht sie z.B. zu dem bevorzugten Verfahren für das Neugeborenscreening (Chace et al. 2002). Außerdem wird die LC-MS/MS als die akkurateste Methode für die Analyse von gonadalen Steroiden bei Kindern angesehen (Albrecht und Styne 2007). Die Durchführung der LC-MS/MS in diesen Versuchen fand anhand eines standardisierten Protokolls statt, welches von A. E. Kulle aus der endokrinologischen Arbeitsgruppe der Kinderklinik Kiel für den Nachweis und die Quantifizierung von Hormonen und Metaboliten der Androgenbiosynthese entwickelt wurde (Kulle et al. 2010).
Da die LC-MS/MS noch nicht für die Bestimmung aller Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese etabliert ist, wurden die Überstände zusätzlich in das Steroidlabor nach Giessen zu S.Wudy geschickt. Hier konnten weitere Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese mittels GC-MS bestimmt werden. Die Methode ist seit Jahren etabliert (Shackleton 1993). Die GC-MS diente einerseits dazu weitere mögliche Metabolite des Androstendions nachzuweisen; andererseits wurden die Ergebnisse der LC-MS/MS durch eine weitere Testosteronbestimmung mittels GC-MS bestätigt.

Reportergenassay

Neben der direkten Androgenmessung in der LC-MS/MS wurde das androstendionhaltige Medium auch indirekt mittels Reportergenassay auf das Vorkommen von androgenen Substanzen getestet. Hierfür wurde ein künstliches AR-Zielgenmodell in CHO-Zellen transfiziert und die Aktivierung eines androgenabhängigen Zielgens nach Zugabe des androstendionhaltigen Mediums gemessen. Das verwendete Modell ist in der Arbeitsgruppe etabliert und wurde schon für zahlreiche Studien verwendet (Holterhus et al. 2002; Werner et al. 2006; Werner et al. 2008). Eine Nachstellung der exakten *in-vivo* Mechanismen ist jedoch unmöglich, da die komplexe molekulare androgene Wirkung bis heute noch nicht geklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung ist. Als Wirtszelle für diese Versuche wurden CHO-Zellen ausgewählt. Diese scheinen zunächst aufgrund ihrer topographischen Herkunft nicht für die Messung androgener Aktivität geeignet, da auch im Ovar eine Sexualsteroid-biosynthese stattfindet (Drummond 2006). Für die Verwendung dieser Zelllinie spricht aber einerseits, dass eine Expression des ARs im Ovar des chinesischen Hamsters nicht vorhanden ist (Deslypere et al. 1992). Anderseits zeigte Sonneveld et al. in einer Studie, dass die Daten von auf CHO-Zellen basierten *in-vitro-Screening-Reportergen-Assays* mit denen auf menschlichen Zelllinien basierten *in-vivo-Screening-Reportergen-Assays* bezüglich der Reportergenaktivierung eine gute Korrelation zeigen (Sonneveld et al. 2006). Eine geringe Produktion von Androgenen in den CHO-Zellen, welche an den in die Zelle transfizierten AR binden, kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. In diesen Versuchen wurden aber relative, normalisierte Werte für die Auswertung der Ergebnisse der androgenen Aktivierungskapazität verwendet. Damit ist eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine mögliche Androgenproduktion in den CHO-Zellen nicht von Bedeutung.

Die Haupthypothese der vorliegenden Arbeit war, dass unter *in-vitro* Bedingungen durch die 17β-HSD 5 eine intrakrine Testosteronsynthese in den Genitalhautfibroblasten von Patienten mit 17β-HSD 3-Mangel stattfindet. Von zahlreichen Autoren wird angenommen, dass das durch die 17β-HSD 5 synthetisierte Testosteron zu einer Maskulinisierung der Patienten in der Pubertät führen kann (Andersson 1995; Boehmer et al. 1999; Dufort et al. 1999; Adamski und Jakob 2001; Luu-The et al. 2001; Lee et al. 2007). Von Hoppe et al. wurde eine vermehrte Expression der 17β-HSD 5 in Skrotalhautfibroblasten bei Hypospadiepatienten, bei denen zuvor einen spezifische Störung der Androgenbiosynthese ausgeschlossen wurde, im Gegensatz zu Normalkontrollen nachgewiesen. Dies führte zu der Annahme, dass bei gestörter Virilisierung eine vermehrte lokale Androgensynthese durch die 17β-HSD 5 im androgenabhängigen Zielgewebe stattfindet (Hoppe et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte für die Zellkulturen der 17β-HSD 3-Mangel Patienten diese Vermutung nicht bestätigt werden. Eine Expression der 17β-HSD 5 konnte zwar sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in allen Zelllinien nachgewiesen werden, jedoch konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Expression des Enzyms zwischen den Normalkontroll- und den Patientenzelllinien festgestellt werden.

Da in den 17β-HSD 3-Mangel Patienten aufgrund des Enzymmangels Androstendion in einer erhöhten Konzentration vorliegt, wurden auch in diesen Versuchen die Zelllinien mit Androstendion inkubiert. Für die Inkubationsversuche verwendeten wir zunächst die physiologische Androstendionkonzentration von 10 nM. Dadurch wurde einerseits versucht die Situation *in-vivo* möglichst genau nachzustellen, anderseits sollte eine Induktion der 17β-HSD 5 durch Androstendion untersucht werden. Hierbei zeigte sich zwei und vier Tage nach der Inkubation mit Androstendion in allen Zelllinien eine geringe Expressionssteigerung der 17β-HSD 5. Die stärkste Expressionssteigerung auf das 6-fache des Ausgangswertes nach 96 h zeigt die Patientenzelllinie ARD 1318, deren klinischen Maskulinisierungserscheinungen jedoch am geringsten ausgeprägt waren. Somit scheint keine Korrelation zwischen der Ausprägung der Maskulinisierungserscheinungen der Patienten und der *in-vitro* festgestellten Expressionssteigerung der 17β-HSD 5 zu bestehen. Daraus lässt

sich schließen, dass die unterschiedlich ausgeprägten mRNA-Expressionssteigerungen des Enzyms nach Androstendioninkubation sich wahrscheinlich eher auf das Vorhandensein von interindividuellen Unterschieden zurückführen lassen. Die Variabilität in der Expression von Enzymen der Sexualsteroidbiosynthese zwischen einzelnen Individuen wurde schon in verschiedenen Studien nachgewiesen (Thiele et al. 2005; Hoppe et al. 2006).

Es wird postuliert, dass eine vermehrte Expression des ARs auf eine vermehrte Androgen-Signalübertragung hinweist (Hoppe et al. 2007). Deswegen wurde in diesen Versuchen der AR in den untersuchten Zelllinien sowohl vor als auch nach Androstendioninkubation untersucht. In allen Zelllinien konnte sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene eine Expression des ARs nachgewiesen werden. Nach der Androstendioninkubation ist jedoch nur ein geringer Anstieg der AR-Proteinakkumulation sichtbar. Es ist bekannt, dass das AR-Protein durch Hormone stabilisiert wird (Gobinet et al. 2002). Aus diesem Grund ist die vermehrte Proteinakkumulation des ARs nach Androstendioninkubation eher auf eine Stabilisierung des AR-Proteins zurückzuführen als auf eine vermehrte Proteinexpression nach Androstendioninkubation.

Trotz der deutlichen Expression der 17β-HSD 5 und des ARs sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnte in diesen Versuchen nach Inkubation mit physiologischen Androstendionkonzentrationen keine vermehrte Testosteronsynthese nachgewiesen werden. Bei Messungen verschiedener Hormone der Androgenbiosynthese mit massenspektrometrischen Methoden war innerhalb von vier Tagen eine kontinuierliche Abnahme des Androstendion-gehaltes bei allen Zelllinien sichtbar. Es zeigte sich jedoch kein vermehrter Anstieg von anderen potenten Androgenen der Sexualsteroidbiosynthese, wie Testosteron oder DHT. Dies könnte daran liegen, dass eine Umwandlung des Androstendions in andere Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese stattgefunden hat. Es wird zum Beispiel postuliert, dass das seltene Auftreten einer Gynäkomastie bei Patienten mit 17β-HSD 3- Mangel durch eine Umwandlung von Androstendion in Östron bedingt ist (Faienza et al. 2008). Da jedoch auch kein Nachweis von Östron oder anderen Produkten der

Sexualsteroidbiosynthese mittels massenspektrometrischen Messungen erbracht werden konnte, scheint das Androstendion innerhalb des Zeitraumes von vier Tagen in Produkte umgewandelt worden zu sein, die mit den hier angewendeten Methoden nicht erfasst worden sind. Anderseits besteht die Möglichkeit, dass eine Bildung von potenten Androgenen innerhalb von 48 h stattgefunden hat und diese nach zwei Tagen wiederum in weitere Metabolite umgewandelt wurden. Eine Isolierung der RNA, Proteine und des Überstandes wäre theoretisch auch zusätzlich zu früheren Zeitpunkten möglich gewesen. Hierfür wäre jedoch eine vermehrte Anzahl von Zellproben benötigt worden, deren Gewinnung aufgrund der geringen Inzidenz dieser Erkrankung sowie der gewählten Einschlusskriterien begrenzt war. Außerdem erscheint eine Testosteronbildung zu einem früheren Zeitpunkt eher unwahrscheinlich zu sein, da nach zwei Tagen in den Zellkulturüberständen noch Androstendion-konzentrationen von durchschnittlich 3 nmol/l messbar waren. Bei einer Metabolisierung von Androstendion in Testosteron müsste somit neben dem vorhandenen Androstendion auch Testosteron nach zwei Tagen noch nachweisbar sein. Die Testosteronkonzentration lagen jedoch an der Nachweisgrenze der LC-MS/MS und es waren keine stabilen Werte messbar. Da auch in weiteren gaschromatographischen Untersuchungen kein Testosteron oder Metabolite der Sexualsteroidbiosynthese in den gewonnen Überständen nachgewiesen werden konnten, ist eine relevante Bildung von androgen wirksamen Substanzen aus Androstendion in Genitalhautfibroblasten unter physiologischen Bedingungen weitgehend ausgeschlossen.

