

Aus der Klinik für Kinder und Jugendmedizin I
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Schrappe)
im Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Klinische, hormonelle sowie genetische Einflussfaktoren auf die
transkriptionsaktivierende Funktion des Androgenrezeptors**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Jeta Demiri
aus Mönchengladbach

Kiel 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul-Martin Holterhus

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Laudes

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 03.08.2021

gez.: Prof. Dr. Paul-Martin Holterhus

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Geschlechtsentwicklung	1
1.1.1 Störungen der Geschlechtsentwicklung	2
1.1.2 Gonadendysgenesien	3
1.2 Androgenrezeptor	4
1.2.1 Störungen des Androgenrezeptors	6
1.2.2 Androgeninsensitivitätssyndrom	8
1.3 Apolipoprotein D	10
1.4 Fragestellung	11
2. Material und Methoden	13
2.1 Patientenkollektiv und Zellkulturen	13
2.2 Materialien	16
2.2.1 Geräte	16
2.2.2 Chemikalien und Kits	16
2.2.3 Verbrauchsartikel	16
2.2.4 Primer	17
2.3 Methoden	17
2.3.1 Fibroblastenkultivierung	17
2.3.2 Apolipoprotein D Assay	17
2.3.3 RNA Isolation	18
2.3.4 Reverse Transkription	19
2.3.5 qRT-PCR (quantitative Echtzeit-PCR)	20
2.3.6 Methoden zur Darstellung der Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors	21
3. Ergebnisse	22
3.1 Einfluss der Hormoninkubation auf den Apolipoprotein D-Assay	22
3.1.1 Inkubationszeit	22
3.1.2 Konzentrationsabhängigkeit	23

3.2 Funktionsanalyse unbekannter sowie bekannter Mutationen des Androgenrezeptors	24
3.3 Strukturelle Darstellung der Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors	29
3.4 Androgensensitivität bei 45,X/46,XY gemischter Gonadendysgenese	30
4. Diskussion	34
4.1 Mutationen	36
4.2 45,X/46,XY gemischte Gonadendysgenese	40
5. Zusammenfassung	42
6. Literaturverzeichnis	44
7. Anhang	54
8. Danksagung	59
9. Publikationen	60

Abkürzungsverzeichnis

AF	Aktivierungsfunktion
AIS	Androgen insensitivity syndrome; Androgenresistenz
AMH	Anti-Müller-Hormon
ApoD	Apolipoprotein D
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen-responsible Element
CAIS	Complete androgen insensitivity syndrome; komplette Androgenresistenz
CHO	Chinese Hamster Ovary
COS	CV-1 in Origin, carrying SV40
DAX-1	DSS-AHC critical Region on the X Chromosome 1
DBD	DNA-bindende Domäne
DHH	Desert Hedgehog Signaling Molecule
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMRT1/2	Doublesex-and MAB3-related Transcription Factor 1/2
DSD	Disorders of sex development; Störungen der Geschlechtsentwicklung
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum; fetales Kälberserum
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GF	Genitalhautfibroblasten
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon; Gonadoliberin
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HDL	High-density Lipoprotein; Lipoprotein hoher Dichte
HRE	Hormonresponsives Element
HSP	Hitzeschockprotein
LBD	Ligandenbindende Domäne
LH	Luteinisierendes Hormon
MAIS	Minimal androgen insensitivity syndrome; minimale/ milde Androgenresistenz
METTL7A	Methyltransferase like 7A
MGD	Mixed gonadal dysgenesis; gemischte Gonadendysgenese
NTD	N-terminale Domäne
PAIS	Partial androgen insensitivity syndrome; partielle Androgenresistenz

PCR	Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PolyG	Glutamin-Repeat
PolyQ	Glycin-Repeat
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction; quantitative Echtzeit-PCR
Rspo1	Roof plate-specific spondin 1
SDHA	Succinatedehydrogenase complex, subunit A
SF-1	Steroidogenic Factor 1
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SOX9	SRY (sex determining region Y)-related HMG-box Gen 9
SRY	Sex determining region on the Y-chromosome; hodendeterminierender Faktor
STDV	Standard deviation; Standardabweichung
WNT4	Wingless-type MMTV Integration Site Family, Member 4
WT1	Wilms-Tumor-1-Gen
-SS	10% (full serum conditions) Kohle-behandeltes FBS
+SS	0,1% (serum starved conditions) Kohle-behandeltes FBS

1. Einleitung

1.1 Geschlechtsentwicklung

Die menschliche Geschlechtsentwicklung beginnt mit der Befruchtung der Eizelle durch die Samenzelle. Die weiblichen und männlichen Geschlechtsorgane entwickeln sich aus den gleichen embryonalen Strukturen. Erst im Verlauf der embryonalen Entwicklung kommt es zur geschlechtlichen Determinierung der zunächst bipotenten Gonadenanlage. In welche Richtung sich die embryonalen Strukturen entwickeln, bestimmt zunächst das genetische Geschlecht, welches durch den Karyotyp festgelegt wird. Das genetische Geschlecht wird über die Geschlechtschromosomen bestimmt, die das dreiundzwanzigste Chromosomenpaar bilden. Dabei steht 46-XY für einen männlichen und 46-XX für einen weiblichen Karyotyp.

In Abhängigkeit vom Vorhandensein eines Y-Chromosoms bildet sich das gonadale Geschlecht aus, dabei spielt der auf dem Y-Chromosom lokalisierte hodendeterminierende Faktor SRY (sex determining region on the Y-chromosome) eine entscheidende Rolle. Neben SRY sind weitere Gene bekannt, welche in einem komplexen Zusammenspiel die Hodenentwicklung beeinflussen (z.B. SOX9 (SRY-related HMG-box Gen 9), WT1 (Wilms-Tumor-1-Gen), SF-1 (Steroidogenic Factor 1), DMRT1/2 (Doublesex- and MAB3-related Transcription Factor 1/2), DHH (Desert Hedgehog) (Holterhus 2009).

Bei einem XX-Chromosomensatz entwickelt sich die Gonade zu einem Ovar, für die Entwicklung des Ovars sind allerdings weniger Faktoren bekannt (DAX-1 (DSS-AHC critical Region on the X Chromosome 1), WNT4 (Wingless-type MMTV Integration Site Family, Member 4), Rspo1 (Roof plate-specific spondin 1)) (Holterhus 2009).

Die Sexualhormonproduktion durch die Gonaden leitet nun ab der 7. Schwangerschaftswoche die Entwicklung der äußeren und inneren Genitale ein. Das Vorhandensein der Hodenanlage und somit die Testosteronproduktion in den Leydig-Zellen und das Anti-Müller-Hormon (AMH) aus den Sertoli-Zellen bestimmen das somatische männliche Geschlecht. Sie haben Einfluss auf die paarig angelegten Geschlechtsgänge, die Wolff- und die Müller-Gänge. Das AMH führt dabei zur Regression der Müller-Gänge (ductus paramesonephricus), während Testosteron zur Ausbildung männlicher innerer Geschlechtsorgane aus den Wolff-Gängen (Ductus mesonephricus) führt (Wilson und Davies 2007). Es entwickeln sich dann die Samenleiter, die Nebenhoden, die Samenbläschen und die Prostata.

Fehlt das AMH, so kommt es zur Ausbildung der Müller-Gänge und zur Regression der Wolff-Gänge.

Es entstehen Tuba uterina (Eileiter), Uterus und der obere Teil der Vagina (Josso et al. 2006). Aus dem indifferenten embryonalen äußeren Genitale mit Genitalhöcker, den Labioskrotalwülsten und der Urogenitalfurche bildet sich entweder das männliche oder das weibliche äußere Genital. Aus dem Genitalhöcker entsteht in der weiblichen Entwicklung die Klitoris, aus den Labioskrotalwülsten die Labiae majorae und minorae sowie die distale Vagina. Unter dem Einfluss von Testosteron entwickelt sich aus dem Genitalhöcker der Penis und die Labioskrotalwülste verschmelzen zu Corpus cavernosum und Skrotum (Holterhus 2009).

Mit der Geburt gewinnt die Hormonproduktion der Hypophyse an Bedeutung: Durch das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) aus dem Hypothalamus, wird die Hypophyse zur Bildung der Gonadotropen Hormone FSH (follikelstimulierendes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon) angeregt, die ihrerseits in den Ovarien oder Hoden die Produktion von Hormonen wie Östrogen bzw. Testosteron initiieren (Nieschlag et al. 2003).

1.1.1 Störungen der Geschlechtsentwicklung

Störungen der Geschlechtsentwicklung (Disorders of Sex Development, DSD) umfassen eine Gruppe seltener angeborener Abweichungen der geschlechtlichen Determinierung und Differenzierung. Dabei kann es sich, wie Tabelle 1 zeigt, sowohl um Veränderungen der Geschlechtschromosomen, als auch um Mutationen in geschlechtsspezifischen Genen handeln, welche zu einer Abweichung von der normalen Geschlechtsentwicklung führen.

Störungen der Geschlechtsentwicklung bei chromosomal männlichen Individuen während der Embryogenese führen zu einer verminderten Virilisierung, hierfür sind mehrere Ursachen bekannt (Abb.1): eine globale Unterentwicklung des Hodens (Gonadendysgenese) - wobei bei einer Gonadendysgenese ein erhöhtes Entartungsrisiko vorliegt, der Verlust einer isolierten hormonellen Funktion des sonst normal entwickelten Hodens (Testosteronbiosynthese-Defekt) (Sinnecker et al. 1996, 1997) und die Unfähigkeit des Zielgewebes auf Testosteron anzusprechen (5α -Reduktase-Defekt, Androgenrezeptordefekt) (Sinnecker et al. 1996, 1997). Dabei ist der Phänotyp der Betroffenen sehr variabel.

Tab.1: Klassifikation der Störungen der Geschlechtsentwicklung (DSD) der Konsensusgruppe der LWPES/ESPE 2006 (nach Hughes et al. 2006)

DSD mit Aberrationen der Geschlechtschromosomen	46,XY-DSD	46,XX-DSD
<p>a) 45,X Turner-Syndrom und Varianten</p> <p>b) 47,XXY Klinefelter-Syndrom und Varianten</p> <p>c) 45,X/46,XY gemischte Gonadendysgenese, ovotestikuläre DSD</p> <p>d) 46,XX/46,XY Chimerismus, ovotestikuläre DSD</p>	<p>a) Störungen der testikulären Entwicklung</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. komplette Gonadendysgenese 2. Partielle Gonadendysgenese 3. Gonadale Regression 4. Ovotestikuläre DSD <p>b) Störungen der Androgensynthese oder -wirkung</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Störungen der Androgensynthese, z. B. LH-Rezeptor-, SF1-, Star-Defekte, 3-HSD-II, 17-HSD-III-, 5α-Reduktase-II-Mangel 2. Störungen der Androgenwirkung (CAIS, PAIS) Androgenrezeptordefekte 3. Störungen des AMH/AMH-Rezeptors persistierende Müller'sche Strukturen <p>c) andere z. B. schwere Hypospadie, kloakale Ekstrophie</p>	<p>a) Störungen der ovariellen Entwicklung</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Gonadendysgenese 2. Ovotestikuläre DSD 3. Testikuläre DSD <p>b) Androgenexzess</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Fetal: Adrenogenitales Syndrom; 21-Hydroxylase-Mangel; 11β-Hydroxylase-, 3β-HSD-II-Mangel 2. Fetoplazentär: Aromatasemangel, P450-Oxidoreduktase-Mangel 3. mütterlich (z. B. Luteom, exogen) <p>c) andere z. B. kloakale Ekstrophie, Vaginalatresie, MURCS, andere Syndrome</p>

1.1.2 Gonadendysgenesien

Die Gonadendysgenesien bezeichnen eine Fehlbildung der Keimdrüsen (Gonaden), also des Hodens bzw. der Eierstöcke (46,XY-DSD, 46,XX-DSD). Sie können monogen verursacht sein oder wie bei der 45,X/46,XY-gemischten Gonadendysgenese durch eine numerische Anomalie der Geschlechtschromosomen (Y-chromosomales Mosaik) zu DSD führen. Dabei können sehr unterschiedliche Phänotypen auftreten, die von männlich und weiblich

erscheinenden, Turner-artigen bis zu uneindeutigen Genitalien reichen. Personen mit einer gemischten Gonadendysgenese zeigen häufig eine Streak-Gonade auf der einen Seite und bei persistierenden Müller-Gängen, Testis auf der anderen (Schüler et al. 2004).

1.2 Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor (AR) gehört zur Superfamilie der Kernrezeptoren (Laudet et al. 1999). Er wird durch das AR-Gen codiert, welches aus acht Exons besteht (Elfferich et al. 2013, Kuiper et al. 1989) und auf dem X-Chromosom (Xq11-12) lokalisiert ist. Wie andere Kernrezeptoren besteht auch der AR aus vier funktionellen Domänen (Abb.1a): der N-terminalen Transaktivations-Domäne (NTD, Exon 1), der DNA-bindenden Domäne (DBD, Exon 2-3), der hinge-Region und der C-terminalen Ligandenbindungsdomäne (LBD, Exon 4-8) (Brinkmann et al. 1989, Werner und Holterhus 2014).

Während die DBD und die LBD hoch konserviert sind, weist die NTD eine hohe Variabilität in Länge und Aminosäurezusammensetzung auf und zeigt eine Sequenzhomologie von nur etwa 15% zwischen den unterschiedlichen Steroidrezeptoren (McEwan et al. 2007). Durch ein Glutamin-Repeat (PolyQ) am 5'-Ende und ein Glycin-Repeat (PolyG) zum 3'-Ende der NTD kommt es zu einer variablen Länge des AR-Proteins, das aus etwa 920 Aminosäuren besteht (Werner und Holterhus 2014).

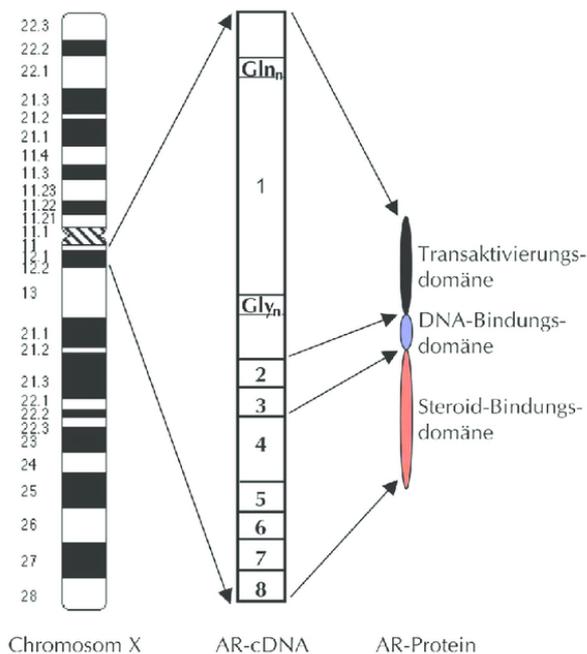
Die DBD des AR besteht aus zwei Zinkfingern, welche essentiell für die direkte Rezeptorbindung an DNA-erkennende Elemente in Zielgenen sind (Matsumoto et al. 2013, Röpke et al. 2004). AR-Proteine erkennen AREs (androgen response elements), die aus kleineren Variationen der palindromischen Repeatsequenz 5'-AGGTCA NNN TGACCT-3 bestehen (Matsumoto et al. 2004).

Die LBD ist mit dem C-Terminus verbunden und besteht aus 11 α -Helices und 2 antiparallelen β -Strängen, die in einer kugelförmigen Struktur angeordnet sind und so eine zentrale hydrophobe Höhle oder Liganden-bindende Tasche umgeben (Elfferich et al. 2013). Die Bindung eines Liganden induziert eine Konformationsänderung, bei der es zu einer Verschiebung der α -Helices in Richtung C-Terminus kommt. Diese Verschiebung ist wichtig für die Rekrutierung von Kofaktoren. Ebenso wie die C-terminale Domäne ist auch die N-terminale Domäne eine Bindungsstelle für Koregulatoren und weist daher autonome Transkriptionsfunktionen (AF-1 und AF-2) auf. Die AF-1-Aktivität ist ligandenunabhängig, während AF-2 von der Bindung eines Liganden abhängt (Matsumoto et al. 2013). Die relativen Transaktivierungsstufen des AF-1 und des AF-2 sind variabel und hängen von der zellulären Umgebung ab. Darüber hinaus modulieren auch posttranslationale Modifikationen

des AR-Proteins wie Phosphorylierung, Acetylierung und Sumoylierung die Aktivität (Anbalagan et al. 2012).

Der Ligand des Androgenrezeptors, ist das freie Testosteron. Es diffundiert durch die Zellmembran der AR-exprimierenden Zelle ins Zytoplasma, wo es dann durch die 5 α -Reduktase in Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt wird (Röpke et al. 2004). Durch Bindung an die LBD wird die Aktivierung des an Hitzeschockproteine (HSP) gebundenen Rezeptors erreicht. Der AR wird von den HSP befreit und in den Zellkern transportiert, wo er als Homodimer an die palindromischen AREs bindet (Abb.1b).

Durch diesen Komplex aus AR und Kofaktoren wird ein Transkriptionskomplex aufgebaut, welcher die Transkription der AR-Zielgene ermöglicht (Röpke et al. 2004).



a

Abb.1a: Struktur des Androgenrezeptors (AR): Genomische Struktur des AR-Gens auf dem Chromosom Xq12 sowie die cDNA- und Protein-Struktur des AR (A. Röpke et al. 2004, S.196).

