

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

**ANDROGENRESISTENZ AUFGRUND EPIGENETISCHER  
VERÄNDERUNGEN AM ANDROGENREZEPTORPROMOTOR**

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

vorgelegt von  
Pascal Rodens  
aus Ulm

Kiel 2021

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dominik M. Schulte

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 03.05.2021

gez.: Prof. Dr. Paul-Martin Holterhus  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

I	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Geschlechtsentwicklung	1
1.1.1	Geschlechtliche Determinierung	1
1.1.2	Geschlechtliche Differenzierung	2
1.1.3	Störungen der Geschlechtsentwicklung	3
1.2	Androgenrezeptor	3
1.3	Androgenresistenz	5
1.3.1	Grundlagen der Androgenresistenz	5
1.3.2	Diagnostik der Androgenresistenz	6
1.3.3	AIS Typ 2	8
1.4	Epigenetik	9
1.4.1	DNA-Methylierung und Genexpression	10
1.5	Fragestellung	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Materialien	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Chemiekalien	13
2.1.3	Verbrauchsartikel	15
2.1.4	Fertigsysteme („Kits“)	16
2.1.5	Oligonukleotide	16
2.1.5.1	Primer für cDNA-Synthese	16
2.1.5.2	Primer für Quantitative real-time PCR	17
2.1.5.3	Primer für Pyro-PCR	17
2.1.5.4	Primer für Pyrosequenzierung	18
2.1.6	Software	18
2.1.7	Patientenkollektiv und vorausgegangene Experimente	18
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellkultur	22
2.2.1.1	Passagieren einer Zellkultur	22
2.2.1.2	Auftauen von Genitalhautfibroblasten	22

2.2.1.3	Kryokonservierung von Genitalhautfibroblasten	23
2.2.2	APOD-Assay	23
2.2.3	RNA-Extraktion und RNA-Quantifizierung	25
2.2.4	cDNA-Synthese	25
2.2.5	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	27
2.2.5.1	Prinzip der Quantitativen Echtzeit-PCR	27
2.2.5.2	Durchführung	29
2.2.5.3	Statistische Analyse der qPCR	30
2.2.6	DNA-Extraktion und DNA-Quantifizierung	32
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.2.7.1	Prinzip	33
2.2.7.2	Durchführung	33
2.2.8	Herstellung von WGA	34
2.2.9	Bisulfit-Methode	35
2.2.9.1	Prinzip	35
2.2.9.2	Durchführung	36
2.2.10	Pyro-PCR	37
2.2.10.1	Prinzip	37
2.2.10.2	Durchführung	37
2.2.10.3	Agarose-Gelelektrophorese	39
2.2.11	Pyrosequenzierung	39
2.2.11.1	Prinzip	39
2.2.11.2	Durchführung	40
2.2.12	Biologische und technische Replikate	42
2.2.13	Statistische Auswertung	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Analyse der AR-mRNA-Expression	44
3.1.1	Männliche Kontrollen (Skrotal- und Vorhautgewebe)	44
3.1.2	Individuen mit AIS (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)	46
3.1.3	Individuen mit AIS (Vorhaut-/Labia minora-Gewebe)	48
3.1.4	Individuen mit AIS Typ 2	49
3.2	Zusammenhang zwischen AR-Aktivität und AR-mRNA-Expression	51

3.2.1	Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe	52
3.2.2	Vorhaut-/Labia minora-Gewebe	53
3.3	Methylierungsanalyse	54
3.3.1	Männliche Kontrollen (Skrotal-und Vorhautgewebe)	54
3.3.2	Individuen mit AIS Typ 2 (Skrotal-/Labia majora-Gewebe)	55
3.3.3	Individuen mit AIS Typ 2 (Vorhaut-/Labia minora-Gewebe)	57
3.4	Zusammenhang zwischen AR-mRNA-Expression und CpG-Methylierungslevel	59
4	Diskussion	62
4.1	Methodendiskussion: Bisulfit-Pyrosequenzierung	62
4.2	AR-mRNA-Expression in Kontrollen	64
4.3	AR-mRNA-Expression in Individuen mit AIS	67
4.4	Methylierungsanalysen in Skrotal-/Labioskrotalgewebe	68
4.5	Methylierungsanalyse in Vorhaut-/Labia minora-Gewebe	70
4.6	Weitere Experimente	71
4.7	Ausblick	72
5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis	75
7	Abbildungsverzeichnis	87
8	Tabellenverzeichnis	89
9	Anhang	90
10	Danksagung	109
11	Publikationsliste	110

## I Abkürzungsverzeichnis

AIS	<i>androgen insensitivity syndrome</i> ; Androgenresistenz
AMH	Anti-Müller-Hormon
APOD	Apolipoprotein D
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgenresponsives Element
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CAIS	<i>complete androgen insensitivity syndrome</i> ; komplette Androgenresistenz
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
Cp	crossing point
DBD	DNA-bindende Domäne
dCTP $\alpha$ S	2'-Desoxycytidin-5'-( $\alpha$ -thio)-triphosphat
DHT	Dihydrotestosteron
dNTP $\alpha$ S	2'-Deoxyribonukleosid-5'-( $\alpha$ -thio)-triphosphat
DSD	<i>disorders/differences of sex development</i> ; Störungen/Abweichungen der Geschlechtsentwicklung
dTTP $\alpha$ S	2'-Desoxythymidin-5'-( $\alpha$ -thio)-triphosphat
EtOH	Ethanol
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,8 m/s <sup>2</sup> )
gDNA	genomische DNA
GF	Genitalhautfibroblasten
hCG	humanes Choriongonadotropin

## Abkürzungsverzeichnis

---

HSP	Hitzeschockprotein
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i> ; Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
kbp	Kilobasenpaare
LBD	ligandenbindende Domäne
LH	luteinisierendes Hormon
MAIS	<i>minimal androgen insensitivity syndrome</i> ; minimale Androgenresistenz
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> ; Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MSRE	methylierungssensitive Restriktionsenzyme
MW	Mittelwert
n/a	<i>not available</i> ; nicht verfügbar
NGS	<i>next generation sequencing</i> ; Sequenzierung der nächsten Generation
NTD	N-terminale Domäne
PAIS	<i>partial androgen insensitivity syndrome</i> ; partielle Androgenresistenz
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PPi	Pyrophosphat
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> ; quantitative Echtzeit-PCR
SA	Standardabweichung
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> ; Einzelnukleotid-Polymorphismus
SF1	Steroidogenic Factor 1
Sp1	Specific Protein 1
SOX9	Sry-related HMG box 9
SRY	<i>sex determining region Y</i> ; Hoden-determinierender Faktor
+SS	<i>without serum starvation</i> ; ohne Serumangel (normales Nährstoffangebot)
-SS	<i>with serum starvation</i> ; mit Serumangel (Nährstoffmangel)
TDF	<i>testis determining factor</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

TSS	<i>transcriptional start site</i> ; Transkriptionsstartpunkt
UTR	<i>untranslated region</i> ; untranslatierter Bereich
vs	versus
VSD	Ventrikelseptumdefekt



# 1 Einleitung

## 1.1 Geschlechtsentwicklung

Die Konzeption markiert den Startpunkt der Geschlechtsentwicklung eines Menschen durch Festlegung des genetischen Geschlechts in der Zygote. Zunächst entsteht eine indifferente, bipotente Gonadenanlage, deren geschlechtliche Determinierung in Hoden oder Ovar abhängig von den vorliegenden Gonosomen initiiert wird. Die hieraus geschaffene Grundlage ermöglicht die geschlechtliche Differenzierung in einen männlichen oder weiblichen Phänotyp.

### 1.1.1 Geschlechtliche Determinierung

Sobald es zur Verschmelzung des Spermiums mit der Eizelle kommt, wird durch das vom Spermium mitgebrachte Gonosom das genetische Geschlecht, in Form eines männlichen, XY-, oder eines weiblichen, XX-Karyotyps, festgelegt. Zunächst bildet sich, eng verknüpft mit der Entwicklung der Nebennieren, Nieren und des Urogenitaltrakts, in der 5. Woche der Embryonalperiode eine paarige, indifferente Gonadenanlage aus einer durch Zölomepithel bedeckten Verdickung im Mesoderm, die bei genetisch weiblichen und männlichen Embryonen identisch ist und sich sowohl in Hoden als auch Ovar entwickeln vermag (Hiort und Holterhus, 2000; Rey und Grinspon, 2011).

Die Entwicklung des Hodens wird in der 7. Woche der Embryonalperiode durch das Ablesen des auf dem Y-Chromosom liegenden SRY- (sex-determining region Y) Gens, auch Hoden-determinierender Faktor (testis-determining factor, TDF) genannt, initiiert (Berta et al., 1990; Sinclair et al., 1990). Obwohl einige Gene identifiziert wurden, die mit der Regulation der SRY-Gen-Expression assoziiert sind, ist der auslösende Mechanismus dahinter noch nicht genau verstanden. Das SRY-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Expression weiterer Gene beeinflusst und so zum Aufbau eines komplexen Gen-Regulationsnetzwerks für die Hodenentwicklung führt (Huang et al., 2017; Kashimada und Koopman, 2010).

Ausgehend von der indifferenten Gonadenanlage schlägt ein genetisch weiblicher Embryo einen anderen Weg ein, da seine Zellen kein Y-Chromosom enthalten und die durch das SRY-

Gen ins Rollen gebrachte Kaskade ausbleibt. Stattdessen beginnt unter dem Einfluss spezifischer Gene die Entwicklung der Ovarien (Huang et al., 2017).

### 1.1.2 Geschlechtliche Differenzierung

Die geschlechtliche Determinierung ebnet durch die Expression und das Zusammenspiel verschiedener Gene den Weg für die geschlechtliche Differenzierung. Die unterschiedliche Entwicklung des inneren und äußeren Genitales ist maßgeblich abhängig von der Präsenz und vermittelten Wirkung zweier Hormone, Anti-Müller-Hormon (AMH) und Testosteron (Hiort, 2013).

Unabhängig des genetischen Geschlechts entstehen in enger Beziehung zur embryologischen Urniere und indifferenten Gonadenanlage der Wolff-Gang (Ductus mesonephricus) und der Müller-Gang (Ductus paranephricus). Diese beiden paarigen Strukturen bilden die Grundlage der Entwicklung der inneren Geschlechtsorgane.

Die Expression des SRY-Gens bei männlichen Embryonen führt zur Differenzierung der Vorläufer-Stützzellen zu Sertoli-Zellen und stellt den ersten Indikator der Hodenentwicklung dar. Etwas später differenzieren sich Leydig-Zellen aus interstitiellen Zellen der Gonadenanlage (Wilhelm et al., 2007). Das von den Sertoli-Zellen synthetisierte und sezernierte AMH induziert, durch das Zusammenspiel des AMH-Rezeptor Typ 1 und 2, die Rückbildung der Müller-Gänge. Die Transkription des AMH-Gens wird durch die Transkriptionsfaktoren SOX9, SF1 und WT1 reguliert. Gleichzeitig erfolgt die androgenabhängige Retention und Ausdifferenzierung der Wolff-Gänge zu Nebenhoden, Samenleiter und Bläschendrüse durch hohe, lokale Konzentrationen von Testosteron, das aus den Leydig-Zellen parakrin sezerniert wird. Handelt es sich hingegen um einen weiblichen Embryo, unterbleibt die Bildung von AMH und Testosteron. Die Wolff-Gänge bilden sich aufgrund der fehlenden Testosteronstimulation zurück und die Müller-Gänge entwickeln sich in Abwesenheit des AMH weiter zu Eileitern, Uterus und oberem Abschnitt der Vagina (Rey und Grinspon, 2011).