Dies gilt zunächst jedoch nur für physiologische Androstendionkonzentrationen von 10 nM. 17β-HSD 3-Mangel Patienten weisen in der Pubertät meistens höhere Androstendionkonzentrationen als normale Männer auf. In der Pubertät können Androstendionkonzentrationen von bis zu 60 nmol/l im Serum der 17β-HSD 3-Mangel Patienten nachgewiesen werden (Mendonca et al. 1999; Hannema und Hughes 2007; Lee et al. 2007). In einer Fallstudie von Andersson et al. (Andersson 1995) konnten in der V. spermatica von Patienten mit 17β-HSD 3-Mangel, die in der Pubertät durch Maskulinisierungserscheinungen aufgefallen waren, sogar Androstendionkonzentrationen von bis zu 1,5 µmol/l gemessen werden. Die Testosteronkonzentrationen waren dagegen mit 35-180

nmol/l um das 15-17 fache geringer als die Testosteronkonzentrationen gesunder Männer in der Vena spermatica. Eine Messung der Androstendion-konzentration in der Genitalhaut ist technisch schwierig, weswegen hierzu noch keine Daten vorhanden sind.

Um zu überprüfen, ob unter hohem Substratdruck in der Genitalhaut die Testosteronsynthese vermehrt angeregt wird, führten wir mit den Genitalhaut-fibroblasten der 17β-HSD 3-Mangel Patienten ein weiteres Inkubations-experiment mit 700 nM Androstendion durch. Es zeigte sich im Gegensatz zu den Inkubationsversuchen mit 10 nM Androstendion eine stetige Zunahme der Testosteronkonzentration in dem Zeitraum von vier Tagen. Vier Tage nach Inkubation mit 700 nM Androstendion zeigten sich Testosteronwerte von durchschnittlich 16 nmol/l in den Überständen der drei Patientenzelllinien. Diese Werte liegen im oberen Normbereich der Testosteronkonzentration im Serum gesunder Männer (Kushnir et al. 2006). Somit scheint bei supraphysiologischen Androstendionkonzentrationen eine intrakrine Testosteronsynthese in den Genitalhautfibroblasten möglich zu sein. Da die untersuchten Patientenzelllinien die 17β-HSD 3 nicht exprimieren, ist für die Testosteronsynthese in dieser Lokalisation wahrscheinlich die 17β-HSD 5 verantwortlich. Zudem wurde in der Genitalhaut bisher kein anderes Enzym nachgewiesen, welches hauptsächlich die Synthese von Testosteron aus Androstendion katalysiert (Hoppe et al. 2007).

Da die genitale 17β-HSD 5 eine Testosteronsynthese aus Androstendion jedoch scheinbar nur unter supraphysiologischen Bedingungen katalysiert, ist es eher unwahrscheinlich, dass die Maskulinisierung der Patienten in der Pubertät durch eine genitale Testosteronsynthese bedingt ist. Dies wird neben der fehlenden Testosteronsynthese nach Inkubation mit physiologischen Androstendionkonzentrationen zusätzlich dadurch bestätigt, dass in den durchgeführten Reportergenassays eine kontinuierliche Abnahme der androgenen Aktivierungskapazität der AREs über den Zeitraum von vier Tagen sichtbar ist. Dies zeigt, dass nach zwei und vier Tagen nach Inkubation mit physiologischen Androstendionkonzentrationen keine Produkte gebildet wurden, die ein stärkeres androgenes Potential als Androstendion besitzen. Damit scheinen die Ergebnisse dieser Versuche die Hypothese, dass unter physiologischen Androstendionkonzentrationen eine intrakrine

Testosteronsynthese durch die genitale 17β-HSD 5 zur Maskulinisierung der 17β-HSD 3-Mangel Patienten in der Pubertät führt, zu widerlegen. Dies steht im Widerspruch zu dem von Labrie et al. geprägten Begriff der Intrakrinologie, der beschreibt, dass eine Produktion von Androgenen bei Bedarf direkt in den peripheren Geweben aus adrenergen Vorstufen erfolgt. Die Wirkung dieser Androgene soll sich auf die produzierende Zelle beschränken (Labrie 1991; Labrie et al. 2000). Bei Anwendung dieser Definition auf die Genitalhaut-fibroblasten müsste theoretisch ein Nachweis von potenten Androgenen nach der Inkubation mit Androstendion in einer physiologischen Konzentration in diesen Versuchen möglich sein.
Es lässt sich durch diese Untersuchung jedoch keine generelle Aussage für die gesamte Genitalhaut machen. Eine Androgenproduktion in anderen Zelltypen der Genitalhaut, wie z.B. Haarfollikelzellen, lässt sich nicht ausschließen. In diesen Versuchen handelt es sich zudem nur um eine *in-vitro* Untersuchung, die keinen direkten Rückschluss auf die Situation *in-vivo* zulässt. Es wurde zwar versucht eine möglichst genaue Nachstellung der Situation *in-vivo* durchzuführen, jedoch ist beschrieben, dass Fibroblasten allein durch das Heraustrennen aus ihrem Zellverband und die Anzucht in Zellkultur ein unterschiedliches Wachstums- und Expressionsmuster zeigen (Rubin 1997). Zusätzlich ist es technisch schwierig unter *in-vitro* Bedingungen eine kontinuierliche Inkubation mit Androstendion durchzuführen, wie sie unter *in-vivo* Bedingungen vorliegt. Hierdurch könnte eine stärkere Induktion des 17βHSD 5 Enzyms und damit eine kontinuierliche Testosteronsynthese in den Genitalhautfibroblasten bewirkt werden. Somit geben die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Ergebnisse nur einen Hinweis auf die tatsächliche Situation in den Patienten.

In der vorliegenden Arbeit konnte zwar gezeigt werden, dass unter *in-vitro* Bedingungen mit physiologischer Androstendionkonzentration keine intrakrine Testosteronsynthese durch die 17β-HSD 5 in Genitalhautfibroblasten von Patienten mit 17β-HSD 3 Mangel stattfindet. Es ist jedoch damit keine Begründung gegeben, warum diese Patienten teilweise Testosteron-konzentrationen besitzen, die an der unteren Normgrenze von normalen

Männern liegen (Mendonca et al. 2000) und weshalb sie testosteronabhängige Prozesse, wie die Differenzierung der Wolff-Gänge und Maskulinisierung in der Pubertät, durchlaufen. Die Klärung dieser Fragen wäre aber nicht nur zum besseren Verständnis der pathologischen Vorgänge beim 17β-HSD 3 Mangel von großer Bedeutung sondern auch zur Entwicklung neuer Diagnostik -und Therapiestrategien. Deswegen sollen im Folgenden kurz weitere Möglichkeiten, die zur Testosteronsynthese und Maskulinisierung der Patienten führen könnten, beschrieben und diskutiert werden.