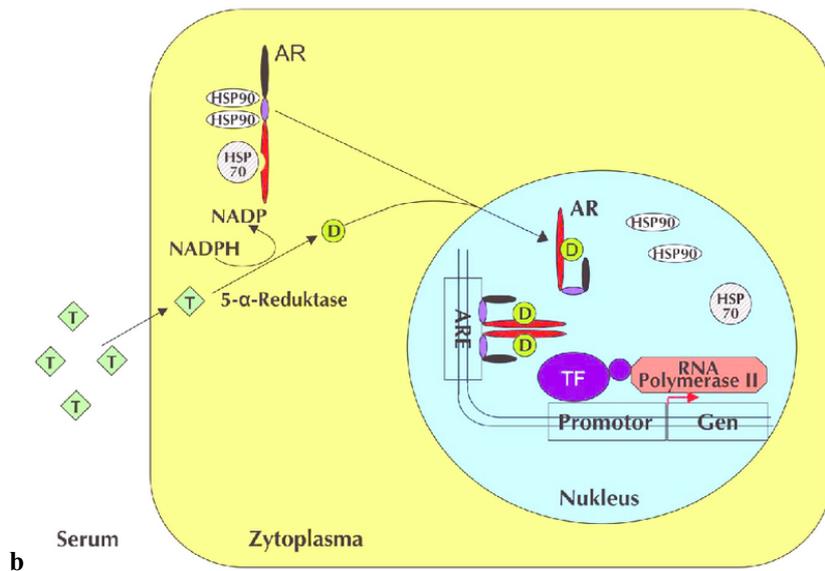


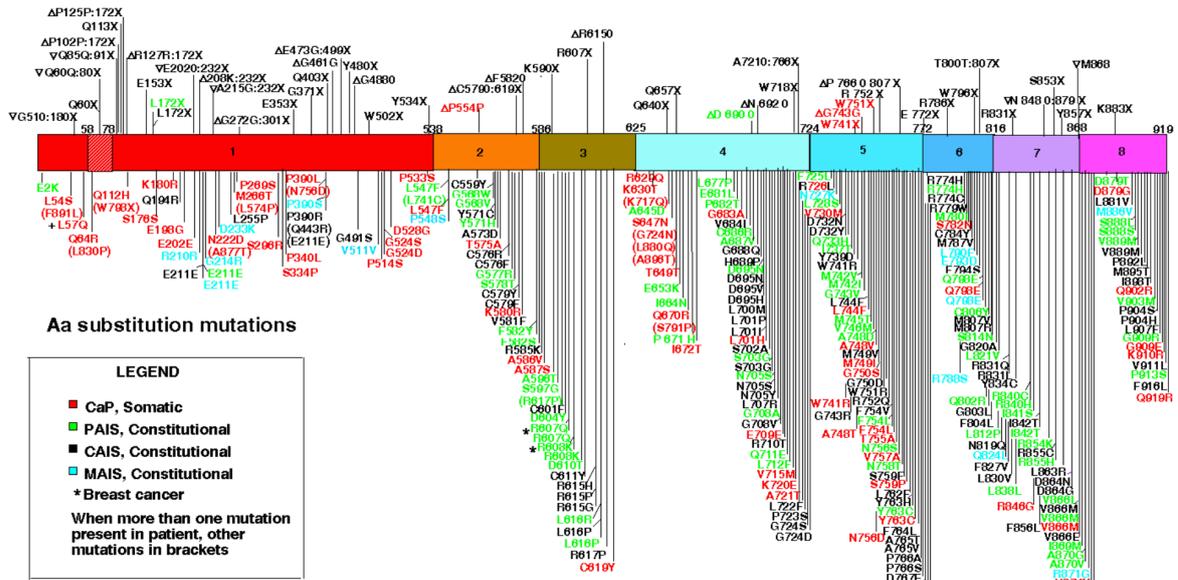
Abb.1b: Wirkungsweise des Androgenrezeptors (AR): Mechanismus der AR-Wirkungsweise: T: Testosteron; D: Dihydrotestosteron; HSP: Hitzeschock-Protein; ARE: Androgen-responsives Element; TF: Komplex aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren (A. Röpke et al. 2004, S.196).

1.2.1 Störungen des Androgenrezeptors

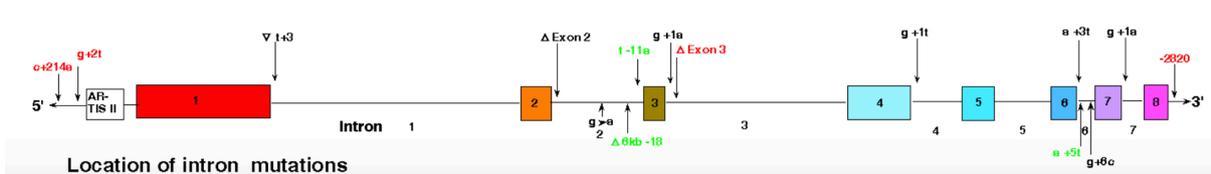
Eine große Anzahl von Mutationen im AR wurde bereits beschrieben, die Mehrheit der Mutationen liegt in der LBD (Abb.2 und Abb.3), seltener sind Mutationen in der DBD sowie der NTD (Elfferich et al. 2013). Mutationen im X-chromosomalen Androgenrezeptorgen können zu einer Androgenresistenz mit einer Vielzahl von klinischen Erscheinungen führen oder einem Prostatakarzinom assoziiert sein. In der Androgenrezeptordatenbank (androgendb.mcgill.ca: Abb.2) sind derzeit über 800 Fälle von AIS dokumentiert, diese stellen über 500 verschiedene AR-Mutationen dar (Gottlieb et al. 2012).

ANDROGEN RECEPTOR GENE MUTATIONS, 30-7-03

Premature termination mutations or 1-6 bp Δ or ∇



Location of splicing and untranslated region mutations



Location of intron mutations

Abb. 2: Darstellung von Mutationen des Androgenrezeptors mit Lokalisation (androgendb.mcgill.ca).

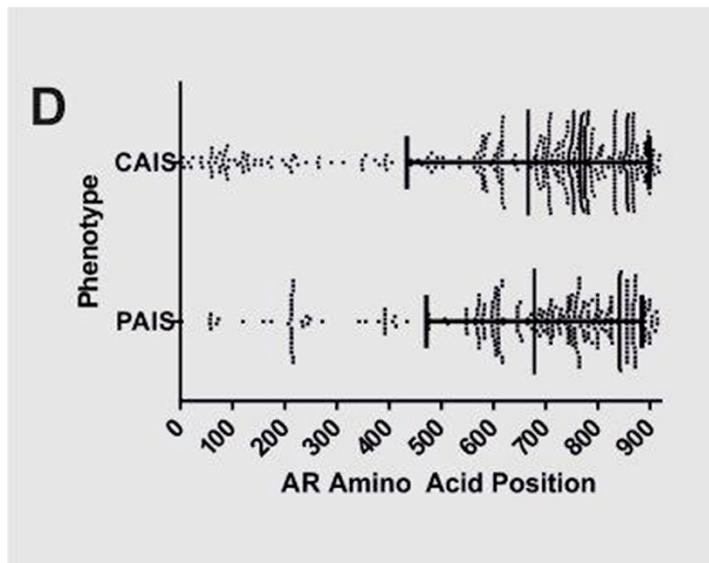
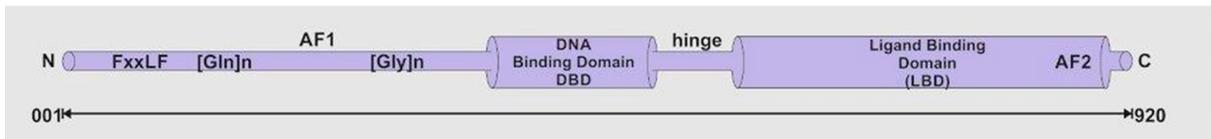


Abb.3: Intragenische Verteilung von CAIS und PAIS assoziierten Mutationen des AR bei Androgen insensitivity syndrome (Mongan et al. 2015, S.571).

1.2.2 Androgeninsensitivitätssyndrom

Mutationen im Androgenrezeptorgen können sich in einer milden (MAIS), partiellen (PAIS) oder kompletten (CAIS) Androgenresistenz (androgen insensitivity syndrome) mit entsprechendem Phänotyp (Tab.2a) ausdrücken.

Bei der kompletten Androgenresistenz (complete androgen insensitivity syndrome, CAIS) unterbleibt die Ausbildung männlicher Geschlechtsmerkmale vollständig, bei einem weiblichen Äußeren besteht dabei eine blind endende Vagina ohne Müller-Strukturen (normale AMH-Bildung durch die in der Bauchhöhle oder im Leistenkanal liegenden Hoden). Während der Pubertät kommt es zu einer Feminisierung mit Brustentwicklung (Aromatisierung von Testosteron zu Östradiol), die Menarche bleibt dabei jedoch aus und die sekundäre Körperbehaarung kann fehlen (Mongan et al. 2015). Bei der partiellen Androgenresistenz (partial androgen insensitivity syndrome, PAIS) reicht der Phänotyp von weiblich bis männlich. Durch die Restfunktion des Androgenrezeptors kommt es hier während der Pubertät zu einer Virilisierung. Von einer minimalen Androgenresistenz (minimal androgen insensitivity syndrome, MAIS) spricht man, wenn allein eine Infertilität vorliegt, eine Gynäkomastie oder reduzierte männliche Behaarung sind möglich (Holterhus 2009, Mongan et al. 2015).

Tab.2a: Einteilung des Androgeninsensivitätssyndrom (AIS) (nach Quigley et al. 1995): Engl.
 Abkürzungen: MAIS: mild androgen insensitivity syndrome, PAIS: partial androgen insensitivity syndrome, CAIS: complete androgen insensitivity syndrome

Grad nach Quigley	Äußeres Genital und klinische Eigenschaften
1 (MAIS)	Normaler männlicher Phänotyp, ggf. Gynäkomastie oder reduzierte männliche Behaarung.
2 (PAIS)	Männlicher Phänotyp: kleiner Penis, penoskrotale Hypospadie.
3 (PAIS)	Vorwiegend männlicher Phänotyp: Mikropenis, perineale Hypospadie, Kryptorchismus, ggf. bifides Skrotum.
4 (PAIS)	Nicht eindeutiges äußeres Genital: sehr große Klitoris, urogenitaler Sinus mit perinealer Mündung und Labioskrotalfalten.
5 (PAIS)	Vorwiegend weiblicher Phänotyp: große Klitoris, separate Öffnungen der Harnröhre und Vagina, geringe hintere Verschmelzung der großen Schamlippen.
6 (PAIS)	Weiblicher Phänotyp: androgenabhängige Scham- und Achselbehaarung zum Zeitpunkt der Pubertät. Inguinal oder labial lokalisierte Hoden. Leistenhernie in 50%.
7 (CAIS)	Normaler weiblicher Phänotyp: ausbleibende Scham- und Achselbehaarung zum Zeitpunkt der Pubertät. Inguinal oder labial lokalisierte Hoden. Leistenhernie in 50%.

Tab.2b: Einteilung der genitalen Phänotypen bei Virilisierungsstörungen nach Sinnecker et al. 1996, 1997 (aus Hiort et al. 1999)

Grad nach Sinnecker	Äußeres Genital und klinische Eigenschaften
1	Männlich, gestörte Spermatogenese und/oder gestörte Virilisierung in der Pubertät.
2	Vorwiegend männlich, isolierte Hypospadie und/oder Mikropenis und höhergradige Hypospadie, Skrotum bipartitum.
3	Ambivalent, klitorisähnlicher Mikrophallus, labienähnliches bipartiertes Skrotum, perineoskrotale Hypospadie oder Sinus urogenitalis mit kurzer, blind endender Vagina.
4	Vorwiegend weiblich, Klitorishypertrophie und/oder labiale Fusion, Sinus urogenitalis mit kurzer, blind endender Vagina.
5	Weiblich, präpuberal keine Virilisierungszeichen, in der Pubertät Virilisierung bei 5α -Reduktase-Defekt, Feminisierung bei Androgenrezeptordefekt.

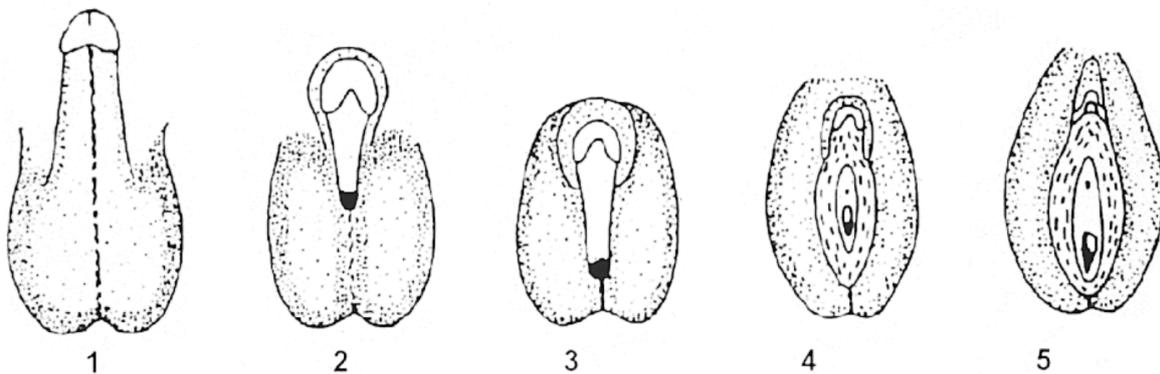


Abb.4: Einteilung der genitalen Phänotypen bei Virilisierungsstörungen nach Sinnecker (aus Hiort et al. 1999 S.688), die Stadien gehen aus Tbl.2b hervor.

1.3 Apolipoprotein D

Apolipoprotein D gehört zur Superfamilie der Lipocaline und ist ein Proteinbestandteil des high-density Lipoproteins (HDL). Anders als die meisten Lipoproteine, welche in der Leber gebildet werden, wird das ApoD hauptsächlich im Gehirn und Hoden exprimiert (Muffat und Walker 2010). Die Expression des 29-kDa Glykoproteins erfolgt sowohl im Erwachsenenalter als auch während der embryologischen oder postnatalen Entwicklung (Carmo et al. 2007).

Der physiologische Ligand konnte noch nicht definitiv identifiziert werden, in Zellkulturen konnte allerdings die ApoD-Expression durch verschiedene Stimuli wie Steroide, Interleukin-

1 α , 1,25-Dihydroxyvitamin, Retinsäure oder 25-Hydrocholesterin verstärkt werden (Carmo et al. 2007). Des Weiteren wurde eine veränderte Expression bereits in Verbindung mit verschiedenen neurologischen Störungen beschrieben (Alzheimer, Parkinson) und mit psychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Schizophrenie, bipolare Störung) (Muffat und Walker 2010, Rassart et al. 2000, Thomas et al. 2003). Außerdem wurde das Apolipoprotein D als stark androgenreguliertes Gen in kultivierten Genitalhautfibroblasten des Skrotums identifiziert (Appari et al. 2009). Es wird durch DHT in Skrotalhautfibroblasten signifikant hochreguliert, während CAIS Zellen nicht reagieren. Somit kann das Apolipoprotein D als Biomarker zur Abschätzung der AR-Restfunktion dienen (Appari et al. 2009, Hornig et al. 2016, 2018).

1.4 Fragestellung

Bei der Geschlechtsentwicklung kann es zu unterschiedlichen Störungen kommen, die sich in einer hohen phänotypischen Variabilität äußern. Besonders bei der Androgenresistenz ist die Genotyp-Phänotyp-Korrelation sehr gering (Rodien et al. 1996). Das PAIS kann zu einem ambivalenten äußeren Genital bei den Betroffenen führen, was die Geschlechtszuweisung erschweren kann. Selbst bei gleichen Mutationen im AR-Gen kann der Phänotyp große Unterschiede aufweisen (Holterhus et al. 2000). Für die Geschlechtszuweisung, korrekte Beratung, Prognose sowie Behandlung dieser Patienten wäre eine funktionelle Einschätzung hilfreich, die Auskunft über die Restaktivität des Androgenrezeptors gibt. Es existieren bereits einige Ansätze dazu. Die Bestimmung der Höhe des AMH hat sich als wirksam zur Differenzierung zwischen Gonadendysgenesien und Androgensynthesestörung erwiesen. Ein weiterer Sertollizellmarker, Inhibin B, kann zur Beurteilung der gonadalen Funktion bei Patienten mit DSD genutzt werden (Hiort et al. 2014). Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der diagnostischen Sequenzierung des AR-Gens, allerdings sind die Mutationen im AR nicht die einzige molekulare Basis für AIS. Während es bei den CAIS Patienten noch über 90% sind, die eine Mutation in der kodierenden Sequenz zeigen, sind es bei den PAIS Patienten weniger als 40% (Mongan et al. 2015). Funktionsuntersuchungen des AR im Genitalhautzielgewebe wurden durch Androgenbindungsassays durchgeführt (Kaufmann et al. 1981). Ein anderer Ansatz wurde durch Sinnecker und Mitarbeiter verfolgt. Bei betroffenen Individuen wurde die Herabregulation des sexualhormon-bindenden Globulins (SHBG) durch das nicht virilisierende Anabolikum Stanozolol im Blut gemessen (Sinnecker und Köhler 1989). Der molekulare Mechanismus wurde nie aufgeklärt.

Einen aktuellen Ansatz stellt das Protein Apolipoprotein D dar, welches ein Biomarker der Androgenrezeptor-vermittelten Transkription ist (Appari et al. 2009, Hornig et al. 2016, 2018). Die ApoD-Induktion soll zur Ermittlung der Androgenrezeptor-Restfunktion dienen und so eine funktionelle Diagnosestellung als AIS ermöglichen.

Der ApoD-Assay misst die androgen-abhängige Transkription des Androgenrezeptor-Zielgens Apolipoprotein D (ApoD) in menschlichen Genitalhautfibroblasten und stellt damit einen Funktionstest für den Androgenrezeptor in Patienten mit der Verdachtsdiagnose Androgenresistenz dar (Appari et al. 2009, Hornig et al. 2016, 2018).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll dieser Assay in Hinblick auf unterschiedliche Einflussfaktoren untersucht werden. Dazu werden unterschiedliche Hormonkonzentrationen, Gewebetypen (Skrotalhaut versus Vorhaut), klinische Indikationen (Androgenresistenz versus gemischte Gonadendysgenesien versus Kontrollen) sowie bisher nicht beschriebene Mutationen im AR-Gen analysiert.

Dabei sollen folgende Punkte erforscht werden:

- 1.) Ist eine Optimierung des ApoD-Assays möglich? Welche Rolle spielt dabei die Inkubationszeit, welche die Hormonkonzentration?
- 2.) Funktionelle Charakterisierung bisher nicht publizierter bzw. nicht funktionell charakterisierter AR-Gen Mutationen. Welche Unterschiede zeigen die Gewebetypen in der ApoD-Induktion. Zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Mutation, ApoD-Induktion und Klinik?
- 3.) Funktionelle Charakterisierung des Androgenrezeptors bei 45,X/46,XY gemischter Gonadendysgenese. Zeigt sich ein Zusammenhang zwischen 45,X/46,XY-Verhältnis, ApoD-Induktion und Klinik?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Zellkulturen

Die in dieser Arbeit verwendeten Genitalhautfibroblasten stammen zum einen von Biopsien der Skrotalhaut bzw. Vorhaut von männlichen Kontrollen mit unauffälligem äußeren Genital und zum anderen aus der Haut des Labioskrotalbereichs bzw. der Vorhaut oder der Labia minora von Patienten/ Patientinnen mit Androgenresistenz bzw. Gonydendysgenese.

Die Untersuchungen zur androgenregulierten Genexpression in kultivierten Genitalhautfibroblasten wurden von den Ethikkommissionen der Universität Kiel bewilligt (Aktenzeichen D 401/14).