Das männliche äußere Genitale entwickelt sich ebenfalls aus indifferenten Anlagen unter dem Einfluss von Androgenen. Jedoch muss hierbei die endokrine Wirkung des Testosterons im Zielgewebe eine Verstärkung erfahren, indem es durch das Enzym 5 $\alpha$ -Reduktase zu 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) konvertiert wird. Testosteron und DHT vermitteln ihre Effekte über den gleichen Androgenrezeptor (AR), wodurch die Bildung der Prostata induziert wird

und sich der Genitalhöcker, die Genitalwülste und die Urethralfalten zu Penis und Skrotum entwickeln (Hiort, 2013). Die Testosteronsynthese in den Leydig-Zellen wird im ersten Trimester durch humanes Choriongonadotropin (hCG) reguliert und erfolgt mit Ausreifen der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Achse unter der Kontrolle von luteinisierendem Hormon (LH). HCG und LH stimulieren beide den gleichen G-Protein-gekoppelten-7-Transmembranrezeptor (Hiort und Holterhus, 2000; Rey und Grinspon, 2011).

Über die Regulation der Differenzierung des weiblichen äußeren Genitales ist wenig bekannt. Jedoch scheinen Östrogene dabei eine Rolle zu spielen. Der Genitalhöcker entwickelt sich bei einem weiblichen Embryo zur Klitoris, die Genitalwülste zu den Labia majora und die Urethralfalten zu den Labia minora (Rey und Grinspon, 2011; Yang et al., 2010).

### **1.1.3 Störungen der Geschlechtsentwicklung**

Auf jeder Ebene der Geschlechtsentwicklung kann es zu Abweichungen der üblichen männlichen oder weiblichen Entwicklung der Gonaden und des inneren und äußeren Genitales kommen. Unter dem Begriff „Störungen der Geschlechtsentwicklung“ (disorders of sex development bzw. differences of sex development, DSD) versteht man eine Gruppe von Diagnosen, bei denen eine kongenitale Diskrepanz zwischen dem chromosomalen, gonadalen und phänotypischen Geschlecht vorliegt. Ursächlich können neben Chromosomenaberrationen sowohl Genmutationen als auch epigenetische Modifikationen sein, die direkt in die Gonadenentwicklung eingreifen oder über Störungen der Androgenbiosynthese oder der Androgenwirkung zu Abweichungen der Geschlechtsentwicklung führen (Hiort et al., 2014; Holterhus, 2013).

## **1.2 Androgenrezeptor**

Der Androgenrezeptor wird zu den Steroidhormonrezeptoren gezählt und gehört der Superfamilie der nukleären Rezeptoren bzw. ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren (Brown et al., 1989; Beato et al., 2000). Er wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und die durch ihn vermittelten Effekte wurden im Genital-, Muskel-, Fett-, Knochen- und Prostatagewebe, sowie im kardiovaskulären, Nerven-, Immun- und hämopoetischen System beobachtet (Kimura et al., 1993; Rana et al., 2014; Ruizeveld de Winter et al., 1991; Takeda et al.,

1990). Die zwei wichtigsten Liganden für den Androgenrezeptor sind Testosteron und DHT, wobei DHT eine doppelt so hohe Bindungsaffinität vorweist und fünfmal langsamer vom Rezeptor dissoziiert (Grino et al., 1990).

Das Androgenrezeptorgen ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms an Position Xq11-12 lokalisiert, umspannt einen Bereich von ~ 90 kbp und beinhaltet acht Exons. Seine genomische Struktur ist denen anderer Steroidrezeptoren ähnlich und besteht aus mehreren funktionellen DNA-Bereichen: eine C-terminale ligandenbindende Domäne (LBD), eine DNA-bindende Domäne (DBD), eine N-terminale Domäne (NTD) sowie transaktivierende Einheiten und Sequenzen für den Kernimport und-export. Die LBD und die DBD des AR werden von einer Gelenkregion (hinge region) getrennt. Im Vergleich zu der evolutionär hoch konservierten Sequenz der DBD und LBD ist die NTD-Sequenz sehr variabel. Die DBD-Region des AR bildet zwei Zinkfinger-Motive aus, die einerseits für die AR-DNA-Erkennung und Bindung und andererseits für die Rezeptor-Dimerisierung wichtig sind (MacLean et al., 1997; Koochekpour, 2010; Davey und Grossmann, 2016).

In Abwesenheit eines Liganden befindet sich der AR im Zytoplasma assoziiert mit Hitzeschockproteinen (HSP) im inaktiven Zustand. Die Bindung von Androgenen an den AR resultiert in einer Konformationsänderung, Dissoziation der HSP, Exposition der Kernlokalisierungssequenz und Interaktion mit Coregulatoren. Nach Translokation des Rezeptor-Androgen-Komplexes in den Zellkern kommt es zur Rezeptordimerisierung und Bindung an androgenresponsive Elemente (ARE) der DNA. Unter der Einwirkung weiterer Coregulatoren, die entweder als Coaktivatoren oder Corepressoren fungieren, beeinflusst der aktivierte AR als Transkriptionsfaktor die Expression androgenabhängiger Zielgene (Heinlein und Chang, 2002a).

Da einige AR-abhängige Effekte innerhalb von Sekunden bis Minuten eintreten und somit zu schnell stattfinden, um durch eine Änderung der Transkription und Translation von AR-Zielgenen hervorgerufen zu sein, existieren neben diesem klassischen AR-Signalweg auf DNA-Ebene noch weitere nicht-genomische AR vermittelte Signalkaskaden. Diese nicht-klassischen AR-Signalwege spielen sich, unabhängig von einer direkten Rezeptor-DNA-Interaktion, im Zytoplasma oder an der Plasmamembran ab (Davey und Grossmann, 2016). Hierzu gehören die Aktivierung von Proteinkinasen wie die Proteinkinase A, Proteinkinase C oder mitogen-activated protein kinase (MAPK) sowie die intrazelluläre Freisetzung von Calcium-Ionen (Heinlein und Chang, 2002b).

Zusätzlich zu der durch Androgenbindung ausgelösten Signaltransduktion, ist auch eine ligandenunabhängige AR-Aktivierung beschrieben. Ein möglicher Mechanismus zur Entstehung eines kastrationsresistenten Prostatakarzinoms basiert auf dieser Grundlage (Lyons et al., 2008). Außerdem wurde in in-vitro-Experimenten mit immortalisierten Mausmyoblasten eine androgenunabhängige Aktivierung des AR durch Behandlung der Zellen mit dem insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) beobachtet (Kim und Lee, 2009). Es bleibt Gegenstand aktueller Forschung, ob sich diese ligandenunabhängige AR-Aktivierung auf die Pathophysiologie des Prostatakarzinoms beschränkt oder ob sie auch eine Rolle bei physiologischen Vorgängen spielt (Davey und Grossmann, 2016).

### **1.3 Androgenresistenz**

#### **1.3.1 Grundlagen der Androgenresistenz**

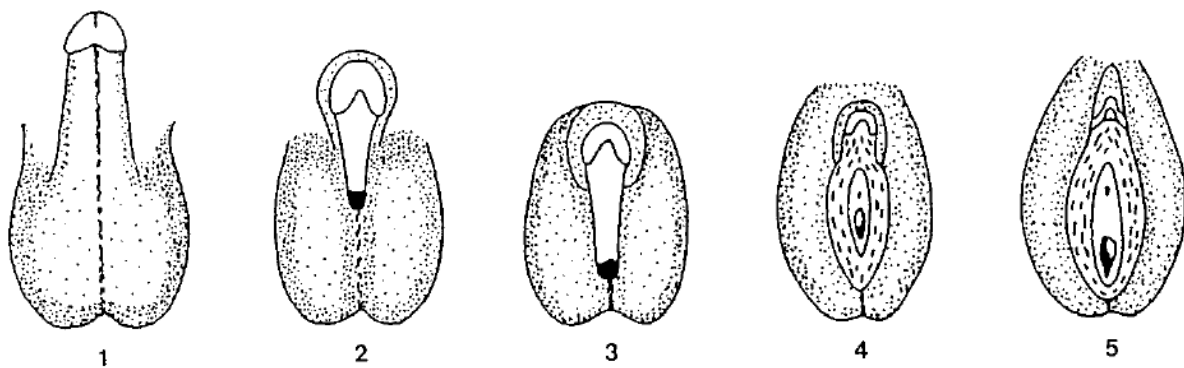
Eine häufige Ursache für eine Störung der Geschlechtsentwicklung (disorder of sex development, DSD) bei Individuen mit einem 46, XY Karyotyp stellt die Androgenresistenz (androgen insensitivity syndrome, AIS) dar. Eine AR-Dysfunktion führt dabei zum unzureichenden bzw. ausbleibenden Ansprechen auf Androgene, trotz altersentsprechender Androgenproduktion. Resultat der Endorganresistenz gegen Androgene ist eine gestörte Maskulinisierung sowie Virilisierung, deren Ausmaß abhängig von der Androgenrezeptorrestfunktion ist. Klinisch wird AIS in drei Hauptgruppen eingeteilt, wobei jede davon noch in Untergruppen unterteilt werden kann.

Die komplette Androgenresistenz (complete androgen insensitivity syndrome, CAIS) äußert sich in einem komplett weiblichen Habitus des betroffenen Individuums. Die Vagina endet jedoch blind, der Uterus fehlt und die männlichen Gonaden werden oft in den Leistenkanälen oder im unteren Abdomen vorgefunden. Die meisten Individuen mit kompletter Androgenresistenz fallen durch eine ausbleibende Menarche in der Pubertät auf oder es werden im Kindesalter, bei einer operativen Versorgung einer Leistenhernie, zufälligerweise Hoden im Leistenkanal gefunden.

Das Erscheinungsbild der partiellen Androgenresistenz (partial androgen insensitivity syndrome, PAIS) variiert, je nach Restfunktion des AR, von einem überwiegend weiblichen bis zu einem überwiegend männlichen Genitale.

Die minimale Androgenresistenz (minimal androgen insensitivity syndrome, MAIS) ist primär mit der Entwicklung eines normalen männlichen Phänotyps, oder in einigen Fällen eines Mikropenis, assoziiert, jedoch kann es in der Pubertät zu einer Gynäkomastie und im Erwachsenenalter zur Infertilität kommen. (Mongan et al., 2015) (Abbildung 1).

Die Prävalenz von CAIS wird mit 2-5:100.000 angegeben und auch PAIS soll in etwa dieser Größenordnung vorkommen (Boehmer et al., 2001). Zur Prävalenz von MAIS existieren keine verlässlichen Daten, da es weniger häufig diagnostiziert wird. (Hughes et al., 2012).