Die wahrscheinlichste Hypothese ist, dass eine Testosteronproduktion in anderen Geweben, in denen die 17β-HSD 5 vorkommt, stattfindet und das synthetisierte Testosteron über die Blutbahn verteilt wird. Bei 17βHSD-Mangel Patienten wurde bisher nur die mRNA-Expression der 17βHSD 5 im Blut untersucht. Eine erhöhte Testosteronsynthese in dieser Lokalisation erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, weil einerseits keine Unterschiede zu gesunden weiblichen Normalkontrollen festgestellt worden (persönliche Kommunikation Ute Hoppe) und anderseits im Serum von 17β-HSD 3 Mangel Patienten nur maximale Androstendionkonzentrationen von 60 nmol/l messbar sind. In diesen Versuchen wurde jedoch gezeigt, dass die 17β-HSD 5 wahrscheinlich nur unter supraphysiologischen Bedingungen eine Testosteronsynthese katalysiert. Kürzlich wurde von Nakamura et al. eine Expression der 17β-HSD 5 in der Nebenniere von gesunden Frauen nachgewiesen. Er zeigte, dass bei einer Unterdrückung des Enzyms durch siRNA ein Rückgang der Testosteron-produktion zu verzeichnen war. Hieraus folgerte Nakamura, dass die adrenerge 17β-HSD 5 eine entscheidende Rolle in der Testosteronsynthese bei Frauen spielt (Nakamura et al. 2009). Diese Hypothese könnte auch auf 17β-HSD 3-Mangel Patienten übertragen werden. Eine ausschließliche adrenerge Testosteronproduktion würde jedoch nicht die Diskrepanz der teilweise differenzierten Wolff-Gänge und des überwiegend weiblichen Genitals der 17β-HSD-3 Mangel Patienten bei Geburt erklären.
Weiterhin wurde eine starke Expression der 17β-HSD 5 in den Leydigzellen des Hodens nachgewiesen (Pelletier et al. 1999; Azzarello et al. 2008; Nakamura et al. 2009). In dieser Lokalisation liegen bei den 17β-HSD 3 Patienten teilweise

Androstendionkonzentrationen von bis 1,5 µmol/l vor (Andersson 1995). Bei diesen Konzentrationen wird die 17β-HSD 5, wie in diesen Versuchen gezeigt, zu einer Testosteronsynthese angeregt. Eine Testosteronsynthese in diesem Gewebe würde zudem den Phänotyp der 17β-HSD 3 Mangel Patienten erklären. In der Embryonalentwicklung könnte das in den Hoden synthetisierte Testosteron zunächst über eine nur lokale Wirkung zu einer Differenzierung und Stabilisierung der Wolff-Gänge führen (Tong et al. 1996; Hannema und Hughes 2007). Zum Beginn der Pubertät könnte dann unter erhöhtem Substratdruck erneut die gonadale 17β-HSD 5 zu einer Testosteronsynthese angeregt werden. Dies könnte über eine Verteilung des Testosterons über die Blutbahn zu der Maskulinisierung der 17β-HSD 3-Mangel Patienten im pubertären Alter führen. Eine Überprüfung dieser Hypothese wäre sinnvoll und könnte mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden durchgeführt werden. Um einen Vergleich der Gewebe Genitalhaut und Gonade herstellen zu können, wäre es von Vorteil hierfür gonadale Zellkulturen von denselben Patienten, die in dieser Arbeit ausgewählt wurden, zu verwenden. Hierfür müssten jedoch Leydigzellkulturen kultiviert werden, die von den untersuchten Patienten nicht vorhanden sind und deren Zellkulturbedingungen bisher nicht gut etabliert sind.

Eine weitere in der Literatur beschriebene Hypothese zur Maskulinisierung der 17β-HSD 3-Mangel Patienten ist, dass durch das vermehrte Vorkommen von Androstendion eine direkte Wirkung dieser Androgenvorstufe am AR zu einer Maskulinisierung der Patienten führt. Diese wurde schon von verschiedenen Autoren postuliert (Hannema und Hughes 2007; Lee et al. 2007), bisher jedoch noch nicht nachgewiesen. Für diese Hypothese spricht, dass Androstendion in höheren Konzentration bei Reportergenassays eine ähnliche androgene Aktivierungskapazität wie Testosteron zeigt (Holterhus et al. 2002; Chen et al. 2004). Die gemessenen Androstendionkonzentration der einzelnen 17β-HSD 3-Mangel Patienten sind sehr variabel (Twesten et al. 2000). Die Androstendion-werte liegen jedoch bei allen Patienten um ein Vielfaches höher als in gesunden Männern (Mendonca et al. 2000; Lee et al. 2007). Bei Androstendion-konzentrationen von 1,5 µM, wie in der V.spermatica von 17β-HSD3 Patienten gemessen, kann unter *in-vitro*- Bedingungen eine fast 100 %ige Transaktivierungskapazität des ARs an den ARE gemessen werden (Einleitung;

Abb.5). Damit ist in Reportergenassays in CHO-Zellen durch Androstendion eine ähnliche Transaktivierungskapazität wie durch die potenteren Androgene Testosteron und DHT möglich. Für diese Hypothese spricht zusätzlich, dass 17βHSD 3-Mangel Patienten oft erst in der Pubertät durch Virilisierungserscheinungen auffallen. Zu diesem Zeitpunkt können bei den Patienten im Serum Androstendionkonzentrationen gemessen werden, die ca. 2-3 fach höher liegen als bei Patienten, die zufällig während ihrer Kindheit z.B. durch Leistenhoden aufgefallen sind (Lee et al. 2007).
Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf die Situation *in-vivo* würde somit bedeuten, dass die 17β-HSD 3-Mangel Patienten mit hohen Androstendionwerten eine ähnliche Maskulinisierung wie normale männliche Jugendliche durchlaufen könnten. Aufgrund des künstlichen Zellmodells durch das die Ergebnisse gewonnen wurden, wäre aber eine klinische Bestätigung dieser Hypothese notwendig. Sinnvoll wäre beispielsweise eine Auswertung schon vorhandener Daten von 17β-HSD 3-Mangel Patienten bezügich einer Korrelation der Androstendionkonzentration zum Grad der Maskulinisierung der Patienten in der Pubertät.

Mit der zuletzt beschriebenen Hypothese wären jedoch nicht die teilweise im Normbereich gesunder Männer liegenden Testosteronkonzentrationen im Serum der 17β-HSD 3 Patienten erklärbar. Deswegen scheint eine Kombination der beschriebenen Hypothesen am wahrscheinlichsten zu sein. Dies würde bedeuten, dass die Differenzierung und Stabilisierung der Wolff-Gänge während der Embryonalentwicklung durch eine lokale Testosteronsynthese der gonadalen 17βHSD 5 stattfindet. Wie in diesen Versuchen nachgewiesen, muss jedoch ein hoher Substratdruck vorhanden sein, damit in den Genitalhautfibroblasten eine Testosteronsynthese abläuft.
Durch den Beginn der Pubertät werden die Leydigzellen des Hodens zur vermehrten Androgensynthese angeregt, wodurch ein erhöhter Substratdruck für die Testosteronsynthese durch die gonadale 17β-HSD 5 entsteht. Eine vermehrte gonadale Testosteronsynthese durch die 17β-HSD 5 in 17β-HSD 3-Mangel Patienten könnte über eine Verteilung des Testosterons über die Blutbahn zu einer Maskulinisierung der Patienten in der Pubertät führen. Einen

nur sehr geringen Beitrag zur Testosteronsynthese leisten unter hohem Substratdruck wahrscheinlich auch die genitale und adrenerge 17β-HSD 5. Außerdem sind bei 17β-HSD 3-Mangel Patienten in der Pubertät stark erhöhte Androstendionkonzentrationen nachweisbar, die durch eine direkte Wirkung des Androstendions am AR die Maskulinisierung der Patienten zusätzlich unterstützen könnten.

5 Zusammenfassung

Die 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase 3 ist das Schlüsselenzym im Hoden für die Bildung von Testosteron aus Androstendion. Eine inaktivierende Mutation im 17β-HSD 3 Gen bewirkt bei XY-Patienten schwere Virilisierungsstörungen. Die Patienten zeigen bei Geburt ein differenziertes inneres männliches Genital, jedoch ein vornehmlich weibliches äußeres Genital. In der Pubertät findet eine spontane Maskulinisierung statt. Es wird angenommen, dass diese Maskulinisierung durch eine intrakrine Testosteronproduktion im peripheren Gewebe durch das Isoenzym 17β-HSD 5 bedingt ist. In der vorliegenden Arbeit fand eine Überprüfung dieser Hypothese unter *in-vitro* Bedingungen statt. Für die Untersuchungen wurden Genitalhautfibroblasten von drei Patienten mit 17β-HSD 3-Mangel ausgewählt, welche alle die gleiche homozygote inaktivierende Mutation im 17β-HSD 3 Gen aufwiesen und mit Skrotalhautfibroblasten von gesunden altersentsprechenden XY-Probanden verglichen. Die Fibroblasten wurden angezüchtet und mit 10 nM Androstendion inkubiert. Dann wurde zu 0 h, 48 h und 96 h die Akkumulation der 17β-HSD 5 sowie des Androgen-rezeptors auf mRNA- und Proteinebene mittels Real-Time PCR und Western Blot analysiert. Es konnte eine Expression beider Gene nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die androstendionhaltigen Mediumüberstände auf Metabolite des Androgenstoffwechsels untersucht. Da nach Inkubation mit physiologischen Androstendionkonzentrationen neben dem Androstendion keine Androgene im Mediumüberstand nachgewiesen werden konnten, wurde die Transaktivierungskapazität des androstendionhaltigen Überstandes an androgenresponsiven Genen mit einem Reportergenassay gemessen. Es zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Aktivierungskapazität der Mediumüberstände über den Zeitraum von vier Tagen. Bei einem weiteren Inkubationsexperiment mit supraphysiologischen Androstendionkonzentrationen (700 nM) konnte eine relevante Testosteronsynthese in den Patientenzelllinien nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine Testosteronsynthese in Genitalhautfibroblasten nur unter supraphysiologischen Bedingungen stattfindet. Damit scheint die in der Literatur favorisierte Hypothese zur Begründung der Virilisierung der 17β-HSD 3 Patienten widerlegt zu sein.