Tab.3: Auflistung der Fibroblasten-Zelllinien aus Kontrollbiopsaten

Zelllinie	Anatomischer Ursprung	Alter bei Biopsie (in Jahren)	Klinische Indikation/ Hintergrund
Kis 3	Skrotum	30,93	Vasektomie
Kis 30	Skrotum	0,88	Orchidopexie
Kis 36	Skrotum	2,98	Orchidopexie
Kis 37	Skrotum	5,19	Orchidopexie
Kis 39	Skrotum	2,20	Orchidopexie
Kis 43	Skrotum	9,19	Orchidopexie
KIV 7	Präputium	10,45	Phimose
KIV 13	Präputium	6,14	Phimose
KIV 21	Präputium	44,18	Phimose, fertil
KIV 28	Präputium	0,53	Zirkumzision, Phimose
KIV 35	Präputium	2,46	Zirkumzision, Phimose
KIV 40	Präputium	2,30	Zirkumzision, kulturelle Indikation
S3	Labioskrotal	12,58	Hodontorsion, Orchidopexie
S9	Labioskrotal	34	Infertilität

Tab.4: Auflistung der Fibroblasten-Zelllinien aus Genitalhaut-Biopsaten von DSD-Individuen, sowie Informationen zum äußeren und inneren Genital (soweit vorhanden)

Zelllinie	Anatomischer Ursprung	Alter bei Biopsie (in Jahren)	AIS-Einteilung/ Mutation	Genitale
C1534	Labioskrotal	6,83	PAIS/ A646D	Männlich, bifides Skrotum, perineoskrotale Hypospadie
C1956	Labioskrotal	7,43	PAIS/ L270F	Weiblich, Klitoromegalie
GS408	Präputium	12,04	PAIS/ A137S	Mikropenis, penoskrotale Hypospadie
GS432	Skrotum	0,86	PAIS/ N757S	Skrotum bipartitum
GS597	Präputium	16,24	PAIS/ A720T	Penoskrotale Hypospadie
HvHF135	Genitalhaut (verm.Labie/Skrotum)	14,28	CAIS/ S310fsX	Weiblich
S8	Labioskrotal	31	MAIS/ I842S	Männlich
12F432	Vermutlich Skrotum	15,25	PAIS/ A646D	Penoskrotale Hypospadie, unilateraler Kryptorchismus bei Geburt
3A	Labia minora	40	CAIS/ P219fsX224pS221	Weiblich
5A	Präputium der Klitoris	1	PAIS/ I681N	Uneindeutig
8A	Labia minora	1	CAIS/Y782D	Weiblich

Tab.5: Auflistung der Fibroblasten-Zelllinien aus Genitalhaut-Biopsaten von Individuen mit Gonadendysgenese, sowie Informationen zum äußeren und inneren Genitale (aus Arztbriefen)

Zelllinie	Anatomischer Ursprung	Alter bei Biopsie (in Jahren)	Genitale
GS264	Skrotum	0,05	Mikropenis, Skrotum labia majora-ähnlich, Sinus urogenitalis und große Vaginalanlage, Hoden deszendiert
GS126	Genitalhaut	4,14	Mehrdeutiges Genitale, Hypospadie 3.Grades, Sinus urogenitalis communis, Vaginalanlage. Rechte Gonade inguinal (Hodengewebe), links dysgenetische ovarähnliche Gonade,Uterus
GS401	Skrotum	0,91	Mikropenis, Skrotum bifidum, penoskrotale Hypospadie, blind endende Vagina. Hoden intraskrotal tastbar, rechts dysgenetisches Gewebe
GS159	Labia majora	0,49	Mehrdeutiges Genitale, „dysplastische Vagina“, links weibliche Keimanlage (Tubenschnitt kein Ovar), rechts männliche Keimanlage (primitive Hodentubuli)
GS503 (selber Pat. wie GS504)	Skrotum	1,23	Mikropenis, Skrotale Hypospadie, Vaginalanlage. Links nicht komplett deszendierte dysgenetische Gonade, rechts kein sicheres Gonadengewebe tastbar
GS504	Labia majora	1,23	
GS637	Skrotum	3,88	Penoskrotale Hypospadie, deszendierte Hoden
GS582 (selber Patient wie GS503/GS 504)	Skrotum	2,99	Siehe GS503/504
GS583	Skrotum	3,7	Penile Hypospadie, unauffälliges Skrotum
GS146	Vorhaut	0,59	Mehrdeutiges Genitale, intraabdominell liegende funktionsfähige Gonaden
GS554	Vorhaut	0,19	Mikropenis, Skrotum bipartum, Sinus urogenitalis rudimentär, skrotale Hypospadie. Links hypoplastische Gonade inguinale Lage (rudimentäres Ovar mit rudimentärer Tube und rudimentären Anteilen des Wolff'schen Ganges), rechts labioskrotale Lage (Hodengewebe)
3N	Vorhaut	19	Phänotyp uneindeutig mit weiblicher Geschlechtszuordnung. In spontaner Pubertät virilisiert
ARD352 (V.a. Gonaden- dysgenese)	Penis	4,45	Penile Hypospadie

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte

Sicherheitswerkbank	Gelaire, Flow Laboratories, Meckenheim
Pipetten	Reference, Eppendorf, Hamburg
Elektrische Pipette	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Inkubator	Heracell, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts
Zentrifuge	5417 R, Eppendorf, Hamburg
PCR-Cycler	Mastercycler, Eppendorf, Hamburg
NanoDrop Spektrophotometer	ND-1000, Peqlab, Erlangen
qRT-PCR-Cycler	LightCycler 480II, Roche, Mannheim

2.2.2 Chemikalien und Kits

Medium	PBS, Gibco, life technologies, Carlsbad, Kalifornien DMEM, Gibco, life technologies, Carlsbad, Kalifornien FBS Superior, Biochrom, Berlin Trypsin-EDTA, biowest, Nuaille, Frankreich Penicillin/Streptomycin, Gibco, life technologies, Carlsbad, Kalifornien L-Glutamin, Biochrom, Berlin Hepes Buffer Solution (1M), Gibco, life technologies, Carlsbad, Kalifornien Freezing medium, Gibco, life technologies, Carlsbad, Kalifornien
Lyse Buffer	Buffer RLT, Qiagen, Hilden
RNA-Kit	RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden
cDNA-Kit	Reverse Transcription Kit, Qiagen, Hilden
PCR-Kit	Quanti Nova Syber green PCR Kit, Qiagen, Hilden

2.2.3 Verbrauchsartikel

Zellkulturflaschen	TC-Flaschen, Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturschalen	TC-Schale, Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips, Sarstedt, Nürnberg
Glaspipetten	Serologische Pipette, Sarstedt, Nürnberg
Schraubröhren	Tube, Sarstedt, Nürnberg
Pasteurpipetten	Pasteurpipetten ISO 7712, Hecht Assistent, Sondheim
LightCycler Platten	LightCycler 480 Multiwell Plate 96, Roche, Mannheim
Kleine Plastik Gefäße	SafeSeal, Sarstedt, Nürnberg

2.2.4 Primer

Die verwendeten Primer für ApoD und SDHA wurden von Qiagen gekauft und nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

2.3 Methoden

2.3.1 Fibroblastenkultivierung

Für die durchgeführten Experimente wurden die Fibroblasten bei 37°C mit 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von mindestens 90% kultiviert. Das benutzte Medium bestand aus phenol red free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, life technologies) ergänzt mit 10% fetal bovine serum (FBS, Biochrom), 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin, 2mM L-Glutamin (Biochrom) und 20mM HEPES Puffer (life technologies). Zur Lagerung wurden die Zellen in 1ml freezing medium (Gibco) überführt und in Flüssigstickstoff eingefroren.

2.3.2 Apolipoprotein D Assay

Für die Hormoninduktionsexperimente (ApoD-Assay) wurden je nach Experiment mindestens sieben 60mm Kulturschalen mit $1,6 \times 10^5$ Zellen in 3ml Medium ausgesät und bei 37°C mit 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 24 Stunden wurde t₀ abgenommen, in dem in einer Schale das Medium komplett abgesaugt wurde und die Zellen mit 600µl RNA-Extraktions Buffer (RLT; Qiagen) gelöst und bei -80°C eingefroren wurden. Alle übrigen Schalen wurden dreimal in Zellkulturmedium ohne FBS gewaschen. Daraufhin wurden drei Schalen mit 10% (full serum conditions (-SS)) Kohle-behandeltem FBS und drei Schalen mit 0,1% (serum starved conditions (+SS)) Kohle-behandeltem FBS befüllt. Die Kohle-Behandlung diente der Entfernung von Hormonen aus dem Serum. Drei Schalen mit gleicher FBS-Konzentration wurden dann jeweils folgendermaßen behandelt: unbehandelt, mit Ethanol (EtOH) oder mit Dihydrotestosteron (DHT) und bei 37°C mit 5% CO₂ für 72h inkubiert. Bei Verwendung unterschiedlicher DHT-Konzentrationen und/oder unterschiedlicher Inkubationszeiten wurde die Anzahl der Schalen entsprechend erhöht (Tab.6). Die unterschiedlichen DHT-Konzentrationen dienten zur Bestimmung der maximalen Aktivierbarkeit des AR. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit RLT-Puffer lysiert und bei -80°C eingefroren.

Tab.6: Behandlung der Inkubationsschalen bei den verschiedenen Hormoninduktionsexperimenten (Standard, Zeit, Konzentration). Inkubationszeit: t0=24h, t48=48h, t72=72h. Behandlung mit 10% FBS haltigem Medium (-SS) bzw. mit 0,1% FBS haltigem Medium (+SS)

Konditionen	Standardreihe	Zeitreihe	Konzentrationsreihe
unbehandelt	t0 t72-SS t72+SS	t0 t48-SS t48+SS t72-SS t72+SS	t0 t72+SS
Dihydrotestosteron	t72-SS+10nMDHT t72+SS+10nMDHT	t48-SS+10nMDHT t48+SS+10nMDHT t72-SS+10nMDHT t72+SS+10nMDHT	t72+SS+ 0,1nMDHT t72+SS+1nMDHT t72+SS+10nMDHT t72+SS+100nMDHT
Ethanol	t72-SS+0,01%EtOH t72+SS+0,01%EtOH	t48-SS+0,01%EtOH t48+SS+0,01%EtOH t72-SS+0,01%EtOH t72+SS+0,01%EtOH	t72+SS+0,01%EtOH

2.3.3 RNA Isolation

Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den Fibroblasten mittels des RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen. Dazu mussten die gewonnenen Proben zunächst aufgetaut und 10 Sekunden auf dem Vortex geschüttelt werden, um eine homogene Lösung zu erhalten. Danach wurden je 600µl 70% Ethanol zu den Lysaten zugefügt und durch pipettieren gut gemischt. Anschließend wurden je 600µl der Lysate entnommen und in Säulen überführt, diese wurden bei 10000rpm für 15 Sekunden zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und der Vorgang mit dem restlichen Lysat wiederholt. Im nächsten Schritt wurden 700µl RW1 Buffer hinzugefügt und 15 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert, der Überstand konnte erneut verworfen werden (Waschphase 1). Der Vorgang wurde mit 500µl RPE Buffer (Waschphase 2) wiederholt, danach wurden erneut 500µl RPE Buffer hinzugefügt (Waschphase 3) und für zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Nach den Waschphasen konnten die Säulen in neue 2ml Röhrchen platziert werden und für eine Minute bei höchster Geschwindigkeit zum Trocknen zentrifugiert werden, danach konnten die Säulen in 1,5ml Eppendorf Röhrchen platziert werden. Daraufhin folgte die Elutionsphase: Hier wurden je 30µl RNase freies Wasser in die Säulen pipettiert, fünf Minuten gewartet und danach für eine Minute bei 10000rpm zentrifugiert. Die so aufgereinigte RNA wurde danach mittels Nano Drop auf ihre Qualität und Quantität geprüft. Die gewonnenen Proben konnten bei -80°C eingefroren oder bis zum nächsten Schritt auf Eis gelagert werden.

2.3.4 Reverse Transkription

Die gewonnene RNA wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) durch Reverse Transkription in cDNA umgewandelt. Zunächst wurde RNase freies Wasser und RNA nach Schema in kleine Röhrchen pipettiert, dazu wurden 2µl Wipeout Buffer zugegeben, sodass sich ein totales Volumen von 14µl ergab. Nach gutem Mischen und kurzem Zentrifugieren folgte eine Inkubation bei 42°C für fünf Minuten. Dies diente der Elimination von genomischer DNA. Anschließend wurde der Ansatz bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert.

Tab.7: Master-Mix je Reaktionsansatz

1µl	Reverse Transcription Master Mix (Quantiscript Reverse Transkriptase)
4µl	Quantiscript RT Buffer
1µl	RT Primer Mix

Danach wurden je 6µl Master-Mix (Tab.7) zu den RNA-Ansätzen gegeben. Nach kurzem Zentrifugieren erfolgte eine Inkubation im Mastercycler zunächst bei 42°C für 30 Minuten (reverse Transkription), dann bei 95°C für drei Minuten (Inaktivierung der reversen Transkriptase). Die Lagerung der gewonnenen cDNA erfolgte bei -20°C.

Tab.8: Pipettierschema (Beispiel) für cDNA

Sample 1	Volume (µl)	µl	Sample 2	Volume (µl)	µl
Conc.: 41,72 ng/µl	Wipeout	2	Conc.: 46,8 ng/µl	Wipeout	2
	RNA	11,9		RNA	10,7
	H2O	0,1		H2O	1,3
	Total	14		Total	14

Sample 3	Volume (µl)	µl	Sample 4	Volume (µl)	µl
Conc.: 46,91 ng/µl	Wipeout	2	Conc.: 42,86 ng/µl	Wipeout	2
	RNA	10,7		RNA	11,7
	H2O	1,3		H2O	0,3
	Total	14		Total	14

Sample 5	Volume (µl)	µl	Sample 6	Volume (µl)	µl
Conc.: 40,13 ng/µl	Wipeout	2	Conc.: 39,98 ng/µl	Wipeout	2
	RNA	11,7		RNA	11,9
	H2O	0,3		H2O	0,1
	Total	14		Total	14

2.3.5 qRT-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR quantitative real-time polymerase chain reaction) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die zusätzlich die DNA-Amplifikation quantitativ und in Echtzeit erfasst.

Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, der verwendete DNA-Farbstoff bindet dabei an doppelsträngige DNA und verursacht dadurch einen Fluoreszenzanstieg. Dadurch können spezifische Absorptions- und Emissions-Maxima gemessen werden. Für diese Untersuchungen wurde der SYBR-Green PCR-mix (Qiagen) verwendet und die Messungen im LightCycler (Roche) durchgeführt.

Zur Auswertung des Ganzen (relative Quantifizierung) wird eine Normalisierung durchgeführt. Hierzu muss zusätzlich zum untersuchten Gen ein weiteres Referenzgen mitgemessen werden und die Amplifikation des Ziel-Gens anschließend ins Verhältnis dazu gesetzt werden. Von diesem Housekeeping-Gen - hier wurde SDHA (succinatdehydrogenase complex, subunit A) verwendet, wird eine konstante Expression erwartet, die unabhängig vom Zellzyklus, Zelltyp und experimentellen Behandlungen der Zellen ist (Holzapfel und Wickert 2007, Pfaffl 2004). Neben SDHA wurde folgender transkriptionsspezifische Primer verwendet: ApoD.

Für die qPCR-Reaktion wurden zunächst Wasser und cDNA, die kurz gevortext wurde, nach Schema in 1,5ml Eppendorf Röhrchen zusammen pipettiert: Danach wurde der SYBR Green PCR Mix, der dunkel und kalt gelagert wurde, hinzugefügt und alles gut gemischt.

Anschließend wurden zunächst die verwendeten Primer auf die qRT-PCR-Platten pipettiert und die unterschiedlichen Master-Mixe (Tab.9) hinzugefügt. Pro DNA-Probe wurden so zwei Ansätze für das Ziel-Gen und zwei Ansätze für das Housekeeping-Gen hergestellt.

Tab.9: Master-Mix je Reaktionsansatz

10µl	SYBR Green PCR Mix
0,5µl	cDNA
7,5µl	Wasser

Im Anschluss wurden die LightCycler-Platten verschlossen und für eine Minute bei 2700rpm zentrifugiert. Danach konnte die Platte auf den Rotor des LightCyclers gelegt werden und die qRT-PCR gestartet werden (Tab.10).

Tab.10: Lightcycler-Programm

Denaturierung	95°C	15 Min
	94°C	15 Sek
Cycling (38 Zyklen)	55°C	30 Sek
	72°C	30 Sek
Schmelzkurve	Bis 95°C	Anstieg 0,29°C/s

Statistische Auswertung des ApoD Assays:

Die qPCR-Daten wurden mit der Formel $R=2^{-(\Delta CP_{tx}-\Delta CP_{t0})}$ ausgewertet, wobei R die relative Expression und ΔCP die Differenz zwischen ApoD und SDHA-Expression ist. T0 ist dabei die unbehandelte Probe, die nach 24 Stunden entnommen wurde (Kontrolle), tx die mit DHT bzw. EtOH behandelte Probe nach einer bestimmten Inkubationszeit. Basierend auf dieser Rechnung konnte das Verhältnis zwischen DHT und EtOH-induzierter ApoD-Transkription errechnet werden.

2.3.6 Methoden zur Darstellung der Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors

Die LBD hat eine konservierte Struktur, die mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse dargestellt werden konnte (Sack et al. 2001). So entsteht ein Einblick in die räumlichen Strukturen und Beziehungen der LBD zum Liganden. Mit Hilfe der Ribbon-Software, welche kristallographische Ergebnisse analysiert und Bilder erstellt (Carson 1997), kann nun die LBD des AR mit bestimmten Mutationen in einem 3D-Modell dargestellt werden.

Mit Hilfe der Ribbon-Software konnte Prof. Dr. J. Grötzinger (Biochemisches Institut der CAU Kiel) eine Abbildung zur Ligandenbindungsdomäne des AR mit einigen der untersuchten Mutationen für diese Arbeit erstellen.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Hormoninkubation auf den Apolipoprotein D-Assay

3.1.1 Inkubationszeit

Zunächst sollte die optimale Inkubationszeit von Genitalhautfibroblasten (GF) aus Skrotum sowie Vorhautgewebe mit DHT in Bezug auf die Transkription von ApoD analysiert werden. Dazu wurden GF aus Vorhaut- sowie Skrotalgewebe für 48 Stunden und 72 Stunden mit 10nM DHT inkubiert. Diese DHT-Konzentration entspricht den in der Literatur beschriebenen Werten (Appari et al. 2009). Die GF wurden jeweils in 10% und 0.1% serumhaltigem Medium während der DHT-Behandlung inkubiert.