**Abbildung 1: Klassifikation der Androgenresistenz nach Phänotyp (modifiziert nach Sinnecker et al., 1996)**

- Typ 1: Normales männliches Genitale; Spermatogenese und/oder pubertäre Virilisierung können beeinträchtigt sein
- Typ 2: Überwiegend männliches Genitale; isolierte Hypospadie oder Mikropenis, geteiltes Skrotum und hochgradige Hypospadie
- Typ 3: Ambivalentes Genitale; Klitoris-ähnlicher Mikrophallus, geteiltes Skrotum erscheint wie Labia majora, Meatus urethrae externum liegt perineal oder endet im Sinus urogenitalis mit kurzer, blind endender Vagina
- Typ 4: Überwiegend weibliches Genitale; geringgradige Anzeichen von Androgeneffekten: leichtgradige Klitorishypertrophie oder partielle labiale Fusion mit Sinus urogenitalis, deutliche Urethra- und Vaginalöffnung
- Typ 5: Normales weibliches Genitale

### 1.3.2 Diagnostik der Androgenresistenz

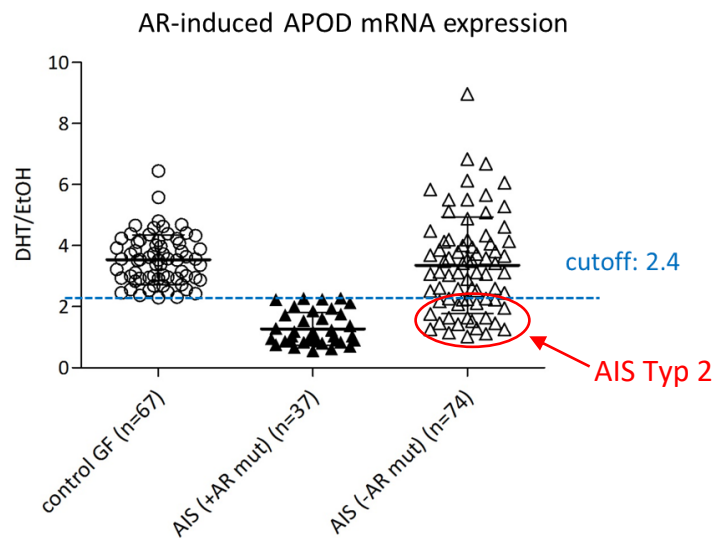
Die Diagnose AIS anhand des Phänotyps allein ist nicht sicher möglich, da eine Unterscheidung zu anderen DSD mit Hormonsynthesestörungen wie z. B. einem 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-3 Defekt schwer sein kann (Lee et al., 2007). Die Bestimmung von Testosteron und DHT dient der Differentialdiagnostik von Androgensynthese und Androgenwirkungsstörungen (Hughes und Deeb, 2006). Als zusätzliche Möglichkeit zur Diagnostik wurden Lig-

andenbindungstests zur Analyse einer reduzierten Androgenbindungsaffinität von kultivierten Genitalhautfibroblasten eingesetzt. Jedoch berücksichtigen diese Tests nur Veränderung im ligandenbindenden Bereich des AR und sind deswegen begrenzt aussagekräftig (McPhaul et al., 1993).

In den frühen 1990er Jahren, kurz nach der Klonierung des AR-Gens, begann die Identifizierung spezifischer Mutationen im AR-Gen, was die Diagnose AIS zunehmend abhängig vom Auffinden von AR-Mutationen machte. Mittlerweile sind über 500 verschiedene AR-Mutationen bei Individuen mit AIS beschrieben (Trapman et al., 1988; Lubahn et al., 1988; Chang et al., 1988; Gottlieb et al., 2012). Die Mehrheit der Mutationen sind in der AR-LBD lokalisiert, weniger häufig sind sie in der AR-DBD und noch seltener in der AR-NTD zu finden (Elfferich et al., 2013). Erwähnenswert ist, dass keine enge Genotyp- Phänotyp-Korrelation existiert. Trotz identisch zugrundeliegender genetischer Veränderung zweier Individuen, kann sich die jeweilige klinische Manifestation der gestörten Androgenwirkung deutlich unterscheiden. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass weitere Faktoren, die unabhängig von einer spezifischen AR-Genmutation sind, den AIS-Phänotyp beeinflussen können (Rodien et al., 1996; Holterhus et al., 2000). Während bei über 95 % der klinisch diagnostizierten Fälle einer kompletten Androgenresistenz mindestens eine ursächliche Mutation im AR-Gen gefunden werden kann, trifft dies nur auf etwa 25-50% der Fälle von klinisch diagnostizierter partieller Androgenresistenz zu (Mongan et al., 2015).

Um neben Ligandenbindungstests und der auf AR-Genmutation basierenden Diagnostik eine alternative Möglichkeit zur Feststellung einer AR-Dysfunktion bei klinischem Verdacht auf AIS zu etablieren, wurde ein funktioneller Assay zur Analyse der AR-Aktivität in kultivierten Genitalhautfibroblasten entwickelt (Appari et al., 2009; Hornig et al., 2016b). Dabei wird ausgenutzt, dass die Expression eines AR-Zielgens, das Apolipoprotein D-Gen (APOD-Gen), bei normal funktionierendem AR, DHT-abhängig, signifikant hochreguliert wird. Aufgrund der Endorganresistenz gegen Androgene bei Individuen mit AIS wird im sog. APOD-Assay ein deutlich niedrigerer bzw. kein Anstieg der DHT induzierten APOD-Expression beobachtet. Dadurch lassen sich mit hoher Spezifität (93,3 %) und Sensitivität (100 %) gesunde, männliche Kontrollen und Individuen mit anderen Störungen der Geschlechtsentwicklung als AIS (wie beispielsweise Testosteronsynthesestörungen) von Individuen mit AIS unterscheiden. Außerdem zeigen diese funktionellen Untersuchungen, dass eine Gruppe von klinisch diagnostizierten AIS-Individuen, bei denen keine Mutation im AR-Gen nachgewiesen werden

kann, eine pathologische AR-Aktivität hat (Abbildung 2). Diese mutationsnegative Gruppe wird als AIS Typ 2 bezeichnet (Hornig et al., 2016b).



**Abbildung 2: DHT-abhängige, AR-induzierte APOD-mRNA-Expression (modifiziert nach Hornig et al., 2016b)**

Die DHT-abhängige, AR-induzierte APOD-mRNA-Expression (Transkription) ist dargestellt als APOD-mRNA-Expressionsverhältnis zwischen Ethanol- (EtOH) und DHT-behandelten GF. Der Cutoff-Wert, der die Grenze zu einer normalen APOD-Induktion bzw. AR-Aktivität darstellt ist gestrichelt angezeigt. Alle männliche Kontroll-GF (control GF) befinden sich oberhalb des Cutoff-Werts. Neben allen GF von mutationspositiven Individuen mit AIS (+AR mut) fällt ein Teil der klinisch diagnostizierten Individuen mit AIS, aber ohne identifizierte Mutation im AR-Gen (-AR mut), unterhalb des Cutoff-Werts (AIS Typ 2).

### 1.3.3 AIS Typ 2

Der funktionelle Nachweis des AIS Typs 2 deckt sich mit dem Ergebnis einer früheren Publikation, welche Fälle mit molekularen und klinischen AIS-Phänotyp in An- und Abwesenheit von Mutationen in der kodierenden Sequenz des AR-Gens beschreibt und die Hypothese aufstellt, dass andere molekulare Veränderungen zu AIS führen können (Holterhus et al., 2005). Denkbar ist, dass sich solche Veränderungen sowohl auf Ebene der AR-Transkription und Translation als auch auf Ebene der AR-Cofaktor- (Coregulatoren und mit dem AR interagierende Proteine) Interaktion abspielen.

Defekte in der post-transkriptionellen Regulation des AR vermögen die Androgenwirkung herabzusetzen. Eine Mutation im 5' untranslatierten Bereich (untranslated region, UTR) des AR-Gens kann zur Entstehung eines aberranten Startcodons und dadurch zur Expression eines kurzen Polypeptids führen, das störend auf die Translation einwirkt und die exprimierte



Menge an AR-Protein stark vermindert und dadurch zu einer reduzierten AR Funktion führt (Hornig et al., 2016a).

Posttranslational wird das AR-Protein einigen Modifikationen unterzogen, tritt mit einer Vielzahl von Cofaktoren in Wechselbeziehung und beeinflusst so die Transkription seiner Zielgene (Coffey und Robson, 2012; van de Wijngaart et al., 2012). Obwohl mehr als 300 verschiedenen AR-Coregulatoren und mit ihm interagierende Proteine bisher bekannt sind und ein Fall von Adachi et al. vorgestellt wurde, bei dem ein solcher Coaktivator-Defekt vorliegen könnte, wurden bisher keine Cofaktor-Mutationen identifiziert, die kausal mit einem AIS zusammenhängen (Gottlieb et al., 2012; Adachi et al., 2000; Mongan et al., 2015).

Ein genaues Verständnis über die gewebespezifischen Kontrollmechanismen der AR-Transkription in gesunden Zellen, trotz großer Anstrengung regulatorische Sequenzen im Promotor- und kodierenden Bereich zu identifizieren, fehlt bislang. Es sind einige Proteine bekannt, die am Promotorbereich des AR-Gens binden und dadurch die Transkription steigern (z. B. specific protein 1, Sp1) oder hemmen (z. B. p53-Protein) (Hunter et al., 2017). Keiner dieser Faktoren wurde aber mit einem AIS funktionell in Verbindung gebracht.

Eine weitere Möglichkeit die Transkription zu beeinflussen, stellt die Methylierung bestimmter DNA-Abschnitte im Promotorbereich des AR-Gens dar. Derartige Veränderungen können zur Reduktion bzw. Erliegen der AR-Expression führen und wurden bereits im Zusammenhang mit kastrationsresistenten Prostatakarzinomzellen beschrieben (Kinoshita et al., 2000).

### **1.4 Epigenetik**

Der Begriff Epigenetik wurde 1942 von Conrad Hal Waddington eingeführt und wurde von ihm definiert als Zweig der Biologie, der diejenigen Interaktionen zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, die zur Entstehung des Phänotyps führen (Dupont et al., 2009; Waddington, 1942). Im Lauf der Jahre unterlag die Definition mit steigenden Erkenntnissen im Bereich der Genetik einem stetigen Wandel und wurde spezifischer. Gegenwärtig wird Epigenetik definiert als die Veränderungen der Genexpression, die nicht durch eine Veränderung der DNA-Sequenz verursacht wurden und mitotisch und/oder meiotisch vererbbar sind. Epigenetischen Modifikationen, die zur Beeinflussung der Genexpression führen, umfassen u. a. verschiedene Histonvarianten, posttranslationale Modifikation am N-terminalen Ende von Histonen und Methylierung von DNA-Basen (Dupont et al., 2009).

### **1.4.1 DNA-Methylierung und Genexpression**

Die Methylierung bestimmter DNA-Bereiche ist ein wichtiger epigenetischer Mechanismus zur Hemmung der Genexpression (gene silencing) und spielt eine Rolle bei vielen physiologischen Prozessen, wie z. B. bei der genomischen Prägung (Imprinting), Inaktivierung des X-Chromosoms und Zelldifferenzierung (Ambrosi et al., 2017). Von Bedeutung ist diese Art der Genregulation auch in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Rett-Syndrom, dem Fragilen-X-Syndrom oder der Alzheimer Krankheit, sowie in der Tumorgenese und Tumorprogression (Machado et al., 2015; Jones und Laird, 1999).

DNA-Methylierung entsteht durch kovalente Bindung einer Methylgruppe am 5'-Kohlenstoffatom des Cytosins und findet sich fast ausschließlich an CpG-Dinukleotiden. In 60 % aller Transkriptionsstartpunkte bzw. Promotorregionen befinden sich Bereiche mit einer erhöhten Dichte an CpG-Dinukleotiden, die als CpG-Inseln (CpG island, CpGI) bezeichnet werden. Außerdem sind in unmittelbarer Nähe zu CpG-Inseln Bereiche mit einer kleinen Anzahl an CpG-Dinukleotiden (CpGI-shores) lokalisiert. Eine CpG-Hypermethylierung in diesen Regionen im Promotor- oder Enhancerbereich korreliert meist mit einer erniedrigten Transkription des entsprechenden Gens. Die dabei zugrunde liegenden Vorgänge umfassen für gewöhnlich die Anlagerung von Methyl-CpG binding domain proteins, Rekrutierung Histon-modifizierender Proteine und Chromatinkondensation, was schlussendlich die Bindung von Transkriptionsfaktoren behindert (Ambrosi et al., 2017; Jang et al., 2017).