6 Literaturverzeichnis

Adamski, J. und F. J. Jakob (2001). "A guide to 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases." Mol Cell Endocrinol **171**(1-2): 1-4.

Albrecht, L. und D. Styne (2007). "Laboratory testing of gonadal steroids in children." Pediatr Endocrinol Rev **5 Suppl 1**: 599-607.

Andersson, S. (1995). "Molecular genetics of androgenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases." J Steroid Biochem Mol Biol **55**(5-6): 533-4.

Ando, Y., Y. Yamaguchi, K. Hamada, K. Yoshikawa und S. Itami (1999). "Expression of mRNA for androgen receptor, 5alpha-reductase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human dermal papilla cells." Br J Dermatol **141**(5): 840-5.

Azzarello, J., K. M. Fung und H. K. Lin (2008). "Tissue distribution of human AKR1C3 and rat homolog in the adult genitourinary system." J Histochem Cytochem **56**(9): 853-61.

Ball, T. B., F. A. Plummer und K. T. HayGlass (2003). "Improved mRNA quantitation in LightCycler RT-PCR." Int Arch Allergy Immunol **130**(1): 82-6.

Bebermeier, J. H., J. D. Brooks, S. E. DePrimo, R. Werner, U. Deppe, J. Demeter, O. Hiort und P. M. Holterhus (2006). "Cell-line and tissue-specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription." J Mol Med **84**(11): 919-31.

Bertelloni, S., A. Balsamo, L. Giordani, R. Fischetto, G. Russo, M. Delvecchio, M. Gennari, A. Nicoletti, M. C. Maggio, D. Concolino, L. Cavallo, A. Cicognani, G. Chiumello, O. Hiort, G. I. Baroncelli und M. F. Faienza (2009b). "17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency: from pregnancy to adolescence." J Endocrinol Invest.

Bertelloni, S; E. Dati und O. Hiort (2009a). "Diagnosis of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase defiency."Exp Rev of Endocrinol and Metab **4**(1):53-56.

Blouin, K., C. Richard, C. Belanger, P. Dupont, M. Daris, P. Laberge, V. Luu-The und A. Tchernof (2003). "Local androgen inactivation in abdominal visceral adipose tissue." J Clin Endocrinol Metab **88**(12): 5944-50.

Boehmer, A. L., A. O. Brinkmann, L. A. Sandkuijl, D. J. Halley, M. F. Niermeijer, S. Andersson, F. H. de Jong, H. Kayserili, M. A. de Vroede, B. J. Otten, C. W. Rouwe, B. B. Mendonca, C. Rodrigues, H. H. Bode, P. E. de Ruiter, H. A. Delemarre-van de Waal und S. L. Drop (1999). "17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency: diagnosis, phenotypic variability, population genetics, and worldwide distribution of ancient and de novo mutations." J Clin Endocrinol Metab **84**(12): 4713-21.

Bolt, M. W. und P. A. Mahoney (1997). "High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." Anal Biochem **247**(2): 185-92.

Bowers, L. D. (1989). "High-performance liquid chromatography/mass spectrometry: state of the art for the drug analysis laboratory." Clin Chem **35**(7): 1282-7.

Brown, T. R. und C. J. Migeon (1981). "Cultured human skin fibroblasts: a model for the study of androgen action." Mol Cell Biochem **36**(1): 3-22.

Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-93.

Casey, M. L., P. C. MacDonald und S. Andersson (1994). "17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium." J Clin Invest **94**(5): 2135-41.

Chace, D. H., T. A. Kalas und E. W. Naylor (2002). "The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism." Annu Rev Genomics Hum Genet **3**: 17-45.

Chen, F., K. Knecht, C. Leu, S. J. Rutledge, A. Scafonas, C. Gambone, R. Vogel, H. Zhang, V. Kasparcova, C. Bai, S. Harada, A. Schmidt, A. Reszka und L. Freedman (2004). "Partial agonist/antagonist properties of androstenedione and 4-androsten-3beta,17beta-diol." J Steroid Biochem Mol Biol **91**(4-5): 247-57.

Deepak, S., K. Kottapalli, R. Rakwal, G. Oros, K. Rangappa, H. Iwahashi, Y. Masuo und G. Agrawal (2007). "Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes." Curr Genomics **8**(4): 234-51.

Delemarre, E., B. Felius und H. Delemarre (2008). "Inducing puberty." Eur J Endocrinol.

Deslypere, J. P., M. Young, J. D. Wilson und M. J. McPhaul (1992). "Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene." Mol Cell Endocrinol **88**(1-3): 15-22.

Drummond, A. E. (2006). "The role of steroids in follicular growth." Reprod Biol Endocrinol **4**: 16.

Dufort, I., P. Rheault, X. F. Huang, P. Soucy und V. Luu-The (1999). "Characteristics of a highly labile human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase." Endocrinology **140**(2): 568-74.

Elmlinger, M. W., I. Mayer, D. Schnabel, B. S. Schuett, D. Diesing, G. Romalo, H. A. Wollmann, W. Weidemann, K. D. Spindler, M. B. Ranke und H. U. Schweikert (2001). "Decreased expression of IGF-II and its binding protein, IGF-binding protein-2, in genital skin fibroblasts of patients with complete androgen insensitivity syndrome compared with normally virilized males." J Clin Endocrinol Metab **86**(10): 4741-6.

Faienza, M. F., L. Giordani, M. Delvecchio und L. Cavallo (2008). "Clinical, endocrine, and molecular findings in 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 deficiency." J Endocrinol Invest **31**(1): 85-91.

Faisal Ahmed, S., A. Iqbal und I. A. Hughes (2000). "The testosterone:androstenedione ratio in male undermasculinization." Clin Endocrinol (Oxf) **53**(6): 697-702.

Fleming, A. und E. Vilain (2005). "The endless quest for sex determination genes." Clin Genet **67**(1): 15-25.

Fritsch, M., C. E. Orfanos und C. C. Zouboulis (2001). "Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin." J Invest Dermatol **116**(5): 793-800.

Geissler, W. M., D. L. Davis, L. Wu, K. D. Bradshaw, S. Patel, B. B. Mendonca, K. O. Elliston, J. D. Wilson, D. W. Russell und S. Andersson (1994). "Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3." Nat Genet **7**(1): 34-9.

Ginzinger, D. G. (2002). "Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream." Exp Hematol **30**(6): 503-12.

Giulietti, A., L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon und C. Mathieu (2001). "An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression." Methods **25**(4): 386-401.

Gobinet, J., N. Poujol und C. Sultan (2002). "Molecular action of androgens." Mol Cell Endocrinol **198**(1-2): 15-24.

Griffiths, W. J., A. P. Jonsson, S. Liu, D. K. Rai und Y. Wang (2001). "Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry." Biochem J **355**(Pt 3): 545-61.

Hagiwara, M. und T. Nojima (2007). "Cross-talks between transcription and post-transcriptional events within a 'mRNA factory'." J Biochem **142**(1): 11-5.

Hannema, S. E. und I. A. Hughes (2007). "Regulation of Wolffian duct development." Horm Res **67**(3): 142-51.

Hellwinkel, O. J., A. Muller, D. Struve und O. Hiort (2000). "Influence of androgens and age on androgen receptor and 5 alpha-reductase II transcription." Eur J Endocrinol **143**(2): 217-25.

Hiort, O. (2000). "Neonatal endocrinology of abnormal male sexual differentiation: molecular aspects." Horm Res **53 Suppl 1**: 38-41.

Hiort, O. (2002). "Androgens and puberty." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **16**(1): 31-41.

Hiort, O. und P. M. Holterhus (2000). "The molecular basis of male sexual differentiation." Eur J Endocrinol **142**(2): 101-10.

Holterhus, P. M., U. Deppe, R. Werner, A. Richter-Unruh, J. H. Bebermeier, L. Wunsch, S. Krege, H. U. Schweikert, J. Demeter, F. Riepe, O. Hiort und J. D. Brooks (2007). "Intrinsic androgen-dependent gene expression patterns revealed by comparison of genital fibroblasts from normal males and individuals with complete and partial androgen insensitivity syndrome." BMC Genomics **8**: 376.

Holterhus, P. M., O. Hiort, J. Demeter, P. O. Brown und J. D. Brooks (2003). "Differential gene-expression patterns in genital fibroblasts of normal males and 46,XY females with androgen insensitivity syndrome: evidence for early programming involving the androgen receptor." Genome Biol **4**(6): R37.

Holterhus, P. M., S. Piefke und O. Hiort (2002). "Anabolic steroids, testosterone-precursors and virilizing androgens induce distinct activation profiles of androgen responsive promoter constructs." J Steroid Biochem Mol Biol **82**(4-5): 269-75.