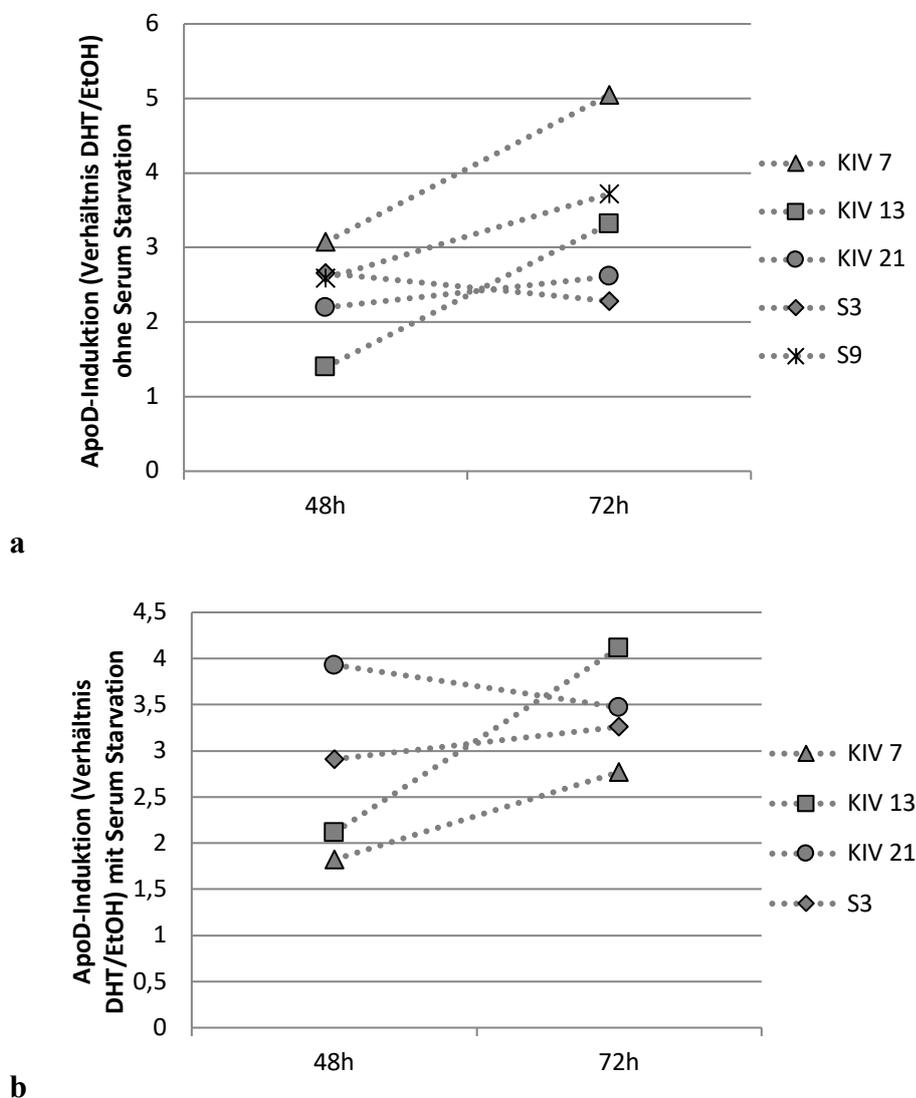


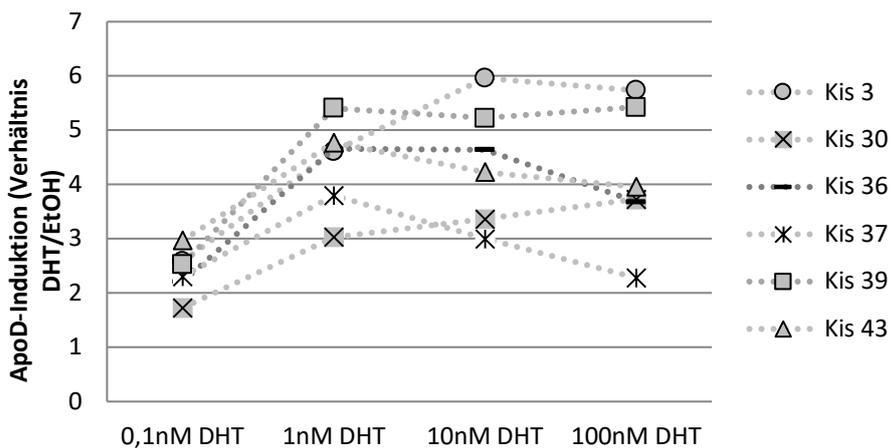
Abb.5: Induktion von ApoD bei einer Hormoninkubationszeit von 48 und 72 Stunden
Induktion von ApoD nach Behandlung der Skrotal- und Vorhautfibroblasten aus Kontrollzelllinien mit 10nM DHT und einer Inkubationszeit von 48 und 72 Stunden.
a.) mit 10% FBS haltigem Medium (ohne Serum Starvation)
b.) mit 0,1% FBS haltigem Medium (mit Serum Starvation).

Die Abbildungen 5a und b zeigen die ApoD-Induktion bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. Nach 48 Stunden ist bereits ein mittlerer 2,38facher ApoD-Anstieg aller getesteten GF gegenüber dem Ausgangswert ohne Stimulation mit einer STDV von 0,63 (10% FBS) zu sehen (0,1% FBS: 2,69fach, STDV 0,94). Nach 72 Stunden erkennt man meist noch eine höhere Induktion, diese ist allerdings weder in 0,1% noch in 10% FBS-haltigem Zellmedium signifikant gegenüber einer Inkubationszeit von 48 Stunden ($p=0,24$ für 0,1%FBS; $p=0,11$ für 10% FBS). Ein Unterschied zwischen Vorhaut- und Skrotalhautfibroblasten zeigt sich nicht ($p\geq 0,5$). Da bei den meisten GF jedoch ein Anstieg von 48 Stunden zu 72 Stunden sichtbar war, wurde für die weiteren Experimente eine Inkubationszeit von 72 Stunden festgelegt. Des Weiteren wurde 0,1% (serum starved conditions) Kohle-behandeltes FBS verwendet, wodurch eine geringere Streuung und eine bessere Vergleichbarkeit bewirkt werden soll (10% FBS haltiges Medium nach 72h 3,395facher Anstieg STDV 1,08; 0,1% FBS haltiges Medium nach 72h 3,4facher Anstieg STDV 0,56).

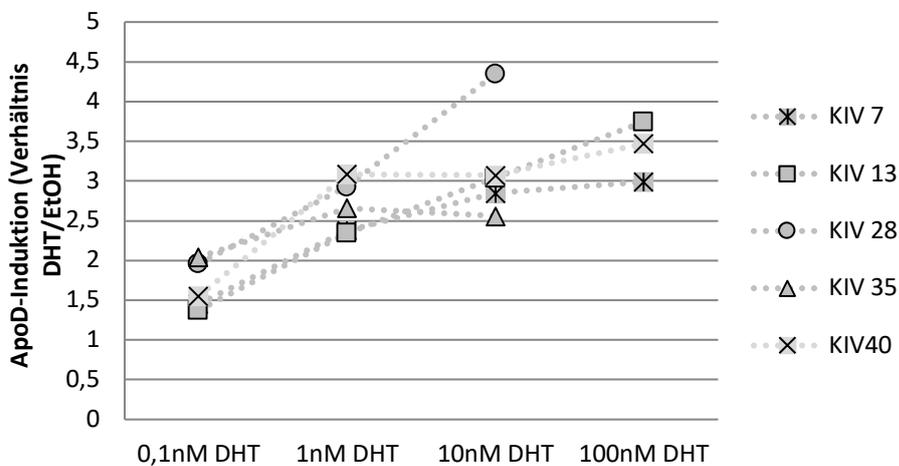
3.1.2 Konzentrationsabhängigkeit

Ein weiterer Punkt neben der Inkubationszeit, welcher modifiziert werden kann, ist die Hormonkonzentration. Dazu wurde die Transkription von ApoD unter Verwendung unterschiedlicher DHT-Konzentrationen untersucht. Die GF aus Vorhaut- sowie Skrotalhautgewebe wurden in diesem Experiment für 72 Stunden mit 0,1nM, 1nM, 10nM und 100nM DHT inkubiert. Während der DHT-Behandlung wurden die Fibroblasten jeweils in 0,1% serumhaltigem Medium inkubiert.

Die Abbildungen 6a und b zeigen die ApoD-Induktion von Skrotalhaut- und Vorhautfibroblasten aus Kontrollzelllinien nach einer Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von DHT. Es lässt sich ein Unterschied zwischen den Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs erkennen. Während bei der Induktion an den Skrotalhautfibroblasten ein Plateau bei 10nM DHT erreicht wird und höhere Konzentrationen sogar einen Induktionsabfall bei 4 von 6 Zelllinien bewirken, lässt sich bei den Vorhautfibroblasten auch bei höheren Konzentrationen (100nM) noch ein Anstieg verzeichnen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Konzentration der Hormone, die genutzt wird von dem Ursprung der Zellkultur ausgemacht werden muss. Bei Skrotalhaut kann man dabei niedrigere Konzentrationen als bei Vorhautfibroblasten verwenden, um maximale ApoD-Induktionen zu erhalten.



a



b

Abb.6: Induktion von ApoD bei einer Hormonkonzentration von 0,1; 1; 10 und 100nM DHT
Induktion von ApoD nach Behandlung der Skrotal- und Vorhautfibroblasten aus Kontrollzelllinien mit DHT und einer Inkubationszeit von 72 Stunden.

a.) Skrotalhaut

b.) Vorhaut.

3.2 Funktionsanalyse unbekannter sowie bekannter Mutationen des Androgenrezeptors

Auf Basis der Voruntersuchungen an Kontroll-Fibroblasten wurde nun die AR-Funktion in GF mit bisher nicht beschriebenen Mutationen sowie bekannten Mutationen untersucht, deren Funktion in der Literatur noch nicht in einem Funktionstest überprüft wurde. Die Literaturhinweise zu den einzelnen Mutationen sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Zunächst wurden GF skrotalen Ursprungs untersucht. Diese wurden für 72 Stunden mit 0,1nM, 1nM, 10nM und 100nM DHT sowie 0,1% serumhaltigem Medium inkubiert. Nach der Inkubation wurde die ApoD-Induktion gemessen.

Tab.11: Darstellung der untersuchten Skrotalhautzelllinien mit Angabe der Mutation, AR mRNA (relative Expression normalisiert gegen SDHA), Alter, äußeres Genital sowie klinischer Angaben, welche in der Literatur zu den untersuchten Mutationen beschrieben wurden

Zelllinie (Mutation)	AR mRNA Level	Alter (in J.)	Sinnecker Skala	Literatur
S8 (I842S)	0,004	31	1	Mutation in LBD, Mutation publiziert (Hiort et al. 1996), aber nicht funktionell charakterisiert
GS 432 (N757S)	0,08	0,86	2	Substitution in LBD, Gynäkomastie in Literatur beschrieben (Hellmann et al. 2012, Immunglobulinassay), aber nicht funktionell charakterisiert
12F432 (A646D)	0,094	15,25	2	Siehe C1534
C1534 (A646D)	0,054	6,83	2	Mutation in Hinge Region zwischen DBD und LBD, sehr variabler Phänotyp, eher geringer Effekt der Mutation auf AR-Funktionalität, die Kombination aus short PolyG und long PolyQ (N-terminale Domäne)+Mutation spielen eine Rolle (Werner et al. 2006), die Mutation kommt auch in der Kontrollpopulation vor (Lundin et al. 2006). Mutation funktionell charakterisiert (Transaktivierungsassay in CHO-Zellen)
C1956 (L272F)	0,88	7,43	4	Mutation N-terminal, Mutation publiziert (Ferlin et al. 2006) und funktionell charakterisiert (Tadokoro-Cuccaro et al. 2014, Transaktivierungsassay in COS-Zellen)
HvHF 135 (S310fsX)	0,05	4	5	Stoppmutation (disruptiv)

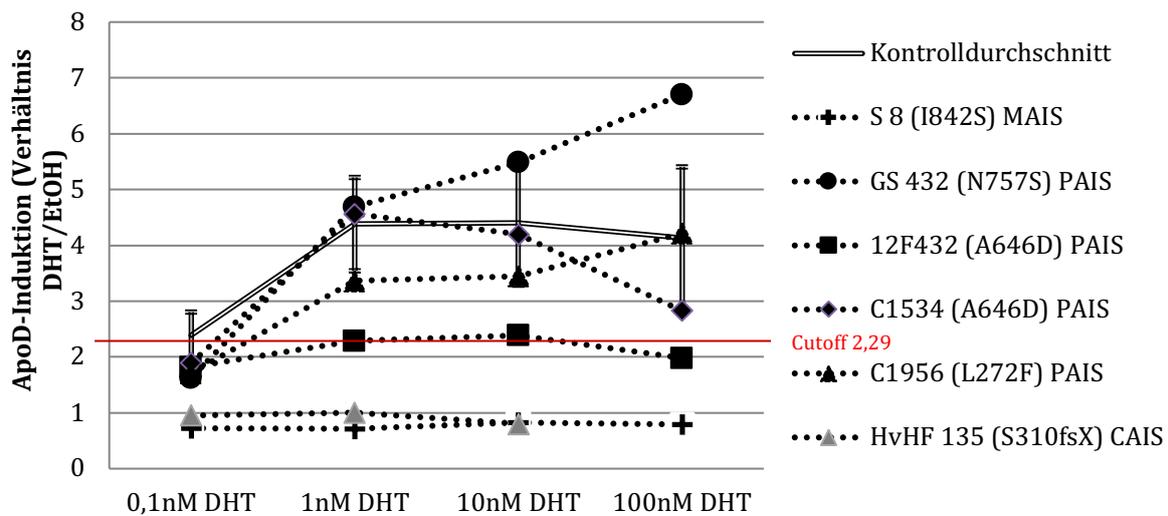


Abb.7: ApoD-Induktion bei Kontrollen und Mutationen der Skrotalhaut unter verschiedenen DHT-Konzentrationen (0,1; 1; 10 und 100 nM). In Klammern ist die Mutation angegeben, dahinter die AIS Einteilung (MAIS, PAIS oder CAIS).

Als Positivkontrolle ist der Durchschnitt der Ergebnisse an sechs Kontrollfibroblasten aus Skrotalhaut mit entsprechender STDV angegeben, als Negativkontrolle die Stoppmutation HvHF135.

Zusätzlich ist der Cutoff, der die männliche GF-Kontrollgruppe von AIS-GF unterscheidet angegeben (Hornig et al. 2016).

Die Abbildung 7 zeigt die ApoD-Induktion bei Skrotalhautproben mit Mutationen im AR unter steigenden Hormonkonzentrationen (Werte im Anhang Seite 56). Von diesen Mutationen sind zwei (A646D, L272F) mit einem Transaktivierungsassay an CHO- (Chinese Hamster Ovary) bzw. COS-Zellen (CV-1 in Origin, carrying SV40) funktionell gesichert. Als Positivkontrolle ist der Durchschnitt der durchgeführten Experimente an Kontrollen aus Skrotalhautbiopsaten dargestellt, als Negativkontrolle dient eine Stoppmutation, welche sich klinisch als CAIS ausdrückt. Der Cutoff für männliche Skrotalhautfibroblasten liegt bei 2,29 und wurde bei einer DHT-Konzentration von 10nM an Kontrollen festgelegt (Hornig et al. 2016). Bei diesem Experiment erreichten 4 von 5 Zelllinien mit Mutation diesen Cutoff. I842S liegt unter dem Cutoff und überschneidet sich mit der Negativkontrolle. Es wird keine ApoD-Induktion erreicht, die Mutation befindet sich in der LBD.

N757S steigt mit steigender DHT-Konzentration, hier lässt sich kein Plateau erkennen.

Die beiden Zelllinien mit der Mutation A646D, welche von zwei unterschiedlichen Individuen stammen, zeigen im durchgeführten ApoD-Assay eine unterschiedliche Induktion. Während die eine bei fast allen Ligandenkonzentrationen unterhalb des Cutoffs liegt, zeigt die andere Zelllinie mit der gleichen Mutation, bereits bei 1nM eine ApoD-Induktion oberhalb des Cutoffs, ab 10nM fällt diese wieder ab. Das ist ein interessanter Befund, weil er auf die Bedeutung des individuellen intrazellulären Kontexts für die Funktion des AR hinweist.

L272F zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollkohorte in den untersuchten DHT Konzentrationen.

Des Weiteren wurden GF aus Vorhaut im ApoD-Assay analysiert. Die Literaturhinweise zu den einzelnen Mutationen sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tab.12: Darstellung der untersuchten Vorhautzelllinien mit Angabe der Mutation, AR mRNA (relative Expression normalisiert gegen SDHA), Alter, äußeres Genital sowie klinischer Angaben, welche in der Literatur zu den untersuchten Mutationen beschrieben wurden

Zelllinie	AR mRNA Level	Alter (in J.)	Sinnecker Skala	Literatur
GS 408 (A137S)	0,065	12,04	2	Mutation N-terminal, bisher nicht publiziert
GS 597 (A720T)	0,066	16,24	2	Mutation in LBD, bisher nicht in der McGill Datenbank publiziert, aber in Zusammenhang mit Prostata-Karzinom beschrieben (Heinlein et Chang 2004), nicht funktionell charakterisiert
5A (I681N)	0,11	1	3	Substitution LBD, Genital uneindeutig, Mutation publiziert (Audi et al. 2010, Hormonbindungsassay), aber nicht funktionell charakterisiert
8A (Y782D)	0,11	1	5	Substitution LBD, normales weibliches Genital, Mutation publiziert (Audi et al. 2010, Hormonbindungsassay), aber nicht funktionell charakterisiert
3A (P219fsX224pS221)	0,056	40	5	Stoppmutation (disruptiv)

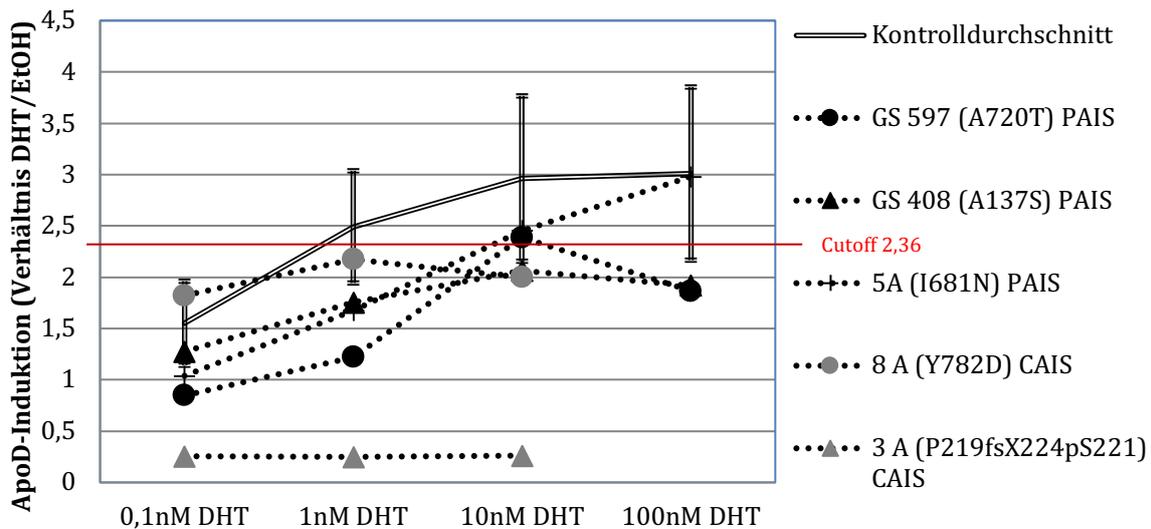


Abb.8: ApoD-Induktion bei Kontrollen und Mutationen der Vorhaut unter verschiedenen DHT-Konzentrationen (0,1; 1; 10 und 100 nM). In Klammern ist die Mutation angegeben, dahinter die AIS Einteilung (MAIS, PAIS oder CAIS).

Als Positivkontrolle ist der Durchschnitt der Ergebnisse an sechs Kontrollfibroblasten aus Vorhaut mit entsprechender STDV angegeben, als Negativkontrolle die Stoppmutation 3A.

Zusätzlich ist der Cutoff, der die männliche GF-Kontrollgruppe aus Vorhaut/ Labia minora von AIS-GF unterscheidet angegeben (Hornig et al. 2016).

Die Abbildung 8 zeigt die ApoD-Induktion bei Vorhautproben mit funktionell bisher in der Literatur nicht gesicherten Mutationen im AR nach Behandlung mit unterschiedlichen DHT-Konzentrationen (Werte im Anhang). Eine dieser Mutationen (A137S) wurden bisher in der Literatur noch gar nicht beschrieben. Als Positivkontrolle ist der Durchschnitt der durchgeführten Experimente an Kontrollen aus Vorhautbiopsaten dargestellt, als Negativkontrolle dient eine Stoppmutation, welche sich klinisch als CAIS ausdrückt. Der Cutoff für männliche Vorhautfibroblasten bei einer Inkubation mit 10nM DHT liegt bei 2,36 (Hornig et al. 2016). Bei diesem Experiment erreichten 2 von 4 Zelllinien mit Mutation diesen Cutoff.