## **1.5 Fragestellung**

Die durch den AR vermittelte Androgenwirkung ist entscheidend für die Entwicklung des männlichen inneren und äußeren Genitales. Störungen der Androgenrezeptorfunktion führen bei Individuen mit XY-Genotyp zum klinischen Bild der Androgenresistenz (AIS), wobei der Ausprägungsgrad abhängig von der Restfunktion des AR ist. Eine vollständige Endorganresistenz auf Androgene (CAIS) führt zur Entstehung eines komplett weiblichen Phänotyps und ist fast immer auf eine Mutation im AR-Gen zurückzuführen. Im Kontrast dazu variiert der Phänotyp bei klinisch diagnostizierter, partieller Androgenresistenz erheblich und es findet sich bei weniger als der Hälfte der Betroffenen eine ursächliche Mutation im AR-Gen

(Mongan et al., 2015).

Mithilfe des von der Kieler Arbeitsgruppe Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie etablierten APOD-Assays lässt sich ein Androgenrezeptordefekt funktionell nachweisen und ermöglicht die Diagnose AIS unabhängig von der Feststellung einer Mutation in der AR kodierenden Sequenz. Die dadurch identifizierte Subgruppe eines mutationsnegativen AIS (AIS Typ 2) weist darauf hin, dass auch andere molekulare Veränderungen zu AIS führen können (Hornig et al., 2016b) .

Eine mögliche Ursache könnten epigenetische Veränderungen im Promotorbereich des AR-Gens sein, die zur Hemmung der AR-Expression führen. Bei einem Teil von kastrationsresistenten Prostatakarzinomen wurde eine Reduktion der AR-Transkription durch DNA-Methylierung im AR-Promotorbereich festgestellt (Kinoshita et al., 2000). Vorstellbar wäre, dass dieser Mechanismus auch eine Rolle bei der Entstehung von AIS Typ 2 spielt.

Hieraus ergeben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen (im Folgenden ist von AR-mRNA-Expression/Expressionsmessungen anstatt von AR-mRNA-Transkription/Transkriptionsmessungen die Rede, da die in dieser Arbeit gemessenen mRNA-Konzentrationen nicht der unmittelbar transkribierten mRNA-Konzentrationen entsprechen):

- Lässt sich eine Reduktion der AR-mRNA-Expression in Genitalhautfibroblasten von Individuen mit AIS Typ 2 im Vergleich zu männlichen Kontrollen, die eine normale AR-Aktivität vorweisen, durch qPCR-Messungen feststellen?
- Finden sich epigenetische Veränderungen im Sinne einer DNA-Methylierung im Promotorbereich des AR-Gens bei AIS Typ 2?
- Führt eine erhöhte Methylierung im AR-Promotorbereich zu einer Reduktion der AR-mRNA-Expression?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 1:** Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	HeraCell150i CO2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Brutschrank mit Rotor	Hybaid Hybridisation oven	Biometra, Göttingen DE
Einkanal-Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Elektronische Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Elektrophoresekammer	Modell 41-2026	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, DE
Feinwaage	LC620P	Sartorius AG, Göttingen, DE
Geldokumentation	BioDocAnalyze Ti5	Biometra, Göttingen, DE
Heizplatte	VWR® advanced hotplate	VWR International, Radnor, USA
Spektralphotometer	NanoDrop® ND-1000 Spectrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop	n/a	Carl Zeiss , Oberkochen, DE
Mikrowelle	M500	Philips, Hamburg, Deutschland
Pyrosequenzierer	PyroMark® Q96 ID	Biotage, Uppsala, SE
qRT-PCR System	LightCycler® 480 II	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Schüttelwasserbad	Julabo SW 20	Julabo GmbH, Seelbach, DE
Schüttler	MS 3 basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE
Sicherheitswerkbank	GELAIRE® BSB 4A	Gelaire Pty Ltd, Sydney, AU
Spannungsquelle	Electrophoresis Powerpack	P24 Biometra, Göttingen, DE

Thermocycler	Eppendorf Mastercycler®	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Thermocycler	Thermocycler T3000 Biometra	Biometra, Göttingen, DE
Vakuum Arbeitsstation	Vacuum prep workstation	Biotage, Uppsala, SE
Vakuum Pumpe	Vacuum Pump	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA
Vakuum-Verteiler	Vac-Man®	Promega, Fitchburg, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Zählkammer	Neubauer-improved Marienfeld Superior	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen DE
Zentrifugen	AllegraC X-22R	Beckman Coulter, Brea, USA
	Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	Heraeus™ Megafuge™ 8	Fisher Scientific, Waltham, USA,
	VWR™ Galaxy Mini Microcentrifuge	VWR International, Radnor, USA

## 2.1.2 Chemiekalien

**Tabelle 2:** Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Biozym LE Agarose	Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Annealing Buffer	PyroMark® Annealing Buffer	Qiagen, Hilden, DE
Binding Buffer	PyroMark® Binding Buffer	Qiagen, Hilden, DE
Bromphenolblau	Bromphenolblau Na-Salz	Serva, Heidelberg, DE
Denaturierungslösung	NaOH, 0,2 M	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE

## Material und Methoden

Dihydrotestosteron	DHT, 0,1 M	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
DNA Längenmarker	TriDye100bp DNA Ladder	New England BioLabs, USA
Einfriermedium	Recovery Cell Culture Freezing Medium	Life Technologies™, Carlsbad, USA
Ethanol	Ethanol Absolut	J.T. Baker®, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Ethidiumbomide solution, 1 % (10mg/ml)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Fetales Kälberserum	FBS superior	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Glycerol	Glycerol 99 %	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Isopropanol Isopropanol	2-Propanol 99,9 % Chromasolv® Plus	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Laufpuffer	Ultra Pure 10x TBE Buffer	Life Technologies™, Carlsbad, USA
L-Glutamin	L-Glutamine 100x, 200 mM	Biowest, Nuaille, FR
Lyse Puffer	RLT Buffer	Qiagen, Hilden, DE
Methylierte Kontrolle	Human Methylation Controls, 100ng/μl	EpigenDx, Hopkinton, USA
Nährmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Life Technologies™, Carlsbad, USA
Natriumacetat	Natriumacetat, 3 M	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin	Penicillin/Streptomycin	Life Technologies™, Carlsbad, USA
Puffer	HEPES Buffer Solution, 1M	Life Technologies™, Carlsbad, USA

Streptavidin/Sepharose™	Streptavidin/Sepharose™ high performance	GE Healthcare, Chicago, USA
Trypsin	Trypsin-EDTA 10x	Biowest, Nuaille, FR
Wasser	Ampuwa	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg v.d.H., DE
Waschpuffer	TRIS-Acetat (pH 7,6) 10 mM	Merch, Darmstadt, Deutsch- land

### 2.1.3 Verbrauchsartikel

**Tabelle 3:** Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Verbrauchsartikel

Artikel	Bezeichnung	Hersteller
Einfriergefäße	Cryotubes Cryo S™ 2 ml	Greiner Bio-One Internatio- nal GmbH, Kremsmünster, AT
Klebefolie	Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Kulturflasche	TC-Flasche T25/T75/T175, Standard	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Objektträger	Objektträger (76x26mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Pasteurpipette	Assistent® Glaswarenfabrik	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, DE
PCR Platten	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	Roche Diagnostics, Mann- heim, DE
	Pyro Eppendorf twin.tec® PCR Plate 96 LoBind	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, DE
	Serological Pipette	Sarstedt, Nümbrecht, DE

Reagenzgefäße	0,2 ml Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reagenzgefäß	Reagenzgefäß, 1,5 ml/2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Sequenzierplatte	PSQ™ Plate 96	Biotage, Uppsala, SE
Transferpipette	Transferpipette, 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Röhre	Schraubbröhre 15 ml/50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturschale	TC-Schale 60, Standard	Sarstedt, Nürnberg, DE

## 2.1.4 Fertigsysteme („Kits“)

**Tabelle 4:** Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Kit-Systeme

Kit	Hersteller
EpiTect® Bisulfit Kit	Qiagen, Hilden, DE
Gentra® Puregene® Cell Kit	Quiagen, Hilden DE
Illustra Genomiphi V2 DNA Kit	GE Healthcare, Chicago, USA
PyroMark® Gold Q96 Reagents	Qiagen, Hilden, DE
PyroMark® PCR Kit	Qiagen, Hilden, DE
QuantiNova® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, DE
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden DE
Wizard® DNA Clean-Up System	Promega, Fitchburg, USA

## 2.1.5 Oligonukleotide

### 2.1.5.1 Primer für cDNA-Synthese

Die zur cDNA-Synthese verwendeten Primer sind Bestandteil des QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Deutschland) und setzen sich aus einer Mischung aus Oligo-dT-Primern und random Primern zusammen.



### 2.1.5.2 Primer für Quantitative real-time PCR

Die Primer für die qPCR wurden von Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen.

**Tabelle 5:** Bezeichnung und Sequenzen der verwendeten qPCR-Primer

Name	Vorwärtssequenz (5' → 3')	Rückwärtssequenz (5' → 3')
APOD	Betriebsgeheimnis von Qiagen	
AR	Betriebsgeheimnis von Qiagen	
SDHA	Betriebsgeheimnis von Qiagen	

### 2.1.5.3 Primer für Pyro-PCR

Die Primer für die Pyro-PCR wurden von biomers.net (Ulm, Deutschland) bezogen.

**Tabelle 6:** Bezeichnung und Sequenzen der verwendeten Pyro-PCR-Primer

Name	Sequenz Vorwärtsprimer (5' → 3'),	Sequenz Rückwärtsprimer (5' → 3')
ARprom1	TATTTTATAGATAGTTTATAGTT-GTAAAGT (5' biotin)	TCAC-CCAAACAAACAAATAAACACA
ARprom2	AGTAAGTATTTGTTGGTTT-GGTTATG (5' biotin)	CCAAATTTAATTCCAAAAC-CCAATCTA
ARprom3	AATTTTGGTAGTTAGGAG-TAGGT	CCAAATTTAATTCCAAAAC-CCAATCTA (5' biotin)
ARprom4	GTTGAGGGTTTTAGAG-TAAATGGT	CCATAACCAAACCA-ACAATACTTAC (5' biotin)
ARprom5	GGTTTTGGAATTAATTT-GGTGAGTG (5' biotin)	CCCCTACTT-CCTAAATAACTCCTAC
ARprom6	GGGTTTTTATAGGGTTAGAGT-TAG (5' biotin)	CTCCTTACCTCCACCTC

### 2.1.5.4 Primer für Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierprimer wurden von biomers.net (Ulm, Deutschland) bezogen.

**Tabelle 7:** Bezeichnung und Sequenzen der verwendeten Pyrosequenzier-Primer

Name	Primersequenz (5'→3')
ARprom1-seq	AAAAACACTTACGATATACACAT
ARprom2-seq	TACCAAAAATTCTTTTCAAACT
ARprom3-seq	TGGTAGTTAGGAGTAGGTA
ARprom4-seq	GGTTTTAGAGTAAATGGTATA
ARprom5-seq	CTACTTTCCTAAACCAAAT
ARprom6-seq	TAACTTTAAAAAACAATACTAAC

### 2.1.6 Software

**Tabelle 8:** Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Software

Software	Hersteller
biodocanalyze 2.2	Biometra, Göttingen, DE
GraphPad Prism, Version 5	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
LightCycler® 480 Software Version 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
PyroMark® CpG Software, Version 1.0.11	Qiagen, Hilden DE

### 2.1.7 Patientenkollektiv und vorausgegangene Experimente

Die Experimente zur Analyse von DNA-Methylierungen am Androgenrezeptorpromotor in kultivierten Genitalhautfibroblasten (GF) wurden von der Ethikkommission der Christian-zu-Albrechts-Universität Kiel bewilligt (AZ: D401/14) (Anhang 15). Die Verwendung der untersuchten GF zu Forschungszwecken erfolgte mit schriftlicher Einwilligung des jeweiligen Spen-

der-Individuums bzw. der Sorgeberechtigten, sowie mit vollständig anonymisierten GF (insbesondere aus GF-Pools kooperierender Labore). Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten GF wurden schlussendlich anonymisiert.