Hoppe, U., P. M. Holterhus, L. Wunsch, D. Jocham, T. Drechsler, S. Thiele, C. Marschke und O. Hiort (2006). "Tissue-specific transcription profiles of sex steroid biosynthesis enzymes and the androgen receptor." J Mol Med **84**(8): 651-9.

Hoppe, U., L. Wunsch, P. M. Holterhus, D. Jocham, A. Richter-Unruh und O. Hiort (2007). "Altered transcription profiles of key-enzymes of androgen biosynthesis in genital skin fibroblasts from patients with 46,XY disorders of sex development (DSD)." Sex Dev **1**(4): 230-7.

Hughes, I. A. (2002). "Intersex." BJU Int **90**(8): 769-76.

Janssen, J. M., R. Bland, M. Hewison, M. W. Coughtrie, S. Sharp, J. Arts, H. A. Pols und J. P. van Leeuwen (1999). "Estradiol formation by human osteoblasts via multiple pathways: relation with osteoblast function." J Cell Biochem **75**(3): 528-37.

Jenster, G., J. Trapman und A. O. Brinkmann (1993). "Nuclear import of the human androgen receptor." Biochem J **293 (Pt 3)**: 761-8.

Josso, N., N. di Clemente und L. Gouedard (2001). "Anti-Mullerian hormone and its receptors." Mol Cell Endocrinol **179**(1-2): 25-32.

Kim, K. S., W. Liu, G. R. Cunha, D. W. Russell, H. Huang, E. Shapiro und L. S. Baskin (2002). "Expression of the androgen receptor and 5 alpha-reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra." Cell Tissue Res **307**(2): 145-53.

Koopman, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow und R. Lovell-Badge (1991). "Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry." Nature **351**(6322): 117-21.

Koopman, P., A. Munsterberg, B. Capel, N. Vivian und R. Lovell-Badge (1990). "Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation." Nature **348**(6300): 450-2.

Kushnir, M. M., A. L. Rockwood, W. L. Roberts, E. G. Pattison, A. M. Bunker, R. L. Fitzgerald und A. W. Meikle (2006). "Performance characteristics of a novel tandem mass spectrometry assay for serum testosterone." Clin Chem 52(1): 120-8.

Kulle, A. E., F. G. Riepe, D. Melchior, O. Hiort und P. M. Holterhus (2010) "A Novel Ultrapressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Androstenedione, Testosterone, and Dihydrotestosterone in Pediatric Blood Samples: Age- and Sex-Specific Reference Data." J Clin Endocrinol Metab. 2010 Mar 3. [Epub ahead of print]. PMID: 20200336

Labrie, C., A. Belanger und F. Labrie (1988). "Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate." Endocrinology **123**(3): 1412-7.

Labrie, F. (1991). "Intracrinology." Mol Cell Endocrinol **78**(3): C113-8.

Labrie, F., V. Luu-The, C. Labrie, G. Pelletier und M. El-Alfy (2000). "Intracrinology and the skin." Horm Res **54**(5-6): 218-29.

Labrie, F., V. Luu-The, S. X. Lin, J. Simard und C. Labrie (2000). "Role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid formation in peripheral intracrine tissues." Trends Endocrinol Metab **11**(10): 421-7.

Lee, Y. S., J. M. Kirk, R. G. Stanhope, D. I. Johnston, S. Harland, R. J. Auchus, S. Andersson und I. A. Hughes (2007). "Phenotypic variability in 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency and diagnostic pitfalls." Clin Endocrinol (Oxf) **67**(1): 20-8.

Lin, D., J. A. Harikrishna, C. C. Moore, K. L. Jones und W. L. Miller (1991). "Missense mutation serine106----proline causes 17 alpha-hydroxylase deficiency." J Biol Chem **266**(24): 15992-8.

Lindqvist, A., I. A. Hughes und S. Andersson (2001). "Substitution mutation C268Y causes 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency." J Clin Endocrinol Metab **86**(2): 921-3.

Lukacik, P., K. L. Kavanagh und U. Oppermann (2006). "Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases." Mol Cell Endocrinol **248**(1-2): 61-71.

Luu-The, V. (2001). "Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase." J Steroid Biochem Mol Biol **76**(1-5): 143-51.

Luu-The, V., I. Dufort, G. Pelletier und F. Labrie (2001). "Type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: its role in the formation of androgens in women." Mol Cell Endocrinol **171**(1-2): 77-82.

Mains, L. M., B. Vakili, Y. Lacassie, S. Andersson, A. Lindqvist und J. A. Rock (2008). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency in a male pseudohermaphrodite." Fertil Steril **89**(1): 228 e13-7.

McKeever, B. M., B. K. Hawkins, W. M. Geissler, L. Wu, R. P. Sheridan, R. T. Mosley und S. Andersson (2002). "Amino acid substitution of arginine 80 in 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 and its effect on NADPH cofactor binding and oxidation/reduction kinetics." Biochim Biophys Acta **1601**(1): 29-37.

Mendonca, B. B., I. J. Arnhold, W. Bloise, S. Andersson, D. W. Russell und J. D. Wilson (1999). "17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency in women." J Clin Endocrinol Metab **84**(2): 802-4.

Mendonca, B. B., M. Inacio, I. J. Arnhold, E. M. Costa, W. Bloise, R. M. Martin, F. T. Denes, F. A. Silva, S. Andersson, A. Lindqvist und J. D. Wilson (2000). "Male pseudohermaphroditism due to 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. Diagnosis, psychological evaluation, and management." Medicine (Baltimore) **79**(5): 299-309.

Miller, W. L. (2002). "Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA." Mol Cell Endocrinol **198**(1-2): 7-14.

Mindnich, R., G. Moller und J. Adamski (2004). "The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases." Mol Cell Endocrinol **218**(1-2): 7-20.

Moeller, G. und J. Adamski (2006). "Multifunctionality of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases." Mol Cell Endocrinol **248**(1-2): 47-55.

Moghrabi, N. und S. Andersson (1998). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenases: physiological roles in health and disease." Trends Endocrinol Metab **9**(7): 265-70.

Moghrabi, N., J. R. Head und S. Andersson (1997). "Cell type-specific expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human placenta and fetal liver." J Clin Endocrinol Metab **82**(11): 3872-8.

Moghrabi, N., I. A. Hughes, A. Dunaif und S. Andersson (1998). "Deleterious missense mutations and silent polymorphism in the human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 gene (HSD17B3)." J Clin Endocrinol Metab **83**(8): 2855-60.

Nakamura, Y., P. J. Hornsby, P. Casson, R. Morimoto, F. Satoh, Y. Xing, M. R. Kennedy, H. Sasano und W. E. Rainey (2009). "Type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) contributes to testosterone production in the adrenal reticularis." J Clin Endocrinol Metab **94**(6): 2192-8.

Nelson, V. L., R. S. Legro, J. F. Strauss, 3rd und J. M. McAllister (1999). "Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries." Mol Endocrinol **13**(6): 946-57.

Neuhäuser, G: Geschlechtsentwicklung. In: Sitzmann, F.C.: Pädiatrie. 2. Aufl., 6-7, Georg Thieme Verlag, 2002

Overbergh, L., A. Giulietti, D. Valckx, R. Decallonne, R. Bouillon und C. Mathieu (2003). "The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression." J Biomol Tech **14**(1): 33-43.

Palmert, M. R. und P. A. Boepple (2001). "Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation." J Clin Endocrinol Metab **86**(6): 2364-8.

Pelletier, G., V. Luu-The, B. Tetu und F. Labrie (1999). "Immunocytochemical localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human reproductive tissues." J Histochem Cytochem **47**(6): 731-8.

Peltoketo, H., V. Luu-The, J. Simard und J. Adamski (1999). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes." J Mol Endocrinol **23**(1): 1-11.

Penning, T. M. (2003). "Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action." Hum Reprod Update **9**(3): 193-205.

Penning, T. M., M. E. Burczynski, J. M. Jez, H. K. Lin, H. Ma, M. Moore, K. Ratnam und N. Palackal (2001). "Structure-function aspects and inhibitor design of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3)." Mol Cell Endocrinol **171**(1-2): 137-49.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

Provost, P. R., C. H. Blomquist, R. Drolet, N. Flamand und Y. Tremblay (2002). "Androgen inactivation in human lung fibroblasts: variations in levels of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 5 alpha-reductase activity compatible with androgen inactivation." J Clin Endocrinol Metab **87**(8): 3883-92.

Puranen, T., M. Poutanen, D. Ghosh, R. Vihko und P. Vihko (1997). "Origin of substrate specificity of human and rat 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, using chimeric enzymes and site-directed substitutions." Endocrinology **138**(8): 3532-9.

Qin, K., D. A. Ehrmann, N. Cox, S. Refetoff und R. L. Rosenfield (2006). "Identification of a functional polymorphism of the human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene associated with polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **91**(1): 270-6.

Quinkler, M., C. Bumke-Vogt, B. Meyer, V. Bahr, W. Oelkers und S. Diederich (2003). "The human kidney is a progesterone-metabolizing and androgen-producing organ." J Clin Endocrinol Metab **88**(6): 2803-9.