A720T zeigt zunächst eine ApoD-Induktion unterhalb der Kontrollen, welche jedoch bis 10nM DHT konzentrationsabhängig ansteigt.

A137S ist eine Mutation in der N-terminalen Domäne, klinisch zeigt sich hier ein PAIS. Im ApoD-Assay zeigt sich passend dazu eine geringe Induktion bei allen verwendeten Konzentrationen (s.o.), wobei eine geringere Konzentrationsabhängigkeit zu sehen ist als bei A720T.

I681N ist eine Substitution in der LBD, im Assay zeigt sich kein Plateau, die ApoD-Induktion liegt bei geringen Konzentrationen unter den Kontrollen erreicht aber bei 100nM den Kontrollwert. Das Genital des Patienten ist uneindeutig.

Eine bereits bekannte Mutation ist Y782D, welche ebenfalls in der LBD liegt. Die GF stammen von einem Patienten mit CAIS. Im ApoD-Assay ist allerdings eine Restaktivität zu messen, was mit einer partiellen Androgenresistenz vereinbar wäre.

3.3 Strukturelle Darstellung der Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors

Mit Hilfe des 3D-Modells des AR entsteht ein Einblick in die räumlichen Strukturen und Beziehungen der LBD zum Liganden. Wichtiger ist aber, dass durch diese Technik einige der untersuchten Mutationen und deren Auswirkungen auf die Struktur des Rezeptors dargestellt werden konnten. Abbildung 9 stellt vier der untersuchten Mutationen in der Kristallstrukturanalyse dar.

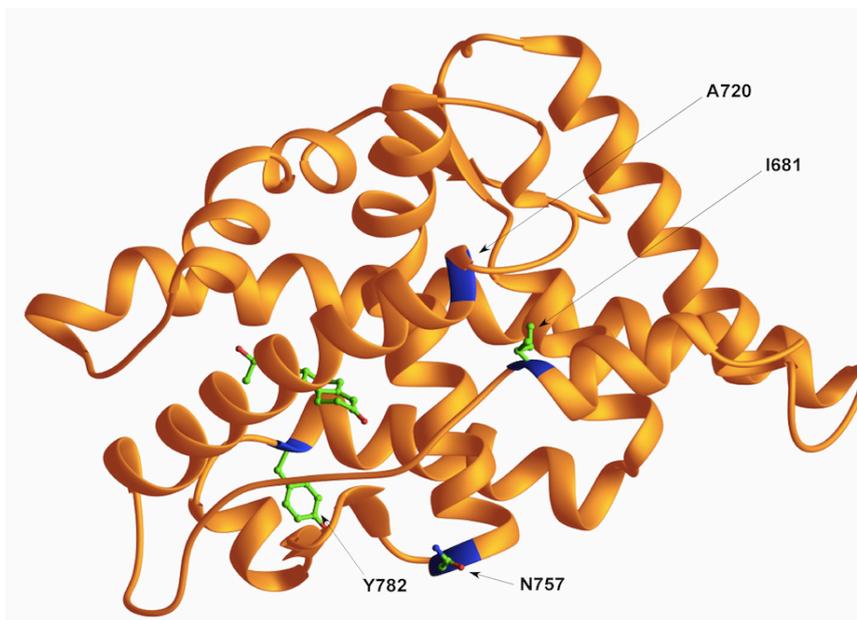


Abb.9: Strukturelle Darstellung der Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors und Lokalisation der untersuchten Mutationen. Die Lokalisation der Mutationen ist blau dargestellt, die Struktur der betroffenen Aminosäuren in grün, der Ligand ist ebenfalls in grün mit rot dargestellt.

Die Mutation I681N befindet sich nicht direkt an der LBD, sie könnte jedoch die Helix der LBD durch die Seitenkette beeinflussen, was allerdings keine erhebliche Funktionseinschränkung zur Folge hat. Die ApoD-Induktion liegt zunächst unterhalb des Cutoffs, bei höheren DHT-Konzentrationen erfolgt ein linearer Anstieg und der Cutoff für Kontrollfibroblasten wird erreicht.

Die Mutation A720T zerstört die LBD nicht, könnte sie aber stören. Das Ergebnis des ApoD-Assays liegt unterhalb der Cutoffs, bei höheren Hormonkonzentrationen wird der Cutoff erreicht, bei weiterem DHT-Anstieg kommt es dann wieder zum Abfall.

Bei der Mutation N757S ist weder die LBD noch die Struktur verändert, jedoch könnte die Dimerisierung verändert sein. Im ApoD-Assay liegt die Induktion oberhalb des Cutoffs, mit einer steigenden DHT-Konzentration ist eine steigende Induktion ohne Plateau zu verzeichnen.

Bei der Mutation Y782D liegt kein direkter Kontakt zur LBD vor, aber der Deckel des Liganden wird beeinflusst. Im Assay liegt in diesem Fall die ApoD-Induktion unter dem Cutoff und ein Konzentrationsanstieg bewirkt keine Änderung, klinisch zeigt sich ein CAIS.

3.4 Androgensensitivität bei 45,X/46,XY gemischter Gonadendysgenese

Der APOD-Assay unterscheidet mit hoher Sensitivität (100%) und Spezifität (97,7%) die AR-Aktivität von männlichen Kontroll GF und AR-Mutationspositiven GF. Bei der funktionellen Abgrenzung zwischen AR-Mutationspositiven GF und GF mit einer Androgenbiosynthesestörung liegt die Spezifität bei gleichbleibender Sensitivität etwas niedriger (93,3%) (Hornig et al. 2016). Dies könnte daran liegen, dass bei einigen Patienten sowohl eine Androgenwirkungs- als auch eine Androgensynthesestörung vorliegt. Das Vorliegen mehrerer unterschiedlicher molekularer DSD-Ursachen in einem einzigen Individuum wurde bereits mehrfach beschrieben (Boehmer et al. 2001, Camats et al. 2018). Es ist aber auch denkbar, dass eine Androgensynthesestörung einen möglichen Einfluss auf die AR Expression hat.

Um einen möglichen Einfluss der klinischen Diagnose auf den ApoD-Assay darzustellen, wurde eine Form der Veränderung der Geschlechtsentwicklung, die 45,X/46,XY-gemischte Gonadendysgenese, welche eine numerische Anomalie der Geschlechtschromosomen bezeichnen, untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind Teil des Papers: „Reduced androgen receptor expression in genital skin fibroblasts from patients with 45,X/46,XY mosaicism“ (Hornig et al. 2019).

Tab.13: Darstellung der Daten zu den Zelllinien mit einer Gonadendysgenese. Biopsieort: S=Skrotum, F=Foreskin, LM=Labia majora, GS=Gonadal skin, P=Penis, CC= Corpus cavernosum. Anteil der XO- bzw. XY-Chromosomen in den Gentialhautfibroblasten (Dr. Hornig und Claudia Becher Institut für Humangenetik CAU Kiel). Apo-D-Induktion: ApoD-SS= 10% (full serum conditions) Kohle-behandeltem FBS, ApoD+SS= 0,1% (serum starved conditions) Kohle-behandeltes FBS. Die kursiven Werte liegen außerhalb des Normalbereiches. AR mRNA (relative Expression normalisiert gegen SDHA) <0,05 liegt unter der SD der Kontrollgruppe (Hornig et al. 2016), Sinnecker Skala: 1 = normal männlich, 2 = überwiegend männlich, 3 = uneindeutig, 4 = überwiegend weiblich, 5 = weiblich

Zelllinie	Biopsieort	Relativer Anteil von XO-Zellen in GF	Relativer Anteil von XY-Zellen in GF	ApoD-Induktion ApoD-SS	ApoD-Induktion ApoD+SS	AR mRNA Level	Sinnecker Skala
GS264	S	0,94	0,06	7,65	6,75	0,10	2
GS126	GS	0,55	0,40	3,28	3,67	0,09	2
GS401	S	0,87	0,13	3,22	2,9	0,07	3
GS159	LM	0,97	0,01	2,67	3,0	0,07	3
GS503	S	0,68	0,25	<i>1,04</i>	<i>2,11</i>	<i>0,04</i>	3
GS504	LM	0,94	0,05	<i>1,03</i>	<i>1,14</i>	<i>0,01</i>	3
GS637	S	0,81	0,15	<i>1,69</i>	2,27	0,01	2
GS582	S	0,52	0,35	2,02	2,74	0,05	-
GS583	S	0,84	0,09	4,92	5,50	0,10	2
GS146	F	0,77	0,17	3,68	2,87	0,12	2
GS554	F	0,90	0,07	<i>1,61</i>	<i>1,82</i>	<i>0,04</i>	3
3N	F	0,1	0,79	<i>1,02</i>	<i>1,51</i>	0,08	3
ARD352	P	0,13	0,84	2,87	4,3	0,08	2

Die Ergebnisse zu den Versuchen an Zelllinien mit gemischter Gonadendysgenese sind in Tabelle 13 dargestellt, dabei wird zunächst nach den unterschiedlichen Biopsieorten unterschieden. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der FISH Analyse angegeben, hierbei ist der Anteil an ausgezählten XO und XY Chromosomen dargestellt. Hier überwiegt bis auf drei untersuchte Zelllinien XO. Des Weiteren wurde die AR-Aktivität in diesen GF bestimmt, indem die DHT-vermittelte Induktion des Zielgens ApoD gemessen wurde. Abbildung 10 zeigt die ApoD-Induktion von 13 Zelllinien mit Gonadendysgenese, dabei liegen 6 von 13 unter dem veröffentlichten Cutoff, der die männliche GF-Kontrollgruppe von AIS-GF mit hoher Sensitivität und Spezifität unterscheidet (Hornig et al. 2016). Darüber hinaus ist die AR mRNA gezeigt. Die letzte Spalte steht für den Phänotyp und gibt die Sinnecker Skala wieder. Tabelle 5 listet alle klinischen Parameter zu den untersuchten GD soweit vorhanden auf.

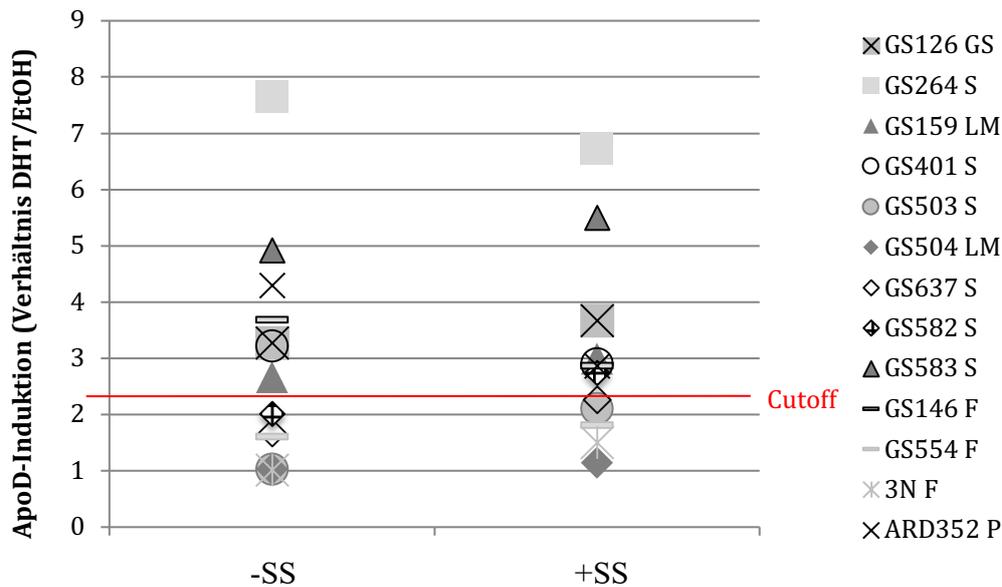


Abb.10: ApoD-Induktion bei Gonadendysgenesien unterschiedlicher Biopsieorte bei einer Konzentration von 10nM DHT und einer Inkubationszeit von 72 Stunden mit 10% (-SS) und mit 0,1% (+SS) Kohle-behandeltem FBS. S=Skrotum, F=Foreskin, LM=Labia majora, GS=Gonadal skin, P=Penis.

Von einem Patienten lagen insgesamt drei Zelllinien vor, vom rechten sowie linken Labioskrotalgewebe im Alter von 1,23 Jahren, sowie vom rechten Skrotalgewebe im Alter von 2,99 Jahren. Bei diesen GF (GS503,504,582) unterschied sich die ApoD-Induktion sowohl hinsichtlich des Ursprungsgewebes (höhere AR-Aktivität im Skrotalgewebe im Vergleich zu Labialgewebe) als auch hinsichtlich des Alters (Tabelle 13).

Da eine reduzierte ApoD-Induktion klassischerweise durch eine Mutation im AR-Gen verursacht wird, wurde die AR-Sequenzierung bei allen GF mit reduzierter AR-Aktivität durchgeführt. Es konnte keine Mutation in der kodierenden Region einschließlich des proximalen AR-Promotors und 5'UTR nachgewiesen werden, wodurch die klassische Androgeninsensitivität bei diesen Patienten ausgeschlossen wurde.

Um herauszufinden, ob der gesehene Funktionsverlust in einigen GF an einer verringerten AR-mRNA Expression liegt, wurde diese mittels qPCR bestimmt. Dabei zeigte sich sowohl bei Labioskrotal- als auch Vorhautzelllinien mit reduzierter AR-Funktion eine AR-mRNA Expression, welche unterhalb der unteren Standardabweichung von männlichen Kontroll-GFs lag. Zusätzlich wurde eine mögliche Assoziation zwischen der AR-mRNA-Expression sowie 45,X/46,XY-Verhältnis untersucht. Dabei konnte keine signifikante Korrelation zwischen diesen Parametern bei Betrachtung aller Daten gefunden werden (Abb.11a), jedoch bei Betrachtung nur der GF mit reduzierter AR-mRNA (Abb.11b).

Bei der Korrelation des 45,X/46,XY-Verhältnisses mit der AR-Aktivität konnte keine signifikante Korrelation sowohl bei Betrachtung des gesamten Datensatzes als auch bei den GF mit reduzierter AR-Expression festgestellt werden. Schließlich sollte noch ein möglicher Zusammenhang zwischen der AR-mRNA-Expression oder -Aktivität und dem genitalen Phänotyp bei den 12 Patienten untersucht werden. Dies ergab eine signifikant höhere AR-Aktivität in GF von Patienten mit dem externen Virilisierungswert Sinnecker 2 im Vergleich zu Sinnecker 3 (Abb.12a) (Sinnecker et al. 1997). Eine Korrelation zwischen AR mRNA Expression und Sinnecker Skala zeigte sich nicht (Abb.12b).

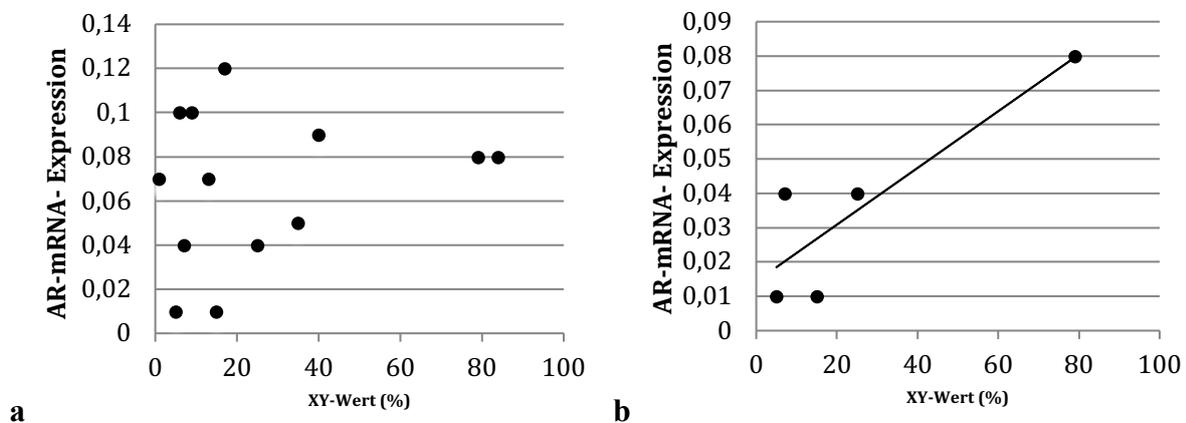


Abb.11: Streudiagramme der AR-mRNA-Expression und des Prozentsatzes von XY-Zellen in 45,X/46,XY-GF

a.) Korrelation der AR-mRNA-Expression und des 45,X/46,XY-Verhältnisses in allen Zellen ($p=0,5285$, $R^2=0,03708$).

b.) Korrelation der AR-mRNA-Expression und des 45,X/46,XY-Verhältnisses in Zellen mit verminderter AR-Aktivität ($p=0,0514$, $R^2=0,7675$).

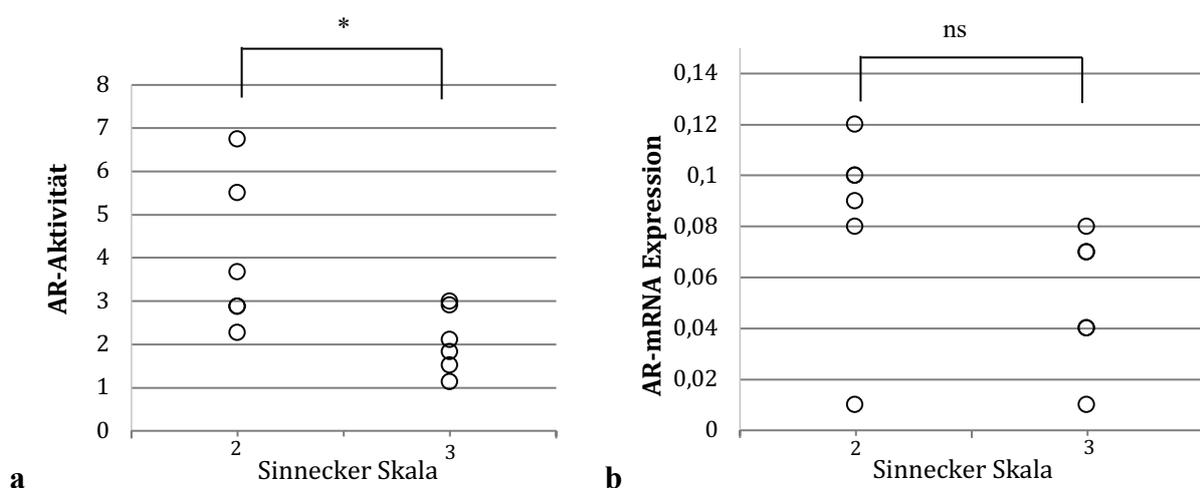


Abb.12: AR-mRNA-Expression und -Aktivität (ApoD-Assay) unterteilt nach externem Virilisierungsgrad nach Sinnecker.

a.) AR-Aktivität ($p=0,0199$, *= signifikant)

b.) AR-mRNA-Expression (ns= nicht signifikant) (Hornig et al. 2019).