Als Grundlage dieser Arbeit dienen Experimente zum Nachweis eines Androgenrezeptordefekts mithilfe des APOD-Assays in kultivierten GF (Hornig et al., 2016b). Ein Teil der dabei untersuchten GF wurde für diese Arbeit in drei Gruppen eingeteilt. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 146 Fibroblastenkulturen (GF) untersucht. Die Gruppenzuordnung und die anatomische Herkunft der GF sowie die molekulargenetischen Analysen in zuvor durchgeführten Untersuchungen werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Die erste Gruppe (männliche Kontrollen) schließt GF aus Skrotalgewebebiopsien ein, die im Rahmen einer Vasektomie von fertilen männlichen Patienten mit normalem männlichem Habitus gewonnen wurden ( $n = 27$ ). Um den Bereich der unter 18-Jährigen mit zu erfassen wurden Skrotalgewebebiopsien von Patienten mit normalem äußeren Genitale verwendet, bei denen eine Orchidopexie aufgrund eines Malescensus testis durchgeführt wurde ( $n = 11$ ). Zusätzlich beinhaltet die erste Gruppe GF aus Vorhautbiopsien, die durch eine Zirkumzision aus religiösen/kulturellen Beweggründen oder aufgrund einer Phimose entnommen wurden ( $n = 10$ ). Bei allen Kontroll-GF, bis auf GF40, konnte mittels APOD-Assay eine normale AR-Aktivität nachgewiesen werden. GF40 wurde daraufhin, aufgrund einer fehlenden Mutation im AR-Gen, der Gruppe aus Individuen mit AIS Typ 2 zugeordnet.

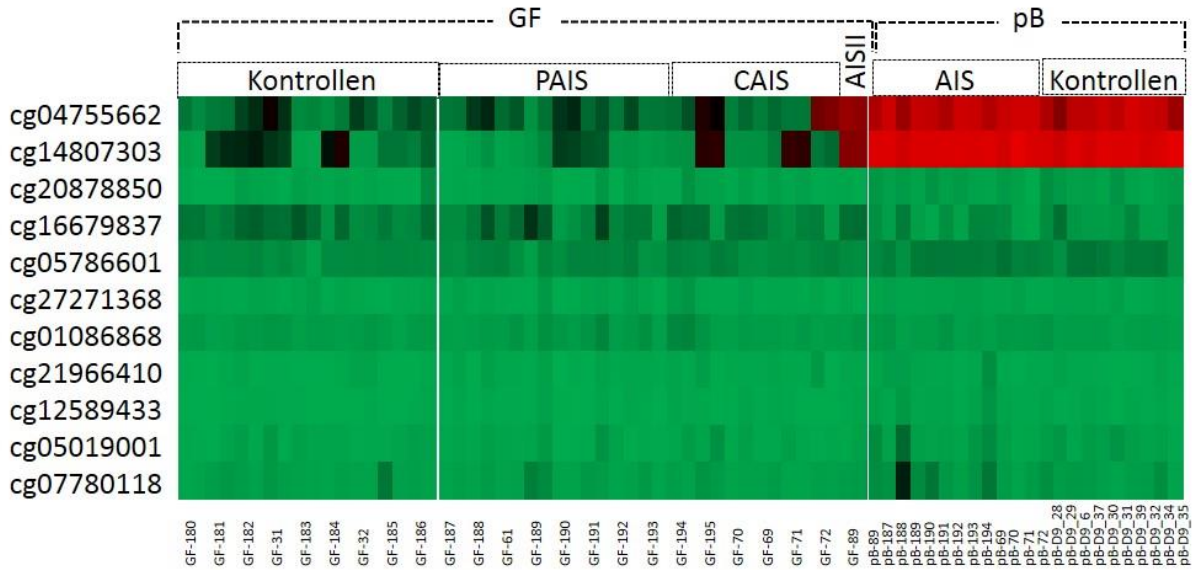
Die zweite Gruppe beinhaltet aus Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe- und Vorhaut-/Labia-minora-Gewebe entnommene GF mit einer genetisch gesicherten Diagnose einer Androgenresistenz durch eine Mutation in der kodierenden Sequenz des AR-Gens (CAIS:  $n = 16$ , PAIS:  $n = 17$ ).

Die dritte Gruppe umfasst GF aus Skrotal-/Labia majora-Gewebe und Vorhaut-/Labia-minora-Gewebe von Individuen mit 46 XY Karyotyp und einem klinischen (phänotypischen und hormonellen) Verdacht auf AIS, jedoch ohne molekulargenetischen Nachweis einer Mutation im AR-Gen ( $n = 65$ ). Die Gruppe schließt Individuen ohne Hinweis für eine gestörte Androgenbiosynthese ein und setzt sich aus GF mit einer mittels APOD-Assay nachgewiesenen normalen ( $n = 41$ ) bzw. pathologischen ( $n = 24$ ) AR-Aktivität zusammen (AIS Typ 2).

Genomische DNA aller Genitalhautfibroblasten aus allen Gruppen wurde vor Beginn dieser

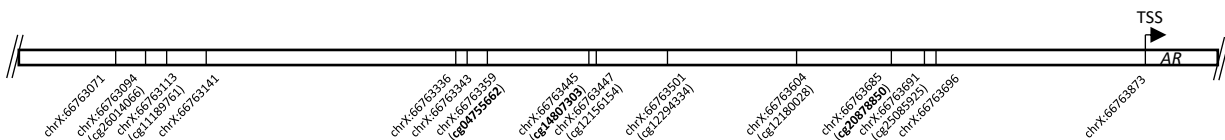
Arbeit mittels next generation sequencing (NGS) einer AR-angereicherten Sequenzierbibliothek (Haloplex, Agilent) sequenziert. Dadurch festgestellte Mutationen in der AR-kodierenden Sequenz wurden anschließend mittels Sanger-Sequenzierung validiert.

In einem weiteren, dieser Arbeit vorangegangenen Experiment wurde mithilfe eines Human-Methylation<sup>27</sup> DNA Analysis Bead Chip die Methylierung der proximalen AR-Promotor-Region von GF aus Skrotalgewebe von männlichen Kontroll-Individuen, mutationspositiven Individuen mit AIS sowie von einem Individuum mit AIS Typ 2 mit sehr niedriger AR-mRNA-Expression analysiert. Die Analyse zeigte, dass in den GF des Individuums mit AIS Typ 2 im Vergleich zu allen anderen GF zwei CpG-Dinukleotide, cg04755662 (Position: chrX:66,763,359) und cg14807303 (Position: chrX:66,763,445), stärker methyliert waren. Zusätzlich wurde das Methylierungslevel derselben Region in Blutproben von normalen, männlichen Kontroll-Individuen und Individuen mit AIS analysiert. Hier zeigte sich bei allen untersuchten Individuen ebenfalls eine hohe Methylierung von cg04755662 und cg14807303 (Abbildung 3) (Ammerpohl et al., 2013). Da die AR-mRNA-Expression in mononukleären Zellen des peripheren Blutes geringer als in GF ist (Silva et al., 2011) und aufgrund der Tatsache, dass in den GF mit niedriger AR mRNA Expression eine hohe Methylierung von cg04755662 und cg14807303 zu sehen war, wurde die Vermutung aufgestellt, dass eine Methylierung in der untersuchten Region und deren Umgebung in Zusammenhang mit einer erniedrigten AR-mRNA-Expression stehen könnte. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Pyrosequenzierungsassay etabliert, durch den insgesamt 14 CpG-Dinukleotide im proximalen Promotor-Bereich des AR-Gens (chrX:66763071 bis chrX:66763696) erfasst wurden (Abbildung 4) (Hornig et al., 2018).



**Abbildung 3: DNA-Methylierungsstatus-Heatmap des AR-Promotors (Ammerpohl et al., 2013)**

Die Zeilen repräsentieren die auf dem Human-Methylation27 DNA Analysis Bead Chip untersuchten CpG-Dinukleotide. In den Spalten ist der DNA-Methylierungsgrad in GF von 9 männlichen Kontrollen, 14 AR-Mutations-positiven AIS Individuen und einem AIS Typ 2 Individuum (Indexpatient GF89) dargestellt. Zusätzlich ist der DNA-Methylierungsgrad in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood, pB) des Indexpatienten (GF89), von Individuen mit mutationspositiven AIS und normalen, männlichen Kontrollen angezeigt. Ein hoher Methylierungsgrad entspricht einem roten Farbwert, ein niedriger Methylierungsgrad entspricht einem grünen Farbwert.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des proximalen AR Promotor-Bereichs (Hornig et al., 2018)**

Dargestellt sind die Positionen der durch den Bisulfit-Pyrosequenzierungsgassay erfassten CpG-Dinukleotide (CpG 1 befindet sich an Position chrX:66763071; CpG 14 befindet sich an Position chrX:66763696). Die auf dem Human-Methylation27 DNA Analysis Bead Chip analysierten CpG-Dinukleotide sind in Klammern fett markiert unter ihrer jeweiligen Position angegeben. Das CpG-Dinukleotid an Position chrX:66763873 war kein Bestandteil des Pyrosequenzierungsassays, da die umliegende DNA-Sequenz kein geeignetes Primer-Design für die Bisulfit-behandelte DNA ermöglichte. TSS steht für Transkriptionsstartpunkt (transcriptional start site).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Die Genitalhautfibroblasten wurden je nach Wachstumszustand in verschiedenen großen Kulturflaschen kultiviert. Das eingesetzte Volumen für die T175-Kulturflaschen betrug 20ml, für die T75-Kulturflaschen 10ml und für die T25-Kulturflaschen 5 ml. Bei schlechtem Wachstum, bzw. bei großem Zellverlust beim Auftauen, erfolgte eine Subkultivierung in die nächst kleinere Kulturflasche. Das Nährmedium setzte sich zusammen aus DMEM (Life Technologies™, USA), dem 10 % FBS (Biochrom GmbH, Deutschland), 20 mM HEPES Puffer (Life Technologies™, USA), 100 Units/ml Penicillin/Streptomycin (Life Technologies™, USA), sowie 2 mM L-Glutamin (Biowest, Frankreich) zugesetzt wurde. Die Zellkulturen wurden im Begasungsbrutschrank (Thermo Fisher Scientific, USA) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und abhängig vom Wachstum spätestens nach 4 Tagen mit neuem Nährmedium versorgt.

#### **2.2.1.1 Passagieren einer Zellkultur**

Bei einer Konfluenz der adhärennten Fibroblasten von 80 bis 100 % in einer T175-Kulturflasche erfolgte das Passagieren (splitten) der adhärennten Zellen. Zunächst wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS (Life Technologies™, USA) gespült und schließlich mit 1,5 ml Trypsin (Biowest, Frankreich) im Begasungsbrutschrank für max. 5 Minuten inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle, ob sich die Zellverbände von der Kulturflasche gelöst hatten, wurde die Zellen mit 20 ml Nährmedium resuspendiert, gleichmäßig in zwei Kulturflaschen ausgesät und auf 20ml Kulturmedium aufgefüllt. Die Passagenzahl änderte sich daraufhin um plus 1.

#### **2.2.1.2 Auftauen von Genitalhautfibroblasten**

Um die in flüssigem Stickstoff kryokonservierten Genitalhautfibroblasten in Kultur zu nehmen, wurde das entsprechende Einfriergefäß (Greiner Bio-One International GmbH, Österreich) einige Sekunden in einem 37 °C warmen Wasserbad geschwenkt und mit 1 ml Nährmedium aufgetaut. Die entstandene Zellsuspension wurde unmittelbar in eine mit 10 ml

Nährmedium gefüllte 15 ml Röhre überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (161 g). Der Überstand wurde abgesaugt und das übrig gebliebene Zellpellet mit Nährmedium resuspendiert und in einer Kulturflasche ausgesät.