Rasmussen, B. B., E. Volpi, D. C. Gore und R. R. Wolfe (2000). "Androstenedione does not stimulate muscle protein anabolism in young healthy men." J Clin Endocrinol Metab **85**(1): 55-9.

Remer, T., K. R. Boye, M. F. Hartmann und S. A. Wudy (2005). "Urinary markers of adrenarche: reference values in healthy subjects, aged 3-18 years." J Clin Endocrinol Metab **90**(4): 2015-21.

Rogol, A. D. (2002). "Androgens and puberty." Mol Cell Endocrinol **198**(1-2): 25-9.

Rosler, A., S. Silverstein und D. Abeliovich (1996). "A (R80Q) mutation in 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 gene among Arabs of Israel is associated with pseudohermaphroditism in males and normal asymptomatic females." J Clin Endocrinol Metab **81**(5): 1827-31.

Ruan, W. und M. Lai (2007). "Actin, a reliable marker of internal control?" Clin Chim Acta **385**(1-2): 1-5.

Rubin, H. (1997). "Cell aging in vivo and in vitro." Mech Ageing Dev **98**(1): 1-35.

Sano, T., G. Hirasawa, J. Takeyama, A. D. Darnel, T. Suzuki, T. Moriya, K. Kato, H. Sekine, S. Ohara, T. Shimosegawa, J. Nakamura, M. Yoshihama, N. Harada und H. Sasano (2001). "17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression and enzyme activity in the human gastrointestinal tract." Clin Sci (Lond) **101**(5): 485-91.

Schneider-Yin, X., M. Hergersberg, D. E. Goldgar, U. B. Rufenacht, M. M. Schuurmans, H. Puy, J. C. Deybach und E. I. Minder (2002). "Ancestral founder of mutation W283X in the porphobilinogen deaminase gene among acute intermittent porphyria patients." Hum Hered **54**(2): 69-81.

Schütt, J. "Funktionelle Charakterisierung von Androgenrezeptormutationen". Med. Diss. Lübeck, 2009

Selvey, S., E. W. Thompson, K. Matthaei, R. A. Lea, M. G. Irving und L. R. Griffiths (2001). "Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR." Mol Cell Probes **15**(5): 307-11.

Shackleton, C. H. (1993). "Mass spectrometry in the diagnosis of steroid-related disorders and in hypertension research." J Steroid Biochem Mol Biol **45**(1-3): 127-40.

Simard, J., M. L. Ricketts, S. Gingras, P. Soucy, F. A. Feltus und M. H. Melner (2005). "Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family." Endocr Rev **26**(4): 525-82.

Sonneveld, E., J. A. Riteco, H. J. Jansen, B. Pieterse, A. Brouwer, W. G. Schoonen und B. van der Burg (2006). "Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities." Toxicol Sci **89**(1): 173-87.

Stahlberg, A., J. Hakansson, X. Xian, H. Semb und M. Kubista (2004). "Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification." Clin Chem **50**(3): 509-15.

Steckelbroeck, S., B. Stoffel-Wagner, R. Reichelt, J. Schramm, F. Bidlingmaier, L. Siekmann und D. Klingmuller (1999). "Characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in brain tissue: testosterone formation in the human temporal lobe." J Neuroendocrinol **11**(6): 457-64.

Theintz, G. E., T. J. Steimer und P. C. Sizonenko (1989). "Developmental pattern of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 5 alpha-reductase activities in the foreskin of boys from birth to eight years of age." Horm Res **32**(4): 124-9.

Thiele, S., U. Hoppe, P. M. Holterhus und O. Hiort (2005). "Isoenzyme type 1 of 5alpha-reductase is abundantly transcribed in normal human genital skin fibroblasts and may play an important role in masculinization of 5alpha-reductase type 2 deficient males." Eur J Endocrinol **152**(6): 875-80.

Thigpen, A. E., R. I. Silver, J. M. Guileyardo, M. L. Casey, J. D. McConnell und D. W. Russell (1993). "Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression." J Clin Invest **92**(2): 903-10.

Tong, S. Y., J. M. Hutson und L. M. Watts (1996). "Does testosterone diffuse down the wolffian duct during sexual differentiation?" J Urol **155**(6): 2057-9.

Twesten, W., P. Holterhus, W. G. Sippell, M. Morlot, H. Schumacher, B. Schenk und O. Hiort (2000). "Clinical, endocrine, and molecular genetic findings in patients with 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency." Horm Res **53**(1): 26-31.

Vihko, P., P. Harkonen, O. Oduwole, S. Torn, R. Kurkela, K. Porvari, A. Pulkka und V. Isomaa (2002). "17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases and cancers." J Steroid Biochem Mol Biol **83**(1-5): 119-22.

Vogeser, M. (2003). "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry--application in the clinical laboratory." Clin Chem Lab Med **41**(2): 117-26.

Vogeser, M. und K. G. Parhofer (2007). "Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)--technique and applications in endocrinology." Exp Clin Endocrinol Diabetes **115**(9): 559-70.

Werner, R., J. Schutt, S. Hannema, A. Ropke, P. Wieacker, O. Hiort und P. M. Holterhus (2006). "Androgen receptor gene mutations in androgen insensitivity syndrome cause distinct patterns of reduced activation of androgen-responsive promoter constructs." J Steroid Biochem Mol Biol **101**(1): 1-10.

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

Wilson, C. A. und D. C. Davies (2007). "The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain." Reproduction **133**(2): 331-59.

Wilson, J. D., J. E. Griffin und D. W. Russell (1993). "Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency." Endocr Rev **14**(5): 577-93.

7 Anhang

7.1 Tabellen der verwendeten Materialen

6-Loch Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Agarosegelektrophoresekammer	Whatman Biometra, Göttingen
Bioanalyzer 2100	Agilent, USA
Brutschrank Typ BB6220	Heraeus Instruments, Hanau
CCD Kamera	BIO- RAD, USA
Gelkammer – und schlitten	Whatman Biometra, Göttingen
Light Cylcer System	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Light Cycler Software 3	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Light Cylcer Relative Quantification Software	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Luminometer	Anthos Microsysteme GmbH, Krefeld
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
QIAshredder- Säulen	Qiagen, Hilden
Tandemmassenspektrometer (ULPC Quattro Premier/XE)	Waters, USA
Thermocycler PTC 200	MJ Research
UV- Leuchttisch (Macro Vue; UV- 25)	Hoefer, USA
UV- Kamera	Phase GmbH, Lübeck
Wasserbad	Münstermann + Scheel GmbH; Lübeck
Zellkulturbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifugen: Typ Biofuge fresco Universal 16 A	 Heraeus Holding GmbH, Hanau Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Tab. 4: Verwendete Geräte, Zubehör- und Verbrauchsmaterialen

Agarose NA	Pharmacia CKB, Schweden
Borsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coomassie Organe	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
DMEM/F12 Zellkulturmedium (Pulver)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dymethylsufoxide	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Formaldehydlösung 37% zur Analyse mit 10% Methanol	MERCK, Darmstadt
FUGENE	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Glycerol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker B.V., USA
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Penicillin- Streptomycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Ponceau-S –Solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Skimmilkpulver	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sodiumdodexylsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNAase Away	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
Rothiphorese Gel 30	Carl Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
Temed	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trishydroxymethylaminomethan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin	Linaris, Wertheim
Tween	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tab. 5: Verwendete kommerzielle Gebrauchslösungen und Chemikalien

Antikörper :	
Anti AR	Biogenex, USA
AKR1C3	Novus Biologicals , USA
Anti Aktin	Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti goat	Dako, USA
Anti rabbit	Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti mouse	Amersham Biosciences, Grossbrittanien
4-Androstene-3; 17 dione	Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
d- ATP,	Amersham Biosciences, USA
d -CTP	Amersham Biosciences, USA
c- GTP	Amersham Biosciences, USA
DNA Ladder für Agarosegele (100 bp)	New England Biolaps, England
DTT	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
d-TTP	Amersham Biosciences, USA
Kaleidoskope Marker	BIO-RAD, USA
Plasmide :	
pSVAR0	Geschenk von Dr. Brinkmann(Rotterdam)
TATA Luc	Geschenk von Dr. Lenster (Rotterdam)
pHRGTK	Promega GmbH, Mannheim
Primer	Metabion internation AG; Martinsried
Protector RNAase Inhibitor	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Random Primers	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe

Tab. 6: Verwendete molekularbiologische Reagenzien

Chemilumineszenz	Perkin Elmer; USA
Dual- Luciferase Assay Kit	Promega GmbH, Mannheim
LightCycler- DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Rneasy RNA-Mini-Kit	Qiagen, Hilden
Super Script ™ II, RNase H- Reverse Transkriptase	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
RNA- 6000-Nano-Chip-Kit	Agilent, USA

Tab. 7: Verwendete Kits

7.2 Tabellen zur Zusammensetzung der selbst hergestellten Puffer, Lösungen und Gele

Zellkultur

Tris-HCL-Puffer	10 nM
Aktivkohle	2,5 %
Dextran	0,25 %

Tab. 8: Zusammensetzung der DCC-Lösung bezogen auf 500 ml FCS (Lagerung bei -18 ℃; Verwendung bei 37 ℃)