4. Diskussion

Diese Arbeit hat sich mit unterschiedlichen Einflussfaktoren auf die transkriptionsaktivierende Funktion des Androgenrezeptors beschäftigt, dazu wurde der Apolipoprotein D-Assay verwendet. Das Apolipoprotein D wurde durch Appari et al. 2009 als stark androgenreguliertes Gen in kultivierten Genitalhautfibroblasten des Skrotums identifiziert. Außerdem hat man entdeckt, dass in PAIS und CAIS Zellen die ApoD-Induktion reduziert ist, oder komplett fehlt (Appari et al. 2009). Als Messmethode diente die qRT-PCR. Der ApoD-Assay wurde etabliert um die Aktivität des AR bei AIS zu messen, auch bei Abwesenheit einer Mutation. Dadurch kann funktionell die Diagnose „Androgenresistenz“ gestellt werden (AIS Typ) (Hornig et al. 2016). Der Assay wurde ursprünglich so durchgeführt, dass nach einer Inkubationszeit von insgesamt 18 Tagen mit einer DHT Konzentration von 10nM DHT die ApoD-Induktion gemessen wurde. Die Behandlung der Zellen mit DHT erfolgte nach einem aufwendigen Schema, das Hormon musste nach 24 Stunden (Tag 2) und dann alle 48 Stunden, insgesamt sechsmal, hinzugefügt werden. Mittlerweile ist die Inkubationszeit auf 72 Stunden modifiziert worden (Hornig et al. 2016).

Eine Frage, die in dieser Arbeit geklärt werden sollte, war, welchen Einfluss die Inkubationszeit hat und ob diese zur Vereinfachung des ganzen Protokolls eventuell noch weiter verkürzt werden kann. Dazu wurde die ApoD-Induktion nach 48 und 72 Stunden verglichen. Es stellt sich heraus, dass es in den meisten Fällen noch zu einem Anstieg der ApoD-Expression von 48 auf 72 Stunden kam, weshalb letztere Inkubationszeit beibehalten wurde. Ob ein weiterer Anstieg nach 96 zu messen ist und wann ein Plateau erreicht wird müssen zukünftige Experimente zeigen. Nach einer zu langen Inkubationszeit kann man allerdings nicht mehr so gut zwischen direkten und indirekten Effekten auf die Induktion unterscheiden. Dabei sind direkte Effekte solche, die über eine direkte Bindung des AR an den ApoD-Promotor ausgelöst werden, wohin gegen indirekte Effekte über andere Proteine als Zwischenschritte gehen.

Ursprünglich wurden die Experimente zum AR an CHO- (Chinese Hamster Ovary) und HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) durchgeführt, welches die Frage aufbrachte, in wieweit diese Ergebnisse auf menschliche Zellen übertragen werden können. Mittlerweile wird der ApoD-Assay an Skrotum und Labia majora Genitalhautfibroblasten durchgeführt (Hornig et al. 2016). Appari et al. gelang es zunächst nicht, eine reproduzierbare Induktion an Vorhautfibroblasten zu zeigen (Appari et al. 2009). Dies wurde zunächst durch den unterschiedlichen embryonalen Ursprung erklärt. Mittlerweile

konnten Cutoffs für Kontrollen publiziert wurden, an denen die Ergebnisse dieser Arbeit beteiligt waren (Hornig et al. 2016). Es sind jedoch Unterschiede, je nach anatomischem Ursprung der untersuchten Fibroblastenzellen zu verzeichnen. Dabei zeigen die Fibroblasten aus skrotalem Ursprung schon bei niedrigeren Ligandenkonzentrationen (10nM) ein Plateau der ApoD-Induktion im Vergleich zu den Fibroblasten aus Vorhautgewebe, bei denen auch noch bei 100nM DHT ein Anstieg der ApoD-Induktion zu verzeichnen ist. In vorangegangenen Arbeiten wurden schon verschiedene Liganden getestet, um Veränderungen der Aktivierungsprofile androgenregulierter Reportergene zu detektieren und um AR-Mutationen funktionell zu untersuchen (Holterhus et al. 2002).

In dieser Arbeit wurde der natürliche Ligand DHT in unterschiedlichen Konzentrationen im androgenen Zielgewebe verwendet, um Mutationen zu testen, deren funktionelle Relevanz nicht eindeutig ist. Die Frage war, ob sich ein mutationsspezifisches Aktivierungsprofil, welches konzentrationsabhängig ist, messen lässt. Es wurden insgesamt 10 Mutationen des AR dargestellt, von denen zwei bisher noch nicht in der Datenbank für Androgenrezeptormutationen (androgendb.mcgill.ca) beschrieben wurden (A137S, A720T) und vier, welche zwar publiziert, aber nicht funktionell charakterisiert wurden (I842S (Hiort et al. 1996), N757S (Hellmann et al. 2012), I681 (Audi et al. 2010), Y782D (Audi et al. 2010)). Mutationen des AR-Gens können je nach Lokalisation zu Störungen auf unterschiedlichen Ebenen, wie DNA-Bindung, Androgenbindung oder Transaktivierung führen. Dabei sind Punktmutationen am häufigsten, meist führen diese zu einem Aminosäureaustausch, seltener sind Spleißfehler oder Non-sense-Mutationen (Hiort et al. 1999). Als Folge kann sowohl ein kompletter als auch ein partieller Funktionsverlust entstehen. Bei Missense-Mutationen wurde bereits das gesamte Spektrum der klinischen Ausprägung eines AIS beobachtet. Die Phänotyp-Genotyp-Korrelation ist dementsprechend gering, trotz gleicher Mutation kann der Phänotyp sogar innerhalb einer Familie deutlich variieren (Evans et al. 1997, Holterhus et al. 2000, Rodien et al. 1996). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens stellen Kofaktoren dar, die die Androgenfunktion modellieren. Diese wurden vor allem in Prostatakrebszellen beschrieben (Röpke et al. 2004), aber noch nicht in gesunden männlichen Genitalhautfibroblasten.

Es konnten mutationsabhängig unterschiedliche AR-Funktionalitäten nachgewiesen werden. Zunehmende Ligandenkonzentrationen führten dabei zu einem Anstieg der Aktivierung, dies erfolgte jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Durch die Kristallstrukturanalyse konnte ein Einblick in die räumlichen Strukturen und Beziehungen der LBD zum Liganden gewonnen

werden und dadurch einige Aktivierungsmuster, der Mutationen, die sich in der LBD befinden, erklärt werden.

4.1 Mutationen

Die Mutation I842S ist eine Punktmutation im Exon sieben an der Codon-Position 842 und daraus resultierender Substitution der Aminosäure Isoleucin durch Serin. Die Umgebung von Codon 842 ist wichtig für die Ligandenbindung und die Aktivierung der Transkription. Diese Mutation wurde durch Hiort et al. (1996) beschrieben, jedoch nicht funktionell charakterisiert. Klinisch wurde diese Mutation als PAIS beschrieben und zeigte einen weiblichen Phänotyp mit uneindeutigem Genital (Hiort et al. 1996).

Der hier untersuchte Patient zeigte aber eine isolierte Infertilität mit ansonsten unauffälligem männlichen Genital und wurde daher als MAIS bezeichnet.

Im durchgeführten ApoD Assay konnte keine Induktion erreicht werden, auch eine AR mRNA war nicht zu messen, nach dem Assay wäre die Mutation also eher einem CAIS zuzuordnen und passt nicht zum angegebenen Phänotyp des Patienten. Der ApoD-Assay reflektiert daher nicht die milde MAIS Form.

Die Punktmutation N757S im Exon 5 bewirkt die Substitution der Aminosäure Asparagin durch Serin. Bisher sind insgesamt 4 Fälle mit dieser Mutation, die sich in der LBD befindet, publiziert (Hiort et al. 1996, Giwercman et al. 2001, Hellmann et al. 2012), auch diese Mutation wurde bisher nicht mit einem Transaktivierungsassay funktionell charakterisiert. Die Patienten sind als männlich beschrieben und der Phänotyp dreimal als PAIS und einmal als MAIS. Giwercman et al. (2001) beschreibt eine isolierte Infertilität, während Hellmann et al. (2012) bei dieser Mutation eine Gynäkomastie beobachtet hat. Da Testosteron bei einer Androgenresistenz nicht wirken kann, wird es vermehrt in Östrogen umgewandelt, wodurch es zur Gynäkomastie kommt. Bei dem hier untersuchten Patienten liegt ein PAIS vor, in der ApoD-Induktion zeigt sich ein Anstieg mit steigender DHT-Konzentration ohne Plateau. Der Cutoff wird ab einer Konzentration von 1nM DHT erreicht. Die Mutation scheint ein überdurchschnittliches Ansprechen auf das Hormon zu bewirken. Die Daten des ApoD-Assays stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Giwercman et al. (2001) der im Hormonbindungsassay eine reduzierte Affinität für Androgene und somit einen Funktionsverlust in vitro beschreibt. Dies ließe sich durch unterschiedliche Zielgene im in vitro Zellsystem mit artifiziellm AR-Promotor im Unterschied zum endogenen ApoD-Promotor erklären. Auch in der Kristallstruktur zeigt sich, dass die Mutation keinen Einfluss auf die LBD hat. Die Dimerisierung könnte jedoch durch die Mutation verbessert werden

(gain of function mutation). Man geht davon aus, dass die Dimerisierung der AR-LBD auf die Besetzung der Ligandenbindungstasche folgt. Wie die Stabilisierung des Dimers die Transaktivierung verbessert, ist derzeit unklar. Möglicherweise beeinflusst es eine oder mehrere nachgelagerte AR-Funktionen (Nadal et al. 2016). Der ApoD-Assay kann aber den klinischen Phänotyp nicht erklären. Ob eine überdurchschnittlich hohe Aktivierung von ApoD auch einen negativen Effekt auf die Androgenwirkung hat ist ungeklärt. Es wäre anzunehmen, dass der Phänotyp durch eine Veränderung in einem anderen Gen verursacht wird.

Die Mutation A646D liegt im Exon 4 in der LBD und wurde bereits siebenmal beschrieben. Es erfolgt eine Substitution der Aminosäure Alanin durch Asparaginsäure. Diese Mutation geht mit einem sehr variablen Phänotyp einher (normal, MAIS, PAIS, CAIS) (Hiort et al. 1996, Nordenskjöld et al. 1998, MacLean et al. 2004, Ferlin et al. 2006, Werner et al. 2006, Hughes et al. 2012). Die Mutation wurde mit einem Transaktivierungsassay an CHO-Zellen (Chinese hamster ovary) bereits funktionell charakterisiert (Werner et al. 2006). Auch die beiden hier getesteten Zelllinien mit der gleichen Mutation zeigen im Assay eine unterschiedliche ApoD-Induktion. 12F432 liegt unter dem Cutoff, auch bei höheren Hormonkonzentrationen wird keine höhere Induktion erreicht. C1534 liegt ab einer Konzentration von 1nM DHT bereits über dem Cutoff und erreicht eine ApoD-Induktion, die vergleichbar mit den Kontrollen ist. Die Mutation alleine reicht also nicht aus um den Phänotyp zu erklären, dazu muss es noch weitere Faktoren geben, welche eine Rolle spielen, zum Beispiel das Alter oder die AR-Expression. Werner et al. (2006) vermutet, dass diese Variationen durch einen Polymorphismus oder variable hinge Region zustande kommen und beschreibt einen Zusammenhang mit einer Varianz in der N-terminalen Domäne. Dabei führt die Mutation in Kombination mit einem short PolyG und long PolyQ Repeat zu einer verminderten Transaktivierungskapazität, während sie bei einem short PolyG (Normalbereich 9-36) und normalem PolyQ (Normalbereich 10-27) zu einer höheren Aktivierung führt. Da diese Länge einen Einfluss auf die Mutation haben könnte, wurde diese in beiden GF bestimmt. Es zeigte sich bei C1534 eine PolyQ-Länge von 29, welche im oberen Normalbereich liegt und ein PolyG von 10, was als subnormal gewertet werden kann. Bei 12F432 ergab sich ein PolyQ von 26 und PolyG von 10, was ebenfalls im angegebenen Bereich liegt. Da beide GF einen PolyQ im oberen Bereich und einen PolyG im unteren Normalbereich aufweisen, ist auch diese Veränderung wahrscheinlich nicht ursächlich für das unterschiedliche Ansprechen auf DHT. Werner et al. beschreibt bei einer PolyG-Länge von 10 und einem PolyQ von 30 in Kombination mit der Mutation A646D eine Verringerung der AR-Aktivität um 50%, im Vergleich zum Wildtyp (Q20G25). Lundin et al. (2006) führte ein

Screening auf diese Mutation durch um zu zeigen, dass es sich dagegen um einen normalen Polymorphismus handeln könnte.

L272F ist eine erstmals 2006 durch Ferlin et al. beschriebene Punktmutation in der N-terminalen Domäne, dabei kommt es zum Austausch von Leucin durch Phenylalanin im Exon 1. Diese Mutation wurde in einem Transaktivierungsassay an COS-1-Zellen (American Type Culture Collection) funktionell charakterisiert, zeigte aber keine signifikante Reduktion in der DHT-Antwort im Vergleich zum Wildtyp (Tadokoro-Cuccaro et al. 2014). Die Mutation führt zu einem MAIS mit männlicher Infertilität. Bei dem hier untersuchten Patienten liegt ein PAIS mit weiblichem Phänotyp vor. Dennoch wird in den GF des Patienten bei Konzentrationen ab 1nM DHT eine ApoD-Induktion über dem Cutoff erreicht (3,36fache Induktion), die mit Konzentrationserhöhung relativ konstant bleibt. Auch hier scheint die Mutation keine Auswirkung auf die AR-Aktivität im ApoD-Assay zu haben. So muss der weibliche Phänotyp des Patienten durch zusätzliche Veränderungen verursacht sein.

Die Mutation A720T ist eine bisher nicht in der Datenbank für Androgenrezeptormutationen beschriebene Mutation, dabei kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Alanin durch Threonin in Exon 4 in der LBD. Diese Mutation wird jedoch im Zusammenhang mit Prostata-Karzinom beschrieben (Heinlein et Chang 2004). Klinisch präsentiert sich die Mutation mit einem PAIS. Im Assay zeigt sich zunächst eine steigende ApoD-Induktion mit steigender DHT Konzentration, welcher aber deutlich unter dem Anstieg der Kontroll-GF liegt und nur bei einer Konzentration von 10nM knapp über dem Cutoff liegt und bei 100nM DHT wieder abfällt. Die Mutation scheint die Ligandenbindung zu vermindern, aber nicht komplett zu stören, was mit der klinischen Diagnose eines PAIS vereinbar wäre. Auch in der Kristallstrukturanalyse lässt sich eine Störung der LDB durch diese neue Mutation sehen.

Auch die Mutation A137S ist in der Datenbank bisher noch nicht verzeichnet. Hier handelt es sich um eine Mutation in der N-terminalen Transaktivations-Domäne, im Exon 1 an der Codon Position 137. Klinisch präsentiert sich der Patient mit einem PAIS, welches sich durch den geringen, unter dem Cutoff liegenden, Anstieg in der ApoD-Induktion bestätigen lässt. Da keine Kristallstruktur der NTD vorliegt, können keine strukturellen Aussagen gemacht werden.

Die Mutation I681N ist eine Substitution in Exon 4, die durch Audi et al. (2010) beschrieben wurde, aber bisher nicht funktionell charakterisiert wurde. Die Mutation zeigt sich als PAIS mit weiblichem Phänotyp und uneindeutigem Genital und wurde in einer Großfamilie mit mehreren PAIS Patienten beschrieben. Betroffen waren neben dem Indexpatienten eine Schwester, eine Cousine und zwei Großtanten, außerdem zeigten sich noch heterozygote

Träger in der Familie. Die ApoD-Induktion steigt mit steigender DHT Konzentration linear an, ohne Plateau. In der Kristallstrukturanalyse zeigte sich, dass sich die Mutation nicht direkt an der LBD befindet und keine dramatische Einwirkung hat.

Y782D ist eine Mutation im Exon sechs an der Codon-Position 782, in der LBD kommt es zur Substitution der Aminosäure Tyrosin durch Asparaginsäure. Und daraus folgendem CAIS mit weiblichem Phänotyp. Die Mutation wurde durch Audi et al. (2010) beschrieben, aber nicht funktionell charakterisiert, neben dem Indexpatienten sind die Mutter, sowie die Schwester heterozygote Träger. Die untersuchte Mutation zeigt jedoch eine ApoD-Induktion bei allen verwendeten DHT-Konzentrationen die knapp unterhalb des Cutoffs liegt und damit funktionell für einen PAIS spricht. Es ist anzunehmen, dass noch weitere andere Faktoren für den Phänotyp verantwortlich sind. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Patient sowohl einen Defekt in der DHT Synthese, wie auch in der Androgenwirkung hat, ein zusätzlicher 5 α -Reduktase Mangel könnte außerdem den CAIS Phänotyp erklären (Audi et al. 2010, Hornig et al. 2016). Da das freie Testosteron somit nicht in DHT umgewandelt werden kann und die Aktivierung des AR ausbleibt. Die Mutation wurde bisher nicht in Individuen mit PAIS beschrieben. Die Kristallstrukturanalyse zeigt, dass kein direkter Kontakt zur LBD vorliegt, aber der Deckel des Liganden, welcher sich normalerweise über die Ligandenbindungstasche legt, beeinflusst wird, dies könnte den fehlenden Induktionsanstieg bei DHT Erhöhung erklären.

Die im Assay erhobenen Erkenntnisse zur Funktionalität des Androgenrezeptors können als Ausgangspunkt für die Erforschung des in vivo ablaufenden Transaktivierungsprozesses bei Mutationen dienen. Bei vielen Patienten mit AIS ist jedoch keine Mutation im AR Gen nachweisbar. Nur bei etwa 90% der Patienten mit CAIS und weniger als 40% mit PAIS kann eine Mutation im AR Gen gefunden werden (Mongan et al. 2015). Genmethylierung oder Chromatinstrukturmodifikation durch Histionmodifikation spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Zell- und Gewebsdifferenzierung (Appari et al. 2009), was auch für AIS gelten könnte (Hornig et al. 2018)

Weitere Faktoren, die bei der ApoD-Induktion eine Rolle spielen können, ist die Anzahl der Passagen die verwendet werden, allerdings konnte ein Einfluss auf die ApoD-Induktion in Experimenten mit unterschiedlichen Passagen nicht bestätigt werden (Hornig et al. 2016). Aufgrund einer zu geringen Anzahl an Kontroll-GF unterschiedlicher Altersgruppen, konnte eine Korrelation zum Alter bisher nicht untersucht werden. Ein weiterer Punkt, der bereits untersucht wurde sind frische und gefrorene Genitalhautfibroblasten, hierbei konnte kein

signifikanter Unterschied festgestellt werden (interne, unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe um Prof. Holterhus und Dr. Hornig).

4.2 45,X/46,XY gemischte Gonadendysgenese

Die gemischte Gonadendysgenese wurde erstmal 1963 durch Sohval, als dysgenetischer oder nicht vorhandener Hoden auf der einen Seite und sogenannte Streak-Gonaden (bindegewebige Stränge) auf der anderen Seite beschrieben (Nonomura et al. 1991). Sie stellt eine Form der DSD dar, die durch den chromosomalen Mosaik 45,X/46,XY charakterisiert ist.

Da das Ausmaß des Mosaiks in vorangegangenen Studien (Nonomura et al. 1991, Lindhardt Johansen et al. 2012) die phänotypische Variabilität nicht erklärt, wurden die Kulturen auf die Funktion des AR mittels ApoD-Assay untersucht.