### **2.2.1.3 Kryokonservierung von Genitalhautfibroblasten**

Zur Kryokonservierung der Genitalhautfibroblasten wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 bis 100 % (T175-Kulturflasche) mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1,5 ml Trypsin benetzt und für max. 5 Minuten inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle ob sich die Zellverbände von dem Kulturflaschenboden gelöst hatten, wurden die die Zellen in 10 ml Nährmedium resuspendiert und in eine 15 ml fassende Röhre überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation (161 g) bei Raumtemperatur und wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in Einfriermedium (Technologies™, USA) resuspendiert und in ein Einfriergefäß überführt. Das Einfriergefäß wurde sofort auf Trockeneis gestellt und bei ca. -80 °C für mind. 24 Stunden heruntergekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in Flüssigstickstoff bei ca. -196 °C.

### **2.2.2 APOD-Assay**

Der APOD-Assay wurde in geringerem Umfang im Rahmen dieser Arbeit angewendet. Da die dadurch gewonnen Erkenntnisse von grundlegender Bedeutung sind, wird das Verfahren im Folgenden beschrieben.

Mithilfe des APOD-Assays wird durch ein standardisiertes Verfahren die DHT-abhängige, AR-induzierte Expression des high-density lipoprotein Apolipoprotein D (APOD), als funktionelle Messgröße für die AR-Aktivität in kultivierten GF, bestimmt. Die hormonabhängige Induktion der Expression von Apolipoprotein D erfolgt dabei unter bestimmten Bedingungen. Zum einen werden GF in Nährmedium mit normalem Nährstoffangebot (ohne serum starvation, -SS) und zum anderen unter Nährstoffmangel (mit serum starvation, +SS) kultiviert. Der Entzug von Nährstoffen soll die GF im gleichen Zellzyklusstadium festhalten und so die Zellen synchronisieren (Hornig et al., 2016b).

Bei einer Konfluenz der kultivierten GF von 80-90 % wurden die Zellen von der Kulturflasche gelöst (siehe 2.2.1.1), in 20 ml Nährmedium resuspendiert und in eine 50 ml Röhre überführt. Als nächstes wurden zwei Zellsuspensionsansätze hergestellt. Der Ansatz in dem die

GF im weiteren Verlauf unter normalem Nährstoffangebot (- SS) kultiviert werden sollten, wurde mit einer Zellkonzentration von je  $5,5 \times 10^4$ /ml in vier Zellkulturschalen (Fassungsvermögen je 3 ml) ausgesät. Der Ansatz in dem die GF unter Nährstoffmangel (+ SS) kultiviert werden sollten, wurde mit einer Zellkonzentration von je  $4,5 \times 10^4$ /ml in drei Zellkulturschalen ausgesät. Zur Berechnung des benötigten Volumens an Zellsuspension für den jeweiligen Ansatz erfolgte die lichtmikroskopische Bestimmung der Zellkonzentration der Zellsuspension mittels einer Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Deutschland). Das berechnete Volumen an Zellsuspension wurde in die Zellkulturschalen überführt und ggf. mit Nährmedium auf ein finales Volumen von 3 ml pro Zellkulturschale aufgefüllt. Nach 24-stündiger Inkubation im Begasungsbrutschrank wurde der Zeitpunkt  $t_0$  festgelegt und die GF von einer der vier Zellkulturschalen (-SS) mit 600  $\mu$ l RLT Puffer (Quiagen, Deutschland) lysiert. Das Zelllysate wurde in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt und auf Trockeneis bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Bei allen restlichen Zellkulturschalen wurde die Zellkonfluenz dokumentiert und anschließend wurden die Zellen dreimal mit FBS freiem Nährmedium gewaschen. Für die GF, die unter Nährstoffentzug (+SS) wachsen sollten, wurden drei Nährmediumansätze hergestellt. Drei 50 ml Röhren wurden jeweils mit 10 ml Nährmedium, das mit Kohle-behandeltem, steroidfreiem, 0,1 % FBS angesetzt wurde, befüllt. Zu einem der drei Ansätze wurde 1  $\mu$ l DHT-Lösung (0,1 M DHT-Lösung in 100 % Ethanol) beigemischt. Zu einem anderen der drei Ansätze wurde 1  $\mu$ l 100 % Ethanol (EtOH) hinzugefügt. Dem dritten Ansatz wurde nichts zusätzlich beigemischt. Abschließend wurden 3 ml eines Ansatzes in jeweils eine der drei Zellkulturschalen überführt, die dann entsprechend ihres Inhalts gekennzeichnet wurden (Schale-1 =  $t_3$  +SS, Schale-2 =  $t_3$  + SS + EtOH, Schale-3 =  $t_3$  + SS + DHT).

Für die GF, die unter normalem Nährstoffangebot wachsen sollten, wurde analog verfahren, jedoch wurde das Nährmedium mit steroidfreiem, 10 % FBS angesetzt und dementsprechend gekennzeichnet (Schale 1:  $t_3$  -SS; Schale 2:  $t_3$  - SS + EtOH; Schale 3:  $t_3$  - SS + DHT). Die Zellkonfluenz wurde nach 72-stündiger Inkubation dokumentiert, (Zeitpunkt  $t_3$ ) die GF mit jeweils 600  $\mu$ l RLT Puffer lysiert und in 1,5 ml Reagenzgefäße überführt. Die Zelllysate wurden unmittelbar auf Trockeneis bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.



### 2.2.3 RNA-Extraktion und RNA-Quantifizierung

Für die RNA-Isolation aus Zelllysaten wurde das RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet und entsprechend dem Herstellerprotokoll verfahren.

Die Methode des Kit-Herstellers basiert dabei auf einer selektiven Adsorption der RNA an eine Silikagelmembran (Kieselgelmembran) in Kombination mit einer Mikrosäulenzentrifugation. Unter bestimmten Bedingungen (hohe Salzkonzentration, leicht saurer pH-Wert) und durch Zugabe von Ethanol zu den Zelllysaten, haften sich RNA-Moleküle an die Silikamembran. Natriumionen dienen dabei als Kationen-Brücke zwischen den negativ geladenen Sauerstoffionen der Silikamembran und dem negativ geladenen Phosphatgerüst der RNA (Tan und Yiap 2009; RNeasy® Mini Handbook). In darauffolgenden, mehreren Waschvorgängen wird die RNA von Verunreinigungen befreit und die gereinigte RNA wird im letzten Reaktionsschritt mit deionisiertem Wasser von der Silikamembran eluiert. Die RNA-Lösungen wurden bei -60 °C gelagert.

Die Konzentration und der Reinheitsgrad einer RNA-Lösung wurden durch UV/VIS-Spektrophotometrie-Messungen an einem Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) ermittelt. Bei diesem Verfahren wird die optische Dichte (OD) der RNA bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessen und in Absorptionseinheiten (A) umgerechnet. Die RNA-Konzentration wird anhand der optischen Dichte bei 260 nm Wellenlänge berechnet. Eine Absorptionseinheit entspricht dabei 40 µg Einzelstrang-RNA/ml. Bei keiner Verunreinigung durch DNA-Moleküle sollte der Quotient von OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> größer gleich 2 betragen. Als Maß für die Beurteilung der Reinheit dient der Quotient der gemessenen optischen Dichten (OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>230nm</sub> bzw. A<sub>260nm</sub>/A<sub>230nm</sub>). Dieser soll nahe bei 1,8 liegen. Eine Verschiebung zu kleineren Werten entspricht einer Verunreinigung mit Proteinen und Salzen.

Für die Leermessung wurden 2 µl H<sub>2</sub>O (blank) und zur Konzentrationsbestimmung jeweils 2 µl der RNA-Lösungen eingesetzt.

### 2.2.4 cDNA-Synthese

Ein Meilenstein auf dem Weg zur Quantifizierung der Transkription bzw. mRNA-Expression eines Gens war die Entdeckung der Reversen Transkriptase und der daraus abgeleiteten in vitro Synthese von cDNA aus mRNA (Baltimore, 1970; Efstratiadis et al., 1976; Temin und

Mizutani, 1970; Verma et al., 1972). Als Abbild des extrahierten RNA-Pools, genauer gesagt des mRNA-Pools (Transkriptom), nimmt die cDNA als Ausgangsmaterial für die Durchführung von Gen-Expressionsanalysen eine Schlüsselposition ein.

Für die Quantifizierung der Expression des Apolipoprotein D-Gens und des Androgenrezeptorgens via quantitative Echtzeit-PCR wurde die aus der Zellkultur extrahierten mRNA mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, nutzt dabei die RNA als Matrize zur Synthese der cDNA.

Der Vergleich von Transkriptions- bzw. Expressionsanalysen verschiedener Proben ist abhängig von der Effizienz der cDNA-Synthese den mRNA-Pool vollständig zu repräsentieren. Dabei spielt sowohl die Wahl der verwendeten Primer, als auch der Einsatz gleicher RNA-Quantitäten eine Rolle (Stahlberg et al., 2004). Für die cDNA-Synthese wurden in dieser Arbeit normalerweise einheitliche RNA-Konzentrationen eingesetzt. War dies aufgrund einer geringen RNA-Ausbeute nach der Extraktion aus den GF nicht möglich, wurde die qPCR mit einer entsprechend angepassten, größeren Menge an cDNA angesetzt.

Die Auswahl der Primer, welche die Reverse Transkriptase als Startpunkt für die cDNA Synthese nutzt, spielt eine wichtige Rolle in wie weit die synthetisierte cDNA den RNA-Pool wiedergibt. Genspezifische Primer führen zur Synthese einer spezifischen cDNA und erhöhen dadurch die Empfindlichkeit einer qPCR, indem auch die mRNA eines schwach exprimierten Gens effizient amplifiziert wird. Allerdings ist die Verwendung von genspezifischen Primern oft nicht ideal, da Ziel- und Kontrollgen nicht aus dem gleichen cDNA-Pool analysiert werden können. Für jedes zu untersuchende Gen müsste erneut cDNA synthetisiert werden (Bustin et al., 2005; Wong und Medrano, 2005). Oligo-dT-Primer binden spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA und führen zur Synthese von cDNA, die den mRNA-Pool relativ gut widerspiegelt. Der Poly-A-Schwanz wird bereits in der Zelle durch Polydeadenylylation degradiert, sodass mitunter mRNA extrahiert wird, die keinen (intakten) Poly-A-Schwanz besitzt. Dieser Umstand begrenzt den Einsatz dieser Primer auf vollständig intakte mRNA-Moleküle (Bustin et al., 2005; Wu und Brewer, 2012).

Random-Primer binden an viele, zufällig ausgewählte RNA-Sequenzen. Diese Primer sind in der Lage an mRNA zu binden, deren Poly-A Schwanz bereits degradierte ist. Ein Nachteil ist, dass sowohl ein eher unspezifischer cDNA-Pool, als auch mehr als eine Kopie pro mRNA hergestellt werden (Bustin et al., 2005). Die in dieser Arbeit synthetisierte cDNA wurde auch für

Expressionsanalysen anderer Gene, beispielsweise des APOD-Gens, herangezogen. Der hergestellte cDNA-Pool sollte das Transkriptom der kultivierten GF möglichst vollständig repräsentieren. Aus diesem Grund wurde für die cDNA-Synthese eine Mischung aus Oligo-dT-Primern und Random-Primern verwendet um die Vorteile beider Primer zu nutzen.