DMEM F 12 Stammlösung	500 ml
FCS bzw. DCC- FCS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml

Tab. 9: Zusammensetzung des DMEM/F12-Kulturmedium (Lagerung bei 4 ℃; Verwendung bei 37 °C)

DMEM/F12 Kulturmedium	45 ml
DMSO	5 ml

Tab. 10: Zusammensetzung Einfriermedium (Lagerung bei – 18 ℃)

NaCl	80 g
KCl	2g
KH_2PO_4	2 g
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	14,4g
Aqua bidest	1 l

Tab. 11: Zusammensetzung 10 x PBS Puffer (pH 7,4; Lagerung bei Raumtemperatur)

10 x PBS	100 ml
H_2O bidest	900 ml
Tween	1 ml

Tab. 12: Zusammensetzung 1 x PBS Puffer (Lagerung bei 4 °C)

RNA-Arbeiten und PCR

100% Ethanol	7 ml
DEPC H_2O	3 ml

Tab. 13: Zusammensetzung 70 % Ethanol (Lagerung bei Raumtemperatur)

Agarose (molar)	1 g
1 x TBE- Puffer	50 ml

Tab. 14: Zusammensetzung 2 % Agarosegel (Lösung der Agarose in 1 x TBE; Erhitzen auf 600 W, Gel gießen)

d- ATP (100 mM)	100 µl
d- CTP (100 mM)	100 µl
d- GTP (100 mM)	100 µl
d- TTP (100 mM)	100µl
DEPC- H_2O	600 µl

Tab. 15: Zusammensetzung d-NTP´s (Lagerung bei –20 ℃)

H_2O Bidest	1l
DEPC	200 µl

Tab. 16: Zusammensetzung DEPC-H_20 (über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen; autoklavieren)

Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml)	50 µl
H_2O bidest	250 ml

Tab. 17: Zusammensetzung Ethidiumbromidfärbelösung

Aqua bidest	600 µl
Glycerin	300 µl
Bromphenolblau	100 µl

Tab. 18: Zusammensetzung Loadingpuffer III (Lagerung bei 4 ℃)

Tris	436 g
Borsäure	223 g
Na_2- EDTA	37,2 g
H_2O bidest	4l

Tab. 19: Zusammensetzung 10 x TBE-Puffer (pH 8,3; Lagerung bei 4 ℃)

10 x TBE Puffer	100 ml
H_2O bidest	900 ml

Tab. 20: Zusammensetzung 1 x TBE-Puffer (pH 7,4; Lagerung bei Raumtemperatur)

Proteinlysatherstellung und Western Blot

Ammoniumpersulfat	1 g
H_2O bidest	10 ml

Tab. 21: Zusammensetzung APS (Lagerung bei -20 ℃)

Tris	20 g
Glycin	112, 5 g
H_2O bidest	1 l

Tab. 22: Zusammensetzung 10 x Blottingpuffer (Lagerung bei 4 ℃)

10x Blottingpuffer	150 ml
Methanol	300 ml
H_2O bidest	1050 ml

Tab. 23: Zusammensetzung 1 x Blottingpuffer (pH: 8,3; Lagerung bei 4 ℃)

Tris	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H_2O bidest	1 l

Tab. 24: Zusammensetzung 10 x Elektrodenpuffer (pH: 8,3-8,9; Lagerung bei Raumtemperatur)

10 x Elektrodenpuffer	900 ml
H_2O bidest	100 ml

Tab. 25: Zusammensetzung 1 x Elektrodenpuffer (Lagerung bei 4 ℃)

Triton	1,0 ml
DEO	0,5 g
SDS	0,08 g
Puffer C	100 ml
Bacitracin (50 mM)	1:100 kurz vor Gebrauch hinzufügen
PMSF (60 mM)	1:100 kurz vor Gebrauch hinzufügen

Tab. 26: Zusammensetzung Lysispuffer A (Lagerung bei 4 ℃; pH: 9,5)

Tris	4,85 g/l
EDTA	0,45 g/l
Glycerol	118 ml/l 85 %iges
DTT	10, 0 ml/l (1M DTT)

Tab. 27: Zusammensetzung Puffer C (pH: 7,4; Lagerung bei 4 ℃)

Tris	1,21 g
SDS	4,0 g
Glycerol (85 %)	23,6 ml
Bromphenolblau	2 mg
H_20	100 ml
DTT	1 :100 (Zugabe kurz vor Verwendung)

Tab. 28: Zusammensetzung 2 x Sample Puffer nach Laemmli (pH:6,8; Lagerung bei – 20 ℃)

Skim Milk Pulver	5 g
1x PBS/Tween	100 ml

Tab. 29: Zusammensetzung 5 % Skim Milk (Lagerung bei 4 ℃; Verwendung max. 2 Tage)

Tris	7,54 g
SDS	0,5 g
H_2O bidest	100 ml

Tab. 30: Zusammensetzung 5 x Sammelgelpuffer (pH: 6,8; Lagerung bei 4 ℃)

Tris	22, 6 g
SDS	0,5 g
H_2O bidest	100 ml

Tab. 31: Zusammensetzung 5 x Trenngelpuffer (pH: 8,8; Lagerung bei 4 ℃)

Konzentration	**7 %**	**12%**
Rotiphorese Gel 30	3 ml	5,2 ml
Trenngelpuffer (0, 375 M Tris, 0,1% SDS)	2,7 ml	2,7 ml
Aqua bidest	7,2 ml	5 ml
Temed	10 µl	10 µl
APS	28,8 µl	28,8 µl

Tab. 32: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele

Konzentration	**4 %**
Rotiphorese Gel 30	0,71 ml
Sammelgelpuffer (0,125 Tris, 0,1% SDS)	1,10 ml
Aqua bidest	3,5 ml
Temed	10 µl
APS	15 µl

Tab. 33: Zusammensetzung des verwendeten Sammelgels

7.3 Tabellen der verwendeten Primer

Primer	**Primersequenz**	**Fragment-länge (bp)**	**Primer – Konz. (µg/µl)**	**$MgCl_2$ – Konz. (mM)**
PBGD se*	5'- AGAGTGATTCGCGTGGGTACC –3'	282	20	4
PBGD 3.1R	5'- GGCTCCGATGGTGAAGCC –3'			
L17bHSD5S	5'- CCGCCATATAGATTCTGCTCA –3'	328	10	3
L17bHSD5A	5'- CTTACACTTCTCCATGGCCTC –3'			
hARE 1S	5'- TGGATGGATAGCTACTCCGG –3'	275	10	4
hARE 3-A	5'- CGAAGACGACAAGATGGACAA –3'			

Tab. 34: Verwendete Primer

7.4 Tabellen zu den Ergebnissen

Real-Time-PCR

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	1,31	2,37	3,96	3,18	9,26	2,33
48 h	12,28	5,54	12,37	4,11	10,15	2,69
96 h	8,50	6,07	22,21	7,85	20,19	6,58

Tab.35: Mittelwerte der ermittelten normalisierten relativen Expressionsverhältnisse (17β-HSD 5/PBGD) der 17β-HSD 5-mRNA (Versuch 1)

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	7,99	2,40	25,87	3,42	7,47	5,49
48 h	12,04	1,80	9,74	5,05	5,54	2,35
96 h	26,39	3,61	35,50	5,19	6,19	6,73

Tab.36: Mittelwerte der ermittelten normalisierten relativen Expressionsverhältnisse (17β-HSD 5/PBGD) der 17β-HSD 5-mRNA (Versuch 2)

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	9,10	2,87	14,21	6,34	12,21	8,03
48 h	23,91	7,89	21,74	8,66	1573	9,10
96 h	21,09	6,28	41,64	12,05	23,39	9,45 (1,42)

Tab.37: Mittelwerte der ermittelten normalisierten relativen Expressionsverhälntisse (AR/PBGD) der AR-mRNA (Versuch 1)

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	15,58	2,16	25,66	7,8	10,23	10,21
48 h	27,27	1,59	22,10	11,56	9,2	7,76
96 h	32,62	2,25	36,31	10,18	10,92	10,78

Tab.38: Mittelwerte der ermittelten normalisierten relativen Expressionsverhältnisse (AR/PBGD) der AR-mRNA (Versuch 2)

Western Blot

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	0,05	0,12	0,13	0,15	0,76	0,08
48 h	0,16	0,3	0,45	0,12	0,84	0,11
96 h	0,29	0,34	0,5	0,3	0,79	0,4

Tab. 39: Ermittelte relative Expressionsverhältnisse (17β-HSD 5/ Aktin) des 17β-HSD 5-Proteins im Western Blot (Versuch 1)

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	0,28	0,79	1,76	0,1	0,29	0,18
48 h	0,33	0,74	0,39	0,1	0,3	0,27
96 h	1,47	0,49	0,9	0,13	0,72	0,24