Es zeigte sich bei 6 von 13 Fällen eine erniedrigte ApoD-Induktion. In 4 von diesen 6 Fällen zeigte sich eine erniedrigte AR-Expression, was darauf deutet, dass dies die Ursache der verminderten ApoD-Aktivität sein könnte. Eine signifikante Korrelation zwischen der AR-Expression und dem genitalen Phänotyp oder dem Grad des 45,X/46,XY-Mosaiks konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Eine Einschränkung war die relativ geringe Anzahl von Proben sowie die Heterogenität der analysierten Proben hinsichtlich der Gonadenfunktion und damit der Exposition gegenüber Androgenen. Bei alleiniger Betrachtung der Proben mit reduzierter AR-Funktion und AR-Expression, konnte jedoch eine signifikante Korrelation zwischen der AR-mRNA-Expression und dem 45,X/46,XY-Verhältnis festgestellt werden. Diese Korrelation konnte nicht für die AR-Aktivität nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass weitere Faktoren die AR-Aktivität beeinflussen. Insbesondere der Patient 3N hatte eine zu niedrige AR-Aktivität für seine Expression, was darauf hindeutet, dass bei diesem Patienten die AR-mRNA-Expression allein nicht ausreicht, um den Phänotyp zu erklären. Eine positive Korrelation zwischen AR-Expression, AR-Aktivität, XY-enthaltenden Zellen und externem Phänotyp wurde bei dem Patienten GS503/504/582 beobachtet. Außerdem konnte eine positive Korrelation zwischen dem Grad der externen Maskulinisierung und der AR-Aktivität erkannt werden, was auf eine höhere AR-Aktivität in GF hindeutet, die aus stärker virilisierten Genitalien stammt.

Frühere Studien konnten bereits Korrelationen zwischen der 45,X/46,XY-Verhältnis und dem klinischen Phänotyp bei einem einzelnen Patienten feststellen (Hatano et al. 2018), dies konnte allerdings nicht in größeren Kohortenstudien bestätigt werden. Mögliche Gründe dafür sind: 1.) Das im Blut gemessene Mosaik stimmt nicht unbedingt mit dem Mosaik des

Zielgewebes überein. 2.) Das 45,X/46,XY-Mosaik ist eine sehr heterogene Gruppe mit großen Unterschieden in der Geschlechtsentwicklung (Hornig et al. 2019).

Es fehlen jedoch Daten zur Sequenzierung des Exoms bei größeren Kohorten von Patienten mit 45,X/46,XY-Mosaik, die ursächliche Genmutationen aufdecken könnten, die zu unterschiedlichen Phänotypen führen. Es wäre interessant zu sehen, wie viele Patienten mit 45,X/46,XY-Mosaik Mutationen in Genen tragen, die an der Gonadenentwicklung beteiligt sind, oder ob das Mosaik an sich die Gonadenfunktion und den Genitaltypus beeinflussen kann (Hornig et al. 2019).

Alles in allem gesehen kann man sagen, dass ein besseres Verständnis der Androgenrezeptorfunktion und damit der Androgensensitivität zu einem besseren Verständnis der phänotypischen Variabilität bei DSD führt und daher in Zukunft zu Informationen führen könnte, die Entscheidungsprozesse bei der klinischen Betreuung von Patienten mit DSD beeinflussen könnten.

5. Zusammenfassung

Apolipoprotein D (ApoD) wurde bereits zuvor an kultivierten Genitalhautfibroblasten als androgenreguliertes Gen und potentieller Biomarker der Androgenwirkung nachgewiesen. Der ApoD-Assay stellt ein Verfahren zur Untersuchung der Androgenrezeptorfunktion dar und dient wissenschaftlich der Diagnostik einer Androgenresistenz (AIS).

Ziel dieser Doktorarbeit war es diesen Assay auf klinische, hormonelle sowie genetische Einflussfaktoren hin zu untersuchen.

Zunächst sollte eine mögliche Optimierung des ApoD-Assays geklärt werden, dazu wurde die Hormoninkubationszeit (48h, 72h) untersucht. Dabei zeigt sich bei einer Inkubationszeit von 72 Stunden eine höhere Induktion. Alle weiteren Experimente wurden dann mit einer Inkubationszeit von 72 Stunden durchgeführt.

Daraufhin wurden die Ligandenkonzentrationen, sowie der Unterschied zwischen Skrotalhaut und Vorhautfibroblasten näher betrachtet. Zur Rezeptoraktivierung wurde Dihydrotestosteron in aufsteigender Konzentration verwendet. Hierbei zeigten sich in Abhängigkeit vom Ursprung der Zellkulturen unterschiedliche Induktionen. Bei Fibroblasten skrotalen Gewebes konnte bereits bei niedrigeren Konzentrationen (10nM) ein Plateau verzeichnet werden, während es bei Fibroblasten aus Vorhautgewebe auch noch bei 100nM DHT zu einem Anstieg der ApoD-Induktion kam.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit 10 verschiedene Mutationen des Androgenrezeptors im Hinblick auf ihre Funktionalität und im Vergleich zu Kontrollen charakterisiert. Davon sind 2/10 bisher nicht publiziert worden (in der Datenbank für Androgenrezeptormutationen). 4/10 wurden zwar publiziert, die Auswirkung auf die Genaktivierung wurde aber nicht untersucht.

Fünf der Mutationen befinden sich in der LBD des Rezeptors (I842S, N757S, A720T, I681N, Y782D). Die PAIS-Mutationen L272F und A137S befinden sich in der N-terminalen Domäne (NTD) des Androgenrezeptors. Außerdem wurden zwei Stoppmutationen und eine bisher in der Literatur noch gar nicht beschriebene Mutationen (A137S) untersucht.

In den durchgeführten Versuchen zeigten sich große Unterschiede im Verhalten der verschiedenen AR-Mutanten. Hierbei konnten mutationsspezifische Aktivierungsprofile nachgewiesen werden. Zunehmende Ligandenkonzentrationen führten dabei zu einem Anstieg der Aktivierung, dies erfolgte jedoch in unterschiedlichem Ausmaß.

Die wichtigsten Befunde sind, dass die Mutation alleine oft nicht ausreicht um den Phänotyp zu erklären. Neben der ApoD-Induktion, liefert das 3D-Modell der Ligandenbindungsdomäne Aufschluss über den Einfluss der Mutation auf die Aktivität des Androgenrezeptors.

Einen weiteren Punkt der Arbeit stellt die funktionelle Charakterisierung der Androgenrezeptorfunktion bei gemischten Gonadendysgenesien 45,X/46,XY, welche eine numerische Anomalie der Geschlechtschromosomen bezeichnen, dar. Diese wurde untersucht, um einen möglichen Einfluss der Androgenrezeptoraktivität auf die klinische Ausprägung zu zeigen. Von einem Patienten lagen insgesamt drei Zelllinien vor, interessant war hierbei die unterschiedliche ApoD-Induktion, sowohl hinsichtlich des Ursprungsgewebes, als auch des Alters. Außerdem konnte eine signifikante Korrelation zwischen der AR-mRNA-Expression und dem 45,X/46,XY-Verhältnis bei Betrachtung der Genitalhautfibroblasten mit reduzierter AR-mRNA gefunden werden. Diese Korrelation konnte nicht für die AR-Aktivität nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass weitere Faktoren die AR-Aktivität beeinflussen. Jedoch konnte eine Korrelation zwischen der AR-Aktivität und dem genitalen Virilisierungsgrad gemessen werden. Das bedeutet, dass die Androgenrezeptoraktivität ein individueller Einflussfaktor auf den Phänotyp der gemischten Gonadendysgenese ist.

Das mögliche Nebeneinanderwirken von Faktoren, die den Grad der Virilisierung modifizieren, stellt einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige Forschungen dar. Im Hinblick auf den einzelnen Patienten sind auch in Zukunft eine fundierte klinische Diagnostik und funktionelle Studien nötig. Dabei muss jeder Fall von Störungen der Geschlechtsentwicklung individuell betrachtet werden.

6. Literaturverzeichnis

Ahmed, S.F., Bashamboo, A., Lucas-Herald, A., McElreavey, K. (2013): Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. *British Medical Bulletin*. 106: 67-89

Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., Rowan, B.G. (2012): Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nuclear Receptor Signaling*. 10: e001

Appari, M., Werner, R., Wünsch, L., Cario, G., Demeter, J., Hiort, O., Riepe, F., Brooks, J.D., Holterhus, P.M. (2009): Apolipoprotein D (APOD) is a putative biomarker of androgen receptor function in androgen insensitivity syndrome. *The Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*. 87(6): 623-632

Asangani, I.A., Dommeti, V.L., Wang, X., Malik, R., Cieslik, M., Yang, R., Escara-Wilke, J., Wilder-Romans, K., Dhanireddy, S., Engelke, C., Iyer, M.K., Jing, X., Wu, Y.M., Cao, X., Qin, Z.S., Wang, S., Feng, F.Y., Chinnaiyan, A.M. (2014): Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 510(7504): 278-282

Audi, L., Fernández-Cancio, M., Carrascosa, A., Andaluz, P., Torán, N., Piró, C., Vilaró, E., Vicens-Calvet, E., Gussinyé, M., Albisu, M.A., Yeste, D., Clemente, M., Hernández de la Calle, I., Del Campo, M., Vendrell, T., Blanco, A., Martínez-Mora, J., Granada, M.L., Salinas, I., Forn, J., Calaf, J., Angerri, O., Martínez-Sopena, M.J., Del Valle, J., García, E., Gracia-Bouthelier, R., Lapunzina, P., Mayayo, E., Labarta, J.I., Lledó, G., Sánchez Del Pozo, J., Arroyo, J., Pérez-Aytes, A., Beneyto, M., Segura, A., Borrás, V., Gabau, E., Caimarí, M., Rodríguez, A., Martínez-Aedo, M.J., Carrera, M., Castaño, L., Andrade, M., Bermúdez de la Vega, J.A.; Grupo de Apoyo al Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos (GrApSIA) (2010): Novel (60%) and recurrent (40%) androgen receptor gene mutations in a series of 59 patients with a 46,XY disorder of sex development. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 95(4): 1876-1888

Boehmer, A.L., Brinkmann, O., Brüggewirth, H., van Assendelft, C., Otten, B.J., Verleun-Mooijman, M.C., Niermeijer, M.F., Brunner, H.G., Rouwé, C.W., Waelkens, J.J., Oostdijk, W., Kleijer, W.J., van der Kwast, T.H., de Vroede, M.A., Drop, S.L. (2001): Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86(9): 4151-4160

Boehmer, A.L., Brinkmann, A.O., Nijman, R.M., Verleun-Mooijman, M.C., de Ruiter, P., Niermeijer, M.F., Drop, S.L. (2001): Phenotypic variation in a family with partial androgen insensitivity syndrome explained by differences in 5 α dihydrotestosterone availability. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86(3): 1240-1246

Brinkmann, A.O., Faber, P.W., van Rooij, H.C., Kuiper, G.G., Ris, C., Klaassen, P., van der Korput, J.A., Voorhorst, M.M., van Laar, J.H., Mulder, E. (1989): The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *The Journal of Steroid Biochemistry*. 34(1-6): 307-310

Camats, N., Fernández-Cancio, M., Audi, L., Schaller, A., Flück, C.E. (2018): Broad phenotypes in heterozygous NR5A1 46,XY patients with a disorder of sex development: an oligogenic origin? *European Journal of Human Genetics*. 26(9): 1329-1338

Carson, M. (1997): Ribbons. *Methods in Enzymology*. 277: 493-505

Cools, M., Pleskacova, J., Stoop, H., Hoebeke, P., Van Laecke, E., Drop, S.L., Lebl, J., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H., Wolffenbuttel, K.P.; Mosaicism Collaborative Group. (2011): Gonadal pathology and tumor risk in relation to clinical characteristics in patients with 45,X/46,XY mosaicism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 96(7): E1171-1180

Decker, K.F, Zheng, D., He, Y., Bowman, T., Edwards, J.R., Jia, L. (2012): Persistent androgen receptor-mediated transcription in castration resistant prostate cancer under androgen-deprived conditions. *Nucleic Acids Research*. 40(21): 10765-10779

Do Carmo, S., Levros, L.C. Jr., Rassart, E. (2007): Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 1773(6): 954-969

Eisermann, K., Wang, D., Jing, Y., Pascal, L.E., Wang, Z. (2013): Androgen receptor gene mutation, rearrangement, polymorphism. *Translational Andrology and Urology*. 2(3): 137-147

Elfferich, P., van Royen, M.E., van de Wijngaart, D.J., Trapman, J., Drop, S.L., van den Akker, E.L., Lusher, S.J., Bosch, R., Bunch, T., Hughes, I.A., Houtsmuller, A.B., Cools, M., Faradz, S.M., Bisschop, P.H., Bunck, M.C., Oostdijk, W., Brüggewirth, H.T., Brinkmann, A.O. (2013): Variable loss of functional activities of androgen receptor mutants in patients with androgen insensitivity syndrome. *Sexual Development*. 7(5): 223-234

Evans, B.A., Hughes, I.A., Bevan, C.L., Patterson, M.N., Gregory, J.W. (1997): Phenotypic diversity in siblings with partial androgen insensitivity syndrome. *Archives of Disease in Childhood*. 76(6): 529-531

Ferlin, A., Vinanzi, C., Garolla, A., Selice, R., Zuccarello, D., Cazzadore, C., Foresta, C. (2006): Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 65(5): 606-610

German, J. (1995): Where phenotype does not match genotype. *Human Mutation*. 6(1): 7-8

Giwerzman, Y.L., Nikoshkov, A., Byström, B., Pousette, A., Arver, S., Wedell, A. (2001): A novel mutation (N233K) in the transactivating domain and the N756S mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor gene are associated with male infertility. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 54(6): 827-834

Gottlieb, B., Beitel, L.K., Nadarajah, A., Paliouras, M., Trifiro, M. (2012): The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Human Mutation*. 33(5): 887-894

Hatano, M., Fukuzawa, R., Hasegawa, Y. (2018): The mosaicism ratio of 45,X may explain the phenotype in a case of mixed gonadal dysgenesis. *Sexual Development*. 12(4): 175-179

Heinlein, C.A., Chang, C. (2004): Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews*. 25(2): 276-308.

Hellmann, P., Christiansen, P., Johannsen, T.H., Main, K.M., Duno, M., Juul, A. (2012): Male patients with partial androgen insensitivity syndrome: a longitudinal follow-up of growth, reproductive hormones and the development of gynaecomastia. *Archives of Disease in Childhood*. 97(5): 403-409

Hiort, O., Birnbaum, W., Marshall, L., Wünsch, L., Werner, R., Schröder, T., Döhnert, U., Holterhus, P.M. (2014): Management of disorders of sex development. *Nature Reviews Endocrinology*. 10(9): 520-529

Hiort, O., Holterhus, P.M., Hörter, T., Schulze, W., Kremke, B., Bals-Pratsch, M., Sinnecker, G.H., Kruse, K. (2000): Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 85(8): 2810-2815

Hiort, O., Holterhus, P.M., Sinnecker, G.H.G., Kruse, K. (1999): Androgenresistenzsyndrome-Klinische und molekulare Grundlagen. *Deutsches Ärzteblatt*. 96(11): A-686-692

Hiort, O., Sinnecker, G.H., Holterhus, P.M., Nitsche, E.M., Kruse, K. (1996): The clinical and molecular spectrum of androgen insensitivity syndromes. *American Journal of Medical Genetics*. 63(1): 218-222

Holterhus, P.M. (2009): Störungen der Geschlechtsentwicklung. *Gynäkologische Endokrinologie*. (3): 130-135

Holterhus, P.M., Piefke, S., Hiort, O. (2002): Anabolic steroids, testosterone-precursors and virilizing androgens induce distinct activation profiles of androgen responsive promoter constructs. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 82(4-5): 269-275

Holterhus, P.M, Sinnecker, G.H., Hiort, O. (2000): Phenotypic diversity and testosterone-induced normalization of mutant L712F androgen receptor function in a kindred with androgen insensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 85(9): 3245-3250.

Holzapfel, B., Wickert, L. (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit*. 37(2): 120–126

Hornig, N.C., Demiri, J., Rodens, P., Murga Penas, E.M., Caliebe, A., Eckstein, A.K., Schweikert, H.U., Audi, L., Hiort, O., Werner, R., Kulle, A.E., Ammerpohl, O., Holterhus, P.M. (2019): Reduced androgen receptor expression in genital skin fibroblasts from patients with 45,X/46,XY mosaicism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 104(10): 4630-4638.

Hornig, N.C., Rodens, P., Dörr, H., Hubner, N.C., Kulle, A.E., Schweikert, H.U., Welzel, M., Bens, S., Hiort, O., Werner, R., Gonzalves, S., Eckstein, A.K., Cools, M., Verrijn-Stuart, A., Stunnenberg, H.G., Siebert, R., Ammerpohl, O., Holterhus, P.M. (2018): Epigenetic repression of androgen receptor transcription in mutation-negative androgen insensitivity syndrome (AIS Type II). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 103(12): 4617-4627

Hornig, N.C., Ukat, M., Schweikert, H.U., Hiort, O., Werner, R., Drop, S.L.S., Cools, M., Hughes, I.A., Audi, L., Ahmed, S.F., Demiri, J., Rodens, P., Worch, L., Wehner, G., Kulle, A.D.E., Dunstheimer, D., Müller-Roßberg, E., Reinehr, T., Hadidi, A.T., Eckstein, A.K., van der Horst, C., Seif, C., Siebert, R., Ammerpohl, O., Holterhus, P.M. (2016): Identification of an AR mutation-negative class of androgen insensitivity by determining endogenous AR activity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 101(11): 4468–4477

Hughes, I.A., Houk C., Ahmed S.F., Lee P.A., LWPES1/ESPE2 Consensus Group (2006): Consensus statement on management of intersex disorders. *Archives of Disease in Childhood*. 91(7): 554–563

Hughes, I.A., Werner, R., Bunch, T., Hiort, O. (2012): Androgen insensitivity syndrome. *Seminars in Reproductive Medicine*. 30(5): 432-442

Josso, N., Picard, J.Y., Rey, R., di Clemente, N. (2006): Testicular anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatric Endocrinology Reviews*. 3(4): 347-358

Kaufman, M., Pinsky, L., Feder-Hollander, R. (1981): Defective up-regulation of the androgen receptor in human androgen insensitivity. *Nature*. 293(5835): 735-737

Kuiper, G.G., Faber, P.W., van Rooij, H.C., van der Korput, J.A., Ris-Stalpers, C., Klaassen, P., Trapman, J., Brinkmann, A.O. (1989): Structural organization of the human androgen receptor gene. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2(3): R1-4

Lindhardt Johansen, M., Hagen, C.P., Rajpert-De Meyts, E., Kjærgaard, S., Petersen, B.L., Skakkebaek, N.E., Main, K.M., Juul, A. (2012): 45,X/46,XY mosaicism: phenotypic characteristics, growth, and reproductive function--a retrospective longitudinal study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 97(8): E1540-1549

Lundin, K.B., Nordenskjöld, A., Giwercman, A., Giwercman, Y.L. (2006): Frequent finding of the androgen receptor A645D variant in normal population. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 91(8): 3228-3231

MacLean, H.E., Ball, E.M., Rekaris, G., Warne, G.L., Zajac, J.D. (2004): Novel androgen receptor gene mutations in Australian patients with complete androgen insensitivity syndrome. *Human Mutation*. 23(3): 287

Matsumoto, T., Sakari, M., Okada, M., Yokoyama, A., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Kato, S. (2013): The androgen receptor in health and disease. *Annual Review of Physiology*. 75: 201-224