Zur cDNA-Synthese wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Deutschland) verwendet und entsprechend dem Herstellerprotokoll verfahren. Typischerweise wurden 500 ng RNA für die cDNA-Synthese verwendet. Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

### **2.2.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion**

#### **2.2.5.1 Prinzip der Quantitativen Echtzeit-PCR**

Zur Analyse der relativen mRNA-Expression des Androgenrezeptorgens und der Induktion der Expression des Apolipoprotein D-Gens durch vorherige Behandlung mit Androgenen wurde auf die Methode der quantitativen-Echtzeit-PCR zurückgegriffen. Basierend auf dem Prinzip der konventionellen PCR, ermöglicht die qPCR (quantitative polymerase chain reaction) zusätzlich, neben der Amplifikation beliebiger DNA-Abschnitte, die Quantifizierung der amplifizierten DNA in Echtzeit (Higuchi et al., 1992, 1993). Die herkömmliche PCR beruht auf der enzymatischen Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988, 1985). Zwei Oligonukleotid-Primer legen dabei den spezifischen DNA-Abschnitt fest, indem sie jeweils an das 3'-Ende der Einzelstränge komplementär hybridisieren. Der PCR-Prozess läuft dabei in mehreren, sich wiederholenden Zyklen ab.

Um eine ausreichend hohe Spezifität der qPCR zu erreichen, die eine verlässliche Expressionsanalyse ermöglicht, müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden.

Während des Erhitzens des PCR-Reaktionsgemisches im ersten Reaktionszyklus begünstigen niedrigere Temperaturen die Entstehung von Primer-Dimeren sowie Fehlpaarungen der Primer mit der DNA-Matrize. Da die DNA-Polymerase auch bei niedrigen Temperaturen eine gewisse Aktivität aufweist kann es dadurch zu einer Amplifikation unspezifischer Nebenprodukte kommen. Um die Erzeugung unerwünschten Reaktionsprodukte zu reduzieren, wurden Methoden entwickelt, die als Hot-Start-PCR bezeichnet werden und darauf abzielen die

DNA-Polymerase-Aktivität solange zu blockieren, bis die gewünschte Denaturierungstemperatur der PCR erreicht ist (Paul et al., 2010). In dieser Arbeit wurde ein Hot-Start-PCR-Verfahren angewandt, in welchem die Polymerase-Aktivität bei niedrigen Temperaturen durch Antikörper blockiert wurde, um eine vorzeitige, unspezifische Amplifikation zu verhindern. Die Antikörper dissoziieren hierbei, vor Beginn des ersten PCR-Schritts, erst bei Erreichen der Denaturierungstemperatur (sog. Initialisierung) von der Polymerase (Mizuguchi et al., 1999). Während des ersten Schritts eines PCR-Zyklus, der DNA-Denaturierung, trennen sich die zwei DNA-Einzelstränge voneinander, um bei der sich anschließenden Primerhybridisierung (annealing) die Anlagerung spezifischer Primer zu ermöglichen. Der letzte Schritt eines Zyklus besteht aus der Elongation, wobei es durch die hitzestabile DNA-Polymerase zur Synthese eines neuen, an den Primern beginnenden, Einzelstrangs kommt.

Weiterhin kann es zur Amplifikation unerwünschter/unspezifischer Nebenprodukte kommen, wenn die verwendete cDNA mit genomischer DNA (gDNA) kontaminiert ist (Bustin, 2000). Durch den Einsatz von sowohl gDNA Wipeout Buffer (Qiagen, Deutschland) während der cDNA-Synthese als auch von Intron-überspannenden Primern während der qPCR, wurde die Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen. Zusätzlich wurden in jeden PCR-Lauf Negativkontrollen, die keine cDNA enthielten, einbezogen, um alle restlichen Reaktionssubstrate auf eine Kontamination und unspezifische Amplifikation zu überprüfen.

Die Möglichkeit zur Quantifizierung der DNA-Menge während der Amplifikation wird bei der qPCR mithilfe von Fluoreszenzmessungen realisiert. Ein Fluoreszenzfarbstoff interkaliert dabei in die DNA-Doppelhelix und erzeugt einen Fluoreszenzfarbstoff-DNA-Komplex, der ein spezifisches Absorptions- und Emissions-Maximum hat. Nach optischer Anregung des Komplexes kann die Fluoreszenz am Ende der Elongationsphase, wenn im jeweiligen Zyklus die erreichte Menge an doppelsträngiger DNA vorliegt, detektiert und gemessen werden. Durch Messung der Fluoreszenz, die in der exponentiellen Phase der PCR proportional zur Menge an PCR Produkten ansteigt, kann die amplifizierte DNA-Menge quantitativ erfasst werden. Da freie Farbstoffmoleküle in geringem Umfang eine Hintergrundfluoreszenz aussenden, kann sich die Fluoreszenz des Farbstoff-DNA-Komplexes erst ab einem bestimmten Schwellenwert in einem bestimmten Zyklus, dem  $C_p$ -Wert (crossing point), von diesem Hintergrundrauschen absetzen. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals nimmt bei einem späteren Zeitpunkt der PCR ab und sistiert in den letzten Zyklen, da die Substrate des Reaktionsansatzes, z. B. Nukleotide, Primer, etc., verbraucht sind und es zu Akkumulation von Endprodukten

(amplifizierter DNA-Abschnitt, Pyrophosphat) kommt.

Um die mRNA-Expression des Ziel-Gens von verschiedenen DNA-Proben vergleichen zu können und mögliche Abweichungen in der Ausgangsmenge der extrahierten und in cDNA umgeschriebenen RNA auszugleichen, wurde eine relative Quantifizierungsstrategie durch Normierung gegen ein ausgewähltes Referenz-Gen gewählt. Für das Referenz-Gen wurde ein Haushaltsgen (housekeeping gene) verwendet, welches konstant und unabhängig vom Zellzyklus und äußeren Einflüssen exprimiert wird. Hierfür wurde das im Glukose-Stoffwechsel beteiligte Gen SDHA (Succinatdehydrogenase complex, subunit A) ausgewählt.

Da auch unspezifische PCR-Produkte wie Primer-Dimere den Fluoreszenzfarbstoff einlagern und ein Fluoreszenzsignal abgeben können, schließt sich jedem PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse an. Anhand dieser kann die Spezifität der Amplifikate bestimmt werden. Bei kontinuierlicher Temperaturerhöhung und simultaner Fluoreszenzmessung trennen sich die DNA-Doppelstränge bei einer für das spezifische Amplifikat (PCR-Produkt) charakteristischen Temperatur ( $T_m$  = melting temperature). Ab dieser Temperatur löst sich der Fluoreszenzfarbstoff-DNA-Komplex auf und das für ihn charakteristische Fluoreszenzsignal fällt ab. Weiterhin wird, um eine Kontamination des Primerreagenz mit Nukleinsäure auszuschließen, zusätzlich ein PCR Ansatz ohne Hinzugabe von Nukleinsäure analysiert. Hierbei sollte sich im Normalfall, sprich keiner Kontamination des Primerreagenz, kein Fluoreszenzsignal detektieren lassen.

### 2.2.5.2 Durchführung

Verwendet wurde das QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Deutschland) und als Thermozykler der LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics, Deutschland). Zuerst wurde ein Master-Mix mit der entsprechenden cDNA-Lösung angefertigt.

**Tabelle 9:** qPCR Master-Mix je Reaktionsansatz

Volumen	Komponente
10 µl	SYBR Green PCR Mix
7,5 µl	H <sub>2</sub> O
0,5 µl	cDNA (250ng/µl)

Da die Quantifizierung der Ziel- und Referenz-Gen-mRNA-Expression jeweils im Doppelsatz erfolgte, wurde der Mastermix in 4,5-facher Menge hergestellt. Die cDNA und der SYBR Green PCR Mix wurden auf Eis aufgetaut und der Mastermix jeweils in einem 1,5 ml Reagenzgefäß zusammen pipettiert und kurz abzentrifugiert. Jeweils 18 µl Master-Mix wurden in die Vertiefungen (engl. wells) der PCR-Platte (Roche Diagnostics, Deutschland) überführt. Zur Kontrolle, ob der SYBR Green PCR Mix oder der Primer Mix frei von Kontaminationen war, wurden zusätzlich zwei Master-Mix-Ansätze angefertigt, in denen die cDNA mit Wasser ersetzt wurde. Zu jedem vorgelegten Master-Mix wurden 2 µl AR- bzw. SDHA-Primer Mix hinzugefügt. Die PCR-Platte wurde mit einer durchsichtigen Klebefolie abgedichtet und bei Raumtemperatur für 1 min bei 900 g zentrifugiert. Abschließend wurde die PCR-Platte in den LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics, Deutschland) überführt und das PCR-Programm gestartet.

**Tabelle 10:** qPCR Protokoll für AR- und APOD-mRNA-Expressionmessung

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initialisierung	15 min	95 °C	
Denaturierung	15 s	94 °C	38
Primer-annealing	30 s	55 °C	
Elongation	30 s	72 °C	
Schmelzkurvenanalyse	bis 95 °C	Temperaturanstieg 0,29 °C/s	

### 2.2.5.3 Statistische Analyse der qPCR

Die qPCR zur Quantifizierung der mRNA-Expression des AR-Gens wurde nach der  $\Delta C_t$ -Methode (hier  $\Delta C_p$ -Methode) ausgewertet. Die  $C_p$ -Werte wurden von der LightCycler®-Software (LightCycler® 480 Software Version 1.5) automatisiert ermittelt. Die Berechnung der relativen AR-mRNA-Expression erfolgte durch Anwendung der Formel  $2^{-\Delta C_p}$ , wobei  $\Delta C_p$  die Differenz zwischen den Mittelwerten der AR- und SDHA-mRNA-Expression darstellt und als Normierung bezeichnet wird (Livak & Schmittgen, 2001):

1. Normierung

$$\Delta C_p = MW C_p (AR) - MW C_p (SDHA)$$

2. Relative AR-mRNA-Expression

$$2^{-\Delta C_p}$$

Die qPCR-Daten des APOD-Assays wurden unter Verwendung der Formel  $2^{-\Delta\Delta C_p}$  analysiert (Livak & Schmittgen, 2001). Zuerst wurden die von der LightCycler®-Software quantifizierten CP-Werte der Doppelansätze gemittelt. Im Anschluss erfolgte die Normierung durch Berechnung der Differenz aus der Quantität der jeweiligen APOD-mRNA-Transkripte und des SDHA-mRNA-Transkripts ( $\Delta C_p$ ). Basierend auf den unterschiedlichen Parametern des APOD-Assays (Nährstoffangebot, Zugabe von DHT, Zugabe von Ethanol, unbehandelter Ansatz) wurde insgesamt sechs  $\Delta C_p$  berechnet. Die relative APOD-mRNA-Expression zum Zeitpunkt t3 und dem zusätzlichem Parameter X (DHT, EtOH, kein Zusatz) wurde berechnet, indem die normierten APOD-mRNA-Expressionsquantitäten zum Zeitpunkt t3 und dem jeweiligen Parameter gegen die normierte APOD-mRNA-Expressionsquantität zum Zeitpunkt t0 kalibriert wurden.

Auf Grundlage dieser Berechnungen wurde das Verhältnis zwischen der DHT- und EtOH-induzierten APOD-mRNA-Expression sowohl bei Nährstoffmangel (+SS) als auch bei normalem Nährstoffangebot (-SS) berechnet:

1. Normierung:

$$\Delta C_p = MW C_p (APOD - \text{Zeitpunkt } t_x, \text{ Parameter } X) - MW C_p (SDHA)$$

2. Relative APOD-mRNA-Expression:

$$2^{-\Delta\Delta C_p} = 2^{-(\Delta C_p \text{ Zeitpunkt } t_3, \text{ Parameter } X - \Delta C_p \text{ Zeitpunkt } t_0)}$$

3. DHT-induzierte APOD-Expression (Bsp.: Normales Nährstoffangebot = -SS):

$$2^{-(\Delta C_p (\text{Zeitpunkt } t_3, -SS, +DHT) - \Delta C_p \text{ Zeitpunkt } t_0)} / 2^{-(\Delta C_p (\text{Zeitpunkt } t_3, -SS, +EtOH) - \Delta C_p \text{ Zeitpunkt } t_0)}$$

## 2.2.6 DNA-Extraktion und DNA-Quantifizierung

Zur DNA-Extraktion aus den Zellkulturen wurde das Gentra® Puregene® Cell Kit (Qiagen, Deutschland) verwendet. Das Herstellerprotokoll wurde modifiziert angewandt und wird im Folgenden wiedergegeben.

Bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % der adhärenen Fibroblasten in einer T175 Zellkulturflasche wurde wie beim Passagieren einer Zellkultur vorgegangen (siehe 2.2.1.1). Jedoch wurde das Zellpellet nicht in Nährmedium resuspendiert, sondern zweimal mit PBS gewaschen, anschließend an jeden Waschvorgang für fünf Minuten bei RT zentrifugiert (161 g) und der Überstand jeweils verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 800 µl Cell Lysis Solution (Quiagen, Deutschland) resuspendiert und in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt. Das Zellysate wurde für 16 bis max. 72 Stunden bei 37 °C rotierend inkubiert. Als nächstes wurden 4 µl RNase A Solution (Quiagen, Deutschland) hinzu pipettiert und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Danach wurden 270 µl Protein Precipitation Solution (Quiagen, Deutschland) hinzugefügt, das Reagenzgefäß eine Minute auf dem Vortexmischer geschüttelt und für 15 Minuten auf Eis gelagert. Die kalte Lösung wurde bei RT 15 Minuten zentrifugiert (2300 g), der Überstand in ein neues Reagenzgefäß überführt und nochmals bei RT 20 Minuten zentrifugiert (2300 g). Zur Fällung der DNA wurde der Überstand erneut in ein neues Reagenzgefäß pipettiert und 1 ml Isopropanol hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation (3300 g) bei RT für 30 Minuten wurde der Überstand verworfen, das verbliebene DNA-Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und schließlich bei RT zehn Minuten zentrifugiert (3300 g). Nachdem der Überstand dekantiert wurde, trocknete das DNA-Pellet für ca. eine Stunde bei RT und wurde abschließend mit einer der Pelletgröße entsprechenden Menge RNase-freiem Wasser für mindestens 16 Stunden bei RT gelöst. Die DNA-Lösung wurde im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die DNA-Quantifizierung erfolgte entsprechend der RNA-Quantifizierung (2.2.3) durch Messung der optischen Dichte der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm oder 280 nm. Eine Absorptionseinheit entspricht dabei 50 µg Doppelstrang-DNA/ml. Ein hoher Reinheitsgrad der DNA-Lösung liegt vor, wenn der Quotient der gemessenen optischen Dichten ( $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  bzw.  $A_{260nm}/A_{280nm}$ ) nahe bei einem Wert von 1,8 liegt. Eine Verschiebung des Quotienten 260/280 zu kleineren Werten entspricht einer Verunreinigung mit Proteinen und Salzen.



## **2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese**

### **2.2.7.1 Prinzip**

Zur Kontrolle der DNA-Integrität erfolgte eine Qualitätsanalyse der aus GF extrahierten DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese. Diese Methode beruht darauf, DNA-Moleküle, die in wässriger Lösung durch ihre Phosphatgruppen insgesamt negativ geladen sind, in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe zu separieren. Agarose, ein Polysaccharid aus glykosidisch verknüpfter  $\beta$ -D-Galaktose und 3,6-Anhydro- $\alpha$ -L-Galactose, bildet zusammen mit einer ionischen Pufferlösung (Elektrophoresepuffer) ein Gel, das als DNA-Trägermedium dient. Die Agarosepolymere lagern sich zu Faserbündeln zusammen, die ein dreidimensionales Netzwerk mit unterschiedlich großen Poren bilden. Das Trennvermögen eines Agarosegels für Makromoleküle wie DNA wird durch dessen Porengröße bestimmt, diese wiederum wird durch die Agarosekonzentration beeinflusst. Größere DNA-Fragmente, oder auch genomische DNA, lassen sich gut in niedriger konzentrierten Gelen auftrennen. Für kleinere DNA-Fragmente verwendet man höhere Agarosekonzentrationen. Durch Zugabe des Farbstoffes Ethidiumbromid, der zwischen die Basen der DNA interkaliert und unter ultraviolettem Licht (UV) fluoresziert, kann DNA im Gel sichtbar gemacht werden.

### **2.2.7.2 Durchführung**

Zur Herstellung eines 1 % Agarosegels wurden 200 ml 1x TBE-Puffer (Invitrogen, USA) mit 2 g Agarose (Biozym Scientific GmbH, Deutschland) in einer Mikrowelle aufgekocht, kurz unter kaltem Wasser abgekühlt und 10  $\mu$ l Ethidiumbromid (10mg/ml Ethidiumbromidlösung) hinzupipettiert. Zur Herstellung des Ladepuffers wurden 0,125 g Bromphenolblau (Serva, Deutschland) mit 28,7g Glycerol (Sigma-Aldrich®, Deutschland) vermischt und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 ml aufgefüllt. Das noch flüssige Agarosegel wurde in einen Gelträger gegossen, mit einer Probetaschablone versehen und bei Raumtemperatur zum Aushärten stehen gelassen. Das erkaltete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer (PEQLAB Biotechnologie, Deutschland) transferiert, die Probetaschablone entfernt und mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Jeweils 3  $\mu$ l der extrahierten DNA-Proben wurden mit 2  $\mu$ l Ladepuffer versetzt und damit die Probetaschen beladen. Als Längenstandard wurde 6  $\mu$ l TriDye 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs, USA) verwendet. Die Elektrophorese

wurde bei einer elektrischen Feldstärke von 5 bis 8 V/cm durchgeführt und dauerte ca. 30 Minuten. Zur Auswertung wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und unter UV-Licht im BioDoc Analyzer (Biometra, Deutschland) mit zugehöriger Software (BioDoc Analyse 2.2) visualisiert und fotografiert. Nicht degradierte DNA stellte sich als eine klar abgrenzbar fluoreszierende Bande dar. Degradierete DNA hingegen fluoreszierte verschmiert über die Auftragsspur.

### **2.2.8 Herstellung von WGA**

Zur Qualitätsüberprüfung der Methylierungsanalyse ist neben einer Negativkontrolle (Wasser) und einer vollständig methylierten DNA-Kontrolle (MK = Methylierte Kontrolle), eine unmethylierte DNA-Kontrolle erforderlich. Um diese unmethylierte DNA herzustellen, werden sog. genomweite Amplifikationsverfahren (WGA = whole genome amplified) angewandt (Hawkins et al. 2002). Für das hierzu ausgewählte Verfahren wurde das Illustra Genomiphi V2 DNA Kit (GE Healthcare, USA) verwendet und gemäß Herstellerprotokoll verfahren. Das Prinzip hierbei beruht darauf, dass durch eine PCR unter Einsatz von random Hexamer-Primern, die an möglichst vielen, zufällig ausgewählten Stellen komplementär an einen DNA-Einzelstrang binden, die genomische Quell-DNA amplifiziert wird. Da während der PCR-Reaktion sämtliche DNA-Methylierungen gelöscht werden, erhält man am Ende ein unmethyliertes PCR-Produkt. Als genomische Quell-DNA wurde die extrahierte DNA aus jeweils zehn männlichen und weiblichen Individuen verwendet.

Anschließend wurde die amplifizierte genomische DNA unter Verwendung des Wizard® DNA Clean-Up Systems (Promega, USA) mittels Vakuumverfahren gemäß Herstellerprotokoll gereinigt.

Die DNA-Konzentration wurde mittels UV/VIS-Spektralphotometrie (PEQLAB, Deutschland) gemessen (siehe 2.2.5). Bei noch vorhandenen Verunreinigungen der DNA-Lösung schloss sich eine alkoholische DNA-Fällung an. Die DNA-Lösung wurde mit einem Zehntel Volumen einer 4 °C kalten 3 M Stammlösung Natriumacetat (pH 4,8) versetzt und 100 µl 100 % Ethanol hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei RT wurde der Präzipitationsansatz für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (21.000 g). Der Überstand wurde dekantiert und das Nukleinsäurepellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation

bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und das Sediment 25 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die DNA mit 20 µl Wasser gelöst und erneute die Konzentration und der Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung bestimmt. Die somit erhaltene WGA-Kontrolle wurde bei -20 °C gelagert.

### **2.2.9 Bisulfit-Methode**

#### **2.2.9.1 Prinzip**

Eine Methode zur Detektion von methylierten CpG-Dinukleotiden beruht auf einem von Frommer et al. entwickelten Verfahren zur Identifikation von 5-Methylcytosinen durch DNA-Sequenzierung, welches sich die Natriumbisulfit-(Natriumhydrogensulfit) induzierte Modifikation der DNA-Sequenz zunutze macht (Frommer et al., 1992). Das grundlegende Prinzip dieser Methode ist, dass ein unmethyliertes Cytosin durch Reaktion mit Bisulfit zu Uracil konvertiert wird (Hayatsu et al., 1970; Shapiro und Weisgras, 1970; Wang et al., 1980). Die chemische Reaktion läuft dabei in drei aufeinander folgenden Schritten ab. Durch nukleophile Addition eines Bisulfitions entsteht Cytosin-Sulfonat (Sulfonierung), welches durch hydrolytische Desaminierung zu Uracil-Sulfonat reagiert und im alkalischen Milieu schließlich zu Uracil desulfoniert wird (Abbildung 5). Methyliertes Cytosin (5-Methylcytosin) hingegen bleibt durch eine Behandlung mit Natriumbisulfit weitgehend unverändert (Clark et al., 1994).

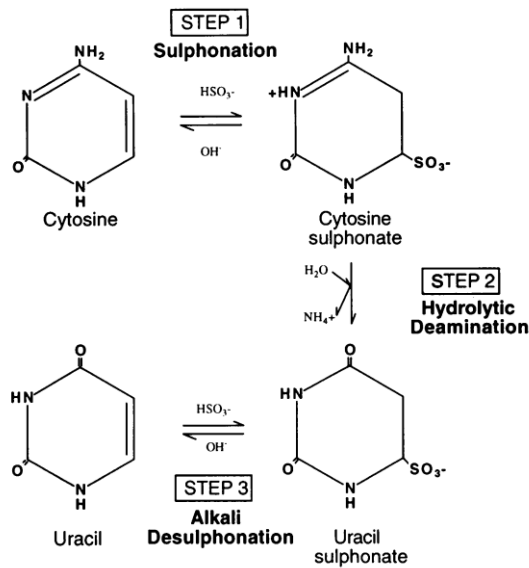


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konversion (Clark et al., 1994)

### 2.2.9.2 Durchführung

Für die Bisulfit-Konversion und die Aufreinigung der konvertierten DNA wurde das EpiTect® Bisulfit Kit (Qiagen, Deutschland) verwendet und gemäß Herstellerprotokoll angewandt. Als spätere Kontroll-Proben wurden WGA und MK (EpigenDx, USA) ebenfalls mit Natriumbisulfit behandelt. Es wurden 1000 ng DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt.

Tabelle 11: Bisulfit-Konversion Programm

Programmschritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung	5 min	95 °C
Inkubation (Bisulfit-Reaktion)	25 min	60°C
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation (Bisulfit-Reaktion)	85 min	60°C
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation (Bisulfit-Reaktion)	175	60°C
Pause	unbegrenzt	20 °C

## 2.2.10 Pyro-PCR

### 2.2.10.1 Prinzip

Im nächsten Schritt wurde die mit Natriumbisulfit-behandelte, genomische DNA mittels PCR amplifiziert.

Infolge der Bisulfit-Reaktion liegen zwei