Tab. 40: Ermittelte relative Expressionsverhältnisse (17β-HSD 5/Aktin) des 17β-HSD 5-Proteins im Western Blot (Versuch 2)

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	1,6	0,34	2,03	0,65	1,78	0,89
48 h	2,33	0,61	4,17	1,26	6,07	1,08
96 h	2,28	0,97	5,59	3,1	9,42	1,06

Tab. 41: Ermittelte relative Expressionsverhältnisse (AR/ Aktin) des AR-Proteins im Western Blot (Versuch 1)

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	0,65	0,7	1,27	0,94	0,76	0,8
48 h	2,21	0,7	1,77	1,64	1,29	1,56
96 h	3,15	0,92	2	1,6	2,86	1,03

Tab. 42: Ermittelte relative Expressionsverhältnisse (AR/ Aktin) des AR-Proteins im Western Blot (Versuch 2)

Hormonmessung

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	12,7 (1,0)	13,2 (1,6)	13,8 (2,9)	11,9 (2,1)	12,5 (0,2)	13,9 (2,9)
48 h	0,0 (0,1)	4,8 (0,6)	0,5 (0,1)	0,4 (0,6)	0,2 (0,3)	0,1 (0,1)
96 h	0,1 (0,1)	2,0 (0,3)	0,3 (0,1)	0,0 (0,1)	0,1 (0,1)	0,0 (0,1)

Tab. 43: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen Androstendionkonzentration im Tandemmassenspektrometer (Versuch 1) in nmol/l nach Inkubation mit 10 nM Androstendion

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	13,8 (0,9)	15,2 (0,9)	14,3 (1,3)	15,5 (2,7)	13,2 (1,1)	11,8 (0,7)
48 h	4,6 (0,4)	6,4 (1,1)	1,8 (0,2)	5,6 (0,2)	3,6 (0,7)	3,1 (1,0)
96 h	0,6 (0,2)	1,5 (0,8)	0,0 (0,1)	1,4 (0,4)	0,5 (0,2)	0,2 (0,2)

Tab. 44: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen Androstendionkonzentrationen im Tandemmassenspektrometer (Versuch 2) in nmol/l nach Inkubation mit 10 nM Androstendion

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	0,0 (0,1)	0,1 (0,2)	0,3 (0,1)	0,0 (0,1)	0,0 (0,0)	0,1 (0,2)
48 h	0,0 (0,0)	0,3 (0,2)	0,5 (0,4)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
96 h	0,0 (0,1)	0,2 (0,1)	0,3 (0,3)	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	0,2 (0,0)

Tab. 45: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen Testosteronkonzentrationen im Tandemmassenspektrometer (Versuch 1) in nmol/l nach Inkubation mit 10 nM Androstendion

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)	0,7 (1,1)	0,4 (0,1)	0,2 (0,1)	0,1 (0,1)
48 h	0,0 (0,0)	0,6 (0,1)	0,8 (0,2)	0,6 (0,2)	0,4 (0,2)	0,0 (0,0)
96 h	0,3 (0,1)	0,5 (0,1)	0,1 (0,1)	0,4 (0,2)	0,1 (0,1)	0,0 (0,2)

Tab. 46: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen Testosteronkonzentrationen im Tandemmassenspektrometer (Versuch 2) in nmol/l nach Inkubation mit 10 nM Androstendion

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373
0 h	1,6 (0,3)	1,2 (0,3)	1,4 (0,2)
48 h	11,7(5)	3,3 (0,8)	4,4 (1,2)
96 h	14,26 (3,4)	13,4 (3,3)	19,8 (8)

Tab. 47: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen Testosteronkonzentrationen im Tandemmassenspektrometer in nmol/l nach Inkubation mit 700 nM Androstendion

Reportergenassay

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	95,69 (14,99)	102,76 (13,7)	101,13 (11,7)	100 (4,09)	92,19 (13,91)	96,31 (9,87)
48 h	44,21 (12,03)	72,07 (13,77)	61,99 (12,32)	61,75 (7,21)	72,56 (15,19)	65,15 (12,50)
96 h	18,99 (4,77))	60,97 (11,38)	40,59 (8,41)	48,81 (5,90)	70,68 (11,10)	54,18 (8,67)

Tab.48: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen androgenen Aktivierungskapazität der androstendionhaltigen Überstände (Versuch 1)

Zeitpunkt	ARD 111	ARD 1318	ARD 1373	Sc 3	Sc 9	Sc 12
0 h	102,32 (5,67)	102,11 (7,92)	100,92 (5,38)	100 (5,32)	98,86 (5,33)	108,23 (8,97)
48 h	64,37 (3,38)	75,85 (9,32)	66,48 (8,92)	65,92 (7,27)	88,82 (8,5)	87,42 (9,09)
96 h	29,15 (6,28)	60,68 (6,81)	52,70 (8,32)	54,17 (2,86)	91,50 (4,83)	73,53 (4,59)

Tab. 49: Mittelwerte (Standardabweichung) der gemessenen androgenen Aktivierungskapazität der androstendionhaltigen Überstände (Versuch 2)

7.5 Adressenverzeichnis unserer Kooperationspartner

A.E. Kulle, F.G. Riepe, P.M. Holterhus
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Klinik für allgemeine Pädiatrie
Kinderendokrinologisches Labor
Campus Kiel
Schwanenweg 20
24105 Kiel

S. Wudy
Universitätsklinikum Giessen
Klinik für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
Steroidlabor
Feulgenstraße 12
35392 Giessen

8 Danksagung

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med O. Hiort für die Überlassung dieses interessanten Themas, seine ausgezeichnete Betreuung und seine wertvollen Anregungen bei der Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. R. Werner für seine qualifizierte Betreuung, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine konstruktive Kritik bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau C. Marschke und Frau D. Struve bedanken für ihre freundliche Anleitung im Labor sowie für die in jeder Form gewährte Unterstützung.

Bei der Arbeitsgruppe des endokrinologischen Labors der Kinderklinik Kiel und bei S. Wudy bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der Hormonmessungen.

Herrn Dr. G. Jenster und Herrn Dr. A. O. Brinkmann von der Erasmus Universität in Rotterdam (Niederlande) danke ich für die freundliche Überlassung der Plasmide.

Dem pathologischen Labor der Universität zu Lübeck danke ich für die Erlaubnis zur Nutzung des Agilent 2100 Bioanalyzer.

Anja Peters und meiner Mutter danke ich für das Korrekurlesen der schriftlichen Ausarbeitung meiner Doktorarbeit.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir während der Durchführung der vorliegenden Arbeit stets zur Seite standen und mich fortwährend unterstützt haben.

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Inken Sommerfeld
Geburtsdatum	02.11.1983
Geburtsort	Lübeck

AUSBILDUNGSDATEN

04/2010	2. Staatsexamen an der Medizinischen Universität zu Lübeck
02/2007 – 07/2007	Auslandssemester an der Università degli studi di Parma, Italien
08/2006- 04/2008	Durchführung des experimentellen Teils der Dissertation in der pädiatrisch-endokrinologischen Forschungsgruppe der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UKSH-Campus Lübeck
09/2005	1. Staatsexamen mit der Note gut an der Medizinischen Universität zu Lübeck
10/2003 – heute	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
Juni 2003	Abitur an der Lauenburgischen Gelehrtenschule Ratzeburg
08/2000 – 11/2000	Besuch des Aden Bowman Collegiate Institute in Saskatoon, Kanada
08/1994 – 06/2003	Besuch der Lauenburgischen Gelehrtenschule Ratzeburg

FAMULATUREN UND PRAKTISCHES JAHR

10/2009-01/2010	PJ in der Chirugie an den Sana-Klinken Eutin
06/2009-10/2009	PJ in der Pädiatrie am Wilhelmstift in Hamburg
04/2009-06/2009	PJ in der Inneren Medizin am Medical Center of Veteran Affairs in Northport, USA
02/2009-04/2009	PJ in der Inneren Medizin am Schleiklinikum in Schleswig
08/2008	Famulatur in der Gynäkologie der Universitätsklinik Odense, Dänemark
08/2007	Famulatur in einer pädiatrischen Praxis, Mölln
02/2006	Famulatur in der Ambulanz der Pädiatrie an der Universitätsklinik Innsbruck, Österreich

PRÄSENTATIONEN UND VERÖFFENTLICHUNGEN

Mai 2010	Artikel eingereicht: R. Werner, A.E. Kulle, I. Sommerfeld, F.G. Riepe, S. Wudy, M. Hartmann, S. Bertelloni, P.M. Holterhus, O. Hiort: " Androgen metabolism in genital skin cells of patients with 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency".
Juni 2008	Posterpräsentation im Rahmen des Doktorandentages der Universität zu Lübeck zum Thema: „Der komplizierte Weg zum Testosteron-Androgenmetabolismus in peripheren Genitalhautfibroblasten"
Jan 2007	Präsentation zum Thema: „Transkriptionsprofile relevanter Androgenbiosynthesenzyme bei Patienten mit 17β-HSD 3 Mangel" im Rahmen des Seminars der pädiatrischen Endokrinologie der Universität zu Lübeck