McEwan, I.J., Lavery, D., Fischer, K., Watt, K. (2007): Natural disordered sequences in the amino terminal domain of nuclear receptors: lessons from the androgen and glucocorticoid receptors. *Nuclear Receptor Signaling*. 5: e001

Mittwoch, U. (2006): Sex is a threshold dichotomy mimicking a single gene effect. *Trends in Genetics*. 22(2): 96-100

Mongan, N.P., Tadokoro-Cuccaro, R., Bunch, T., Hughes, I.A. (2015): Androgen insensitivity syndrome. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. 29(4): 569-580

Muffat, J., Walker, D.W. (2010): Apolipoprotein D: an overview of its role in aging and age-related diseases. *Cell Cycle*. 9(2): 269–273

Nadal, M., Prekovic, S., Gallastegui, N., Helsen, C., Abella, M., Zielinska, K., Gay, M., Vilaseca, M., Taulès, M., Houtsmuller, A.B., van Royen, M.E., Claessens, F., Fuentes-Prior, P., Estébanez-Perpiñá, E. (2017): Structure of the homodimeric androgen receptor ligand-binding domain. *Nature Communications*. 8:14388

Nieschlag, E., Zitzmann, M., Kamischke, A. (2003): Use of progestins in male contraception. *Steroids*. 68(10-13): 965-972

Nonomura, N., Nakamura, M., Namiki, M., Kiyohara, H., Mizutani, S., Okuyama, A., Sonoda, T. (1991): Mixed gonadal dysgenesis: case reports and a review of 65 Japanese cases. *Archives of Andrology*. 26(1): 15-19

Nordenskjöld, A., Söderhäll, S. (1998): An androgen receptor gene mutation (A645D) in a boy with a normal phenotype. *Human Mutation*. 11(4): 339

Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999): A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 97(2): 161-163

Petroli, R.J., Hiort, O., Struve, D., Gesing, J.K., Soardi, F.C., Spínola-Castro, A.M., Melo, K., Prado Arnhold, I.J., Maciel-Guerra, A.T., Guerra-Junior, G., Werner, R., de Mello, M.P. (2017): Functional impact of novel androgen receptor mutations on the clinical manifestation of androgen insensitivity syndrome. *Sexual Development*. 11(5-6): 238-247

Pfaffl, M.W. (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*. 1/04: 92-95

Quigley, C. A., Bellis, A. D., Marschke, K. B., El-Awady, M. K., Wilson, E. M., French, F. S. (1995): Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Reviews*. 16(3): 271-321

Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L., Milne, R. (2000): Apolipoprotein D. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1482(1-2): 185-198

Rodien, P., Mebarki, F., Mowszowicz, I., Chaussain, J.L., Young, J., Morel, Y., Schaison, G. (1996): Different phenotypes in a family with androgen insensitivity caused by the same M780I point mutation in the androgen receptor gene. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 81(8): 2994–2998

Röpke, A., Allhoff, E.P., Wieacker, P. (2004): Mutationen des Androgenrezeptor-Gens als mögliche Ursache der Antiandrogenresistenz beim Prostatakarzinom. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie*. 1(3): 194-201

Sack, J.S., Kish, K.F., Wang, C., Attar, R.M., Kiefer, S.E., An, Y., Wu, G.Y., Scheffler, J.E., Salvati, M.E., Krystek, S.R. Jr., Weinmann, R., Einspahr, H.M. (2001): Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(9): 4904-4909

Schüler, H.M., Zerres, K., Schwanitz, G., Raff, R. (2004): Das 45,X/46,XY Mosaik in der Pränataldiagnostik – Diagnostisches Vorgehen, Phänotyp-Analyse und Prognose. *Medizinische Genetik*. (16): 438-442

Sinnecker, G.H. (2012): Sexuelle Differenzierungsstörungen. In: Stein, R., Beetr, R., Thüroff, J.W. *Kinderurologie in Klinik und Praxis*. 3. Auflage. S.508-538. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York.

Sinnecker, G.H., Hiort, O., Dibbelt, L., Albers, N., Dörr, H.G., Hauss, H., Heinrich, U., Hemminghaus, M., Hoepffner, W., Holder, M., Schnabel, D., Kruse, K. (1996): Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *American Journal of Medical Genetics*. 63(1): 223-230

Sinnecker, G.H., Hiort, O., Nitsche, E.M., Holterhus, P.M., Kruse, K. (1997): Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group. *European Journal of Pediatrics*. 156(1): 7-14

Sinnecker, G., Köhler, S. (1989): Sex hormone-binding globulin response to the anabolic steroid stanozolol: evidence for its suitability as a biological androgen sensitivity test. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 68(6): 1195-2200

Soheilipour, F., Abed, O., Behnam, B., Abdolhosseini, M., Alibeigi, P., Pazouki, A. (2015): A rare case of mixed gonadal dysgenesis with mosaicism 45, X/46, X, +mar. *International Journal of Surgery Case Reports*. 7: 35-38

Sohval, A. R. (1963): "Mixed" Gonadal Dysgenesis: A variety of hermaphroditism. *American Journal of Human Genetics*. 15(2): 155–158

Tadokoro-Cuccaro, R., Davies, J., Mongan, N.P., Bunch, T., Brown, R.S., Audi, L., Watt, K., McEwan, I.J., Hughes, I.A. (2014): Promoter-dependent activity on androgen receptor N-terminal domain mutations in androgeninsensitivity syndrome. *Sexual Development*. 8(6): 339-349

Thomas, E.A., Copolov, D.L., Sutcliffe, J.G. (2003): From pharmacotherapy to pathophysiology: emerging mechanisms of apolipoprotein D in psychiatric disorders. *Current Molecular Medicine*. 3(5): 408-418

Thyen, U., Lanz, K., Holterhus, P.M., Hiort, O. (2006): Epidemiology and initial management of ambiguous genitalia at birth in Germany. *Hormone Research*. 66(4): 195-203

Werner, R., Holterhus, P.M. (2014): Androgen action. *Endocrine Development*. 27: 28-40

Werner, R., Holterhus, P.M., Binder, G., Schwarz, H.P., Morlot, M., Struve, D., Marschke, C., Hiort, O. (2006): The A645D mutation in the hinge region of the human androgen receptor (AR) gene modulates AR activity, depending on the context of the polymorphic glutamine and glycine repeats. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 91(9): 3515-3520

Wilson, C.A., Davies, D.C. (2007): The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction*. 133(2): 331-359

Zäh, W., Kalserone, A.E., Tucci, J.R. (1975): Mixed gonadal dysgenesis: a case report and review of the world literature. *Acta Endocrinologica. Supplementum*. 197: 3-39

7. Anhang

Zu Abb. 5a: ApoD-Induktion (Verhältnis DHT/EtOH) mit 10% FBS haltigem Medium (ohne Serum Starvation) nach 48 und 72 Stunden Inkubation

	KIV 7	KIV 13	KIV 21	S3	S9
48h	3,07375036	1,39474367	2,19618563	2,65737163	2,58470566
72h	5,04550964	3,31727818	2,61171957	2,28152743	3,71921975

Zu Abb.5b: ApoD-Induktion (Verhältnis DHT/EtOH) mit 0,1% FBS haltigem Medium (mit Serum Starvation) nach 48 und 72 Stunden Inkubation

	KIV 7	KIV 13	KIV 21	S3
48h	1,82133967	2,11403608	3,93128239	2,90905556
72h	2,77021894	4,11245531	3,47015475	3,26028938

Zu Abb.6a: Induktion von ApoD bei einer Hormonkonzentration von 0,1; 1; 10 und 100nM DHT bzw. EtOH. Inkubationszeit t0=24h, t3=72h, +SS= 0,1% FBS haltiges Medium

	Kis 3	Kis 30	Kis 36	Kis 37	Kis 39	Kis 43
t0	1	1	1	1	1	1
t3+SS	17,2676518	11,3137085	17,8765942	31,5594465	48,0012477	17,569485
t3EtOH+SS	17,9386572	12,9062681	18,1261422	34,6552015	33,7075532	15,3482259
t3 0,1nM DHT+SS	46,3661489	22,3158987	40,085262	79,8931551	85,3311153	45,5696063
t3 1nM DHT+SS	82,7105812	39,1244889	84,4485063	131,59857	182,278425	73,2623463
t3 10nM DHT+SS	106,891254	43,4113385	84,1563367	103,968307	176,069353	64,8934067
t3 100nM DHT+SS	102,892927	48,1678959	66,7178087	79,0667928	182,91125	60,7578957

Ratio DHT/EtOH	Kis 3	Kis 30	Kis 36	Kis 37	Kis 39	Kis 43
0,1nM DHT	2,58470566	1,72907446	2,21146131	2,30537269	2,53151319	2,96904714
1nM DHT	4,61074539	3,03143313	4,65893435	3,79736848	5,40764333	4,77334297
10nM DHT	5,95870985	3,36358566	4,64281566	3,00007798	5,22343915	4,22807216
100nM DHT	5,73582099	3,73213197	3,6807506	2,28152743	5,42641731	3,95862663

Zu Abb. 6b: Induktion von ApoD bei einer Hormonkonzentration von 0,1; 1; 10 und 100nM DHT bzw. EtOH. Inkubationszeit t₀=24h, t₃=72h, +SS= 0,1% FBS haltiges Medium

	KIV 7	KIV 13	KIV 28	KIV 35	KIV 40
t ₀	1	1	1	1	1
t ₃ +SS	7,4127045	46,5271206	4,87364105	37,0140219	17,3877578
t ₃ EtOH+SS	10,5195421	43,1114745	5,6177795	36,5044389	16,6794522
t ₃ 0,1nM DHT+SS	15,2951251	59,301636	11,0043345	74,5429495	25,9021509
t ₃ 1nM DHT+SS	25,0198286	101,125288	16,4498212	97,0058603	51,4464634
t ₃ 10nM DHT+SS	29,9607119	131,143273	24,4201473	93,377302	51,2684722
t ₃ 100nM DHT+SS	31,4502592	161,456308			57,8802802

Ratio DHT/EtOH	KIV 7	KIV 13	KIV 28	KIV 35	KIV 40
0,1nM DHT	1,45397252	1,37554182	1,9588406	2,04202425	1,55293775
1nM DHT	2,37841423	2,3456699	2,92817139	2,65737163	3,08442165
10nM DHT	2,84810039	3,04195751	4,34693945	2,55797116	3,07375036
100nM DHT	2,9896985	3,74508899			3,47015475

Zu Abb.7: Induktion von ApoD bei einer Hormonkonzentration von 0,1; 1; 10 und 100nM DHT bzw. EtOH. Inkubationszeit t₀=24h, t₃=72h, +SS= 0,1% FBS haltiges Medium

	S 8	GS 432	12F432	C1534	C1956	HvHF 135
t ₀	1	1	1	1	1	1
t ₃ +SS	20,9662945	7,08614015	17,81474589	6,40855902	11,8351001	15,8894799
t ₃ EtOH+SS	9,18958684	6,65758988	10,19648502	6,00015596	13,928809	19,4271182
t ₃ 0,1nM DHT+SS	6,70389708	10,7778686	18,57126263	11,3529869	23,8348394	18,5712626
t ₃ 1nM DHT+SS	6,56593287	31,2330163	23,34432551	27,3790408	46,8507423	19,4945642
t ₃ 10nM DHT+SS	7,59473697	36,5044389	24,33566005	25,1938553	48,0012477	15,6165082
t ₃ 100nM DHT+SS	7,28535867	44,6317973	20,18203854	16,9710039	58,6882588	

Ratio DHT/ EtOH	S 8	GS 432	12F432	C1534	C1956	HvHF 135
0,1nM DHT	0,72951017	1,61888443	1,821339667	1,89211529	1,71119005	0,95594532
1nM DHT	0,71449707	4,6913398	2,289448321	4,56305486	3,36358566	1,00347175
10nM DHT	0,82645032	5,48313122	2,386671486	4,19886673	3,44618464	0,80385099
100nM DHT	0,79278414	6,70389708	1,979313313	2,82842712	4,21344414	

Zu Abb.8: Induktion von ApoD bei einer Hormonkonzentration von 0,1; 1; 10 und 100nM DHT bzw. EtOH. Inkubationszeit t₀=24h, t₃=72h, +SS= 0,1% FBS haltiges Medium

	GS 597	GS 408	5A	8A	3A
t ₀	1	1	1	1	1
t ₃ +SS	250,731596	11,0043345	13,4077942	12,9510755	2,63901582
t ₃ EtOH+SS	243,875327	13,5010527	14,1232479	17,569485	8,5741877
t ₃ 0,1nM DHT+SS	206,50029	17,2079102	14,6720647	32	2,17346973
t ₃ 1nM DHT+SS	298,171798	23,6702001	23,6702001	38,1867438	2,13613082
t ₃ 10nM DHT+SS	582,05029	27,857618	34,6552015	35,13897	2,24233216
t ₃ 100nM DHT+SS	455,087453	25,9021509	42,0781683		

Ratio DHT/ EtOH	GS 597	GS 408	5A	8A	3A
0,1nM DHT	0,84674531	1,27456063	1,0388591	1,82133967	0,25348987
1nM DHT	1,22264028	1,75321144	1,67597427	2,17346973	0,24913507
10nM DHT	2,38667149	2,06336636	2,45376995	2	0,26152123
100nM DHT	1,86606598	1,91852824	2,97935493		

Zu Abb.9: Prof. Dr. Joachim Grötzinger, Biochemisches Institut der CAU Kiel, 2016.

Zu Abb.10: Induktion von ApoD bei einer Konzentration von 10nM DHT und einer Inkubationszeit von 72 Stunden mit 10% (- SS) und mit 0,1% (+SS) Kohle-behandeltem FBS

	GS126	GS264	GS159	GS401	GS503	GS504	GS637
t0	1	1	1	1	1	1	1
t3-SS	7,28535866 9	9,747282 109	3,138336 392	3,04195 7506	2,38667149	11,27456 6	9,350217 99
t3EtOH -SS	7,26015324 3	10,74058 002	2,897884 309	2,969047 141	3,32879494	13,26911 27	9,317868 69
t3DHT -SS	23,8348394 1	82,13925 744	7,727490 631	9,546685 944	3,44618464	13,68952 04	15,61650 82
t3+SS	22,9432839 7	34,77551 56	7,061623 97	9,157793 285	7,01284577	37,53071 84	16,44982 12
t3EtOH +SS	22,1617514 9	34,41582 049	6,727171 322	8,310872 826	6,89236928	32,44670 34	16,97100 39
t3DHT +SS	81,2896628 8	232,3249 038	20,18203 854	24,08394 796	14,5707173	37,14252 53	38,45235 36

	GS582	GS583	GS146	GS554	3N	ARD352	GS582
t0	1	1	1	1	1	1	1
t3-SS	8,5741877	14,82540 9	3,010493 49	6,797479 99	4,9933222	6,773962 5	8,574187 7
t3EtOH -SS	9,51365692	14,87687 91	3,010493 49	5,958709 85	5,44525647	5,351710 22	9,513656 92
t3DHT -SS	19,2261768	73,26234 63	11,08087 57	9,579829 64	5,54043787	15,40151 11	19,22617 68
t3+SS	22,3933738	39,80837 29	14,17228 03	19,90418 65	15,5624792	15,72512 96	22,39337 38
t3EtOH +SS	26,8155883	34,89624 74	14,62130 32	15,72512 96	15,4549813	15,08455 26	26,81558 83
t3DHT +SS	73,5166947	192,0049 91	41,93258 89	28,54171 26	23,3443255	64,89340 67	73,51669 47



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Prof. Dr. med. P.-M. Holterhus
Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Endokrinologische Ambulanz
UKSH, Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 9
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-53 33
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum:

14.1.2014

AZ.: D 401/14

(bitte stets angeben)

DFG-Sachbeihilfeantrag:

Fortsetzungsantrag, Information und Einwilligungserklärung

In Bezug auf:

AZ.: D 415/11

Studienplan:

Androgenresistenz ohne Androgenrezeptorengenmutation: von der funktionellen Charakterisierung zum Epigenotyp

(In Bezug auf AZ. A 410/08: Investigation of the molecular pathogenesis and patho-physiology of Disorders of Sex Development (DSD) –EuroDSD)

Ihr Antrag vom: 13.1.2014 (Eingang 14.1.2014)

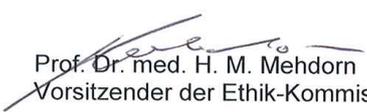
Sehr geehrter Herr Kollege Holterhus,

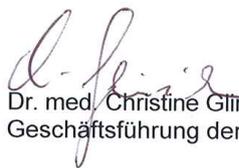
vielen Dank für Ihren obengenannten Antrag zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Fortführung des Projektes keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Projektleiter und den an der Studie teilnehmenden Ärzten.
3. Nach Abschluss der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

8. Danksagung

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

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus, der mir dieses spannende Thema bereitgestellt hat und diese Arbeit erst ermöglicht hat einen Dank aussprechen. Weiterhin bedanke ich mich bei ihm für die sehr gute Betreuung und für wichtige Denkanstöße bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation.

Ein großer Dank gilt auch Dr. rer. nat. Nadine C. Hornig für die intensive Betreuung und Einarbeitung im Labor, die ausdauernde Betreuung beim experimentellen Teil dieser Arbeit, sowie zahlreiche Erklärungen und Diskussionen, sowohl bei der Interpretation der Ergebnisse, als auch deren Darstellung und der schriftlichen Fassung meiner Dissertation.

Außerdem danke ich Martin Ukat für die geduldige Einarbeitung im Labor und die Einführung in die verwendeten Methoden.

Ebenfalls danke ich allen Mitarbeitern des kinderendokrिनologischen Labors, insbesondere Brigitte Karweliés und Tanja Stampe für ihre Unterstützung und Hilfe bei der Arbeit an den Zellkulturen. Außerdem geht mein Dank auch an das Institut für Humangenetik und Claudia Becher für die zytogenetischen Befunde zur Chromosomenanalyse an den Fibroblasten.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Joachim Grötzinger aus dem Biochemischen Institut der CAU Kiel für die Erstellung der Abbildung zur Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors und seinen Interpretationen zu den dargestellten Mutationen danken.

Einen besonderen Dank möchte ich außerdem meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Ausarbeitung meiner Dissertation aussprechen.

9. Publikationen

Hornig, N.C., Ukat, M., Schweikert, H.U., Hiort, O., Werner, R., Drop, S.L.S., Cools, M., Hughes, I.A., Audi, L., Ahmed, S.F., Demiri, J., Rodens, P., Worch, L., Wehner, G., Kulle, A.D.E., Dunstheimer, D., Müller-Roßberg, E., Reinehr, T., Hadidi, A.T., Eckstein, A.K., van der Horst, C., Seif, C., Siebert, R., Ammerpohl, O., Holterhus, P.M. (2016): Identification of an AR Mutation-Negative Class of Androgen Insensitivity by Determining Endogenous AR Activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 101(11): 4468–4477

Hornig, N.C., Demiri, J., Rodens, P., Murga Penas, E.M., Caliebe, A., Eckstein, A.K., Schweikert, H.U., Audi, L., Hiort, O., Werner, R., Kulle, A.E., Ammerpohl, O., Holterhus, P.M. (2019): Reduced androgen receptor expression in genital skin fibroblasts from patients with 45,X/46,XY mosaicism. *J Clin Endocrinol Metab.* 104(10):4630-4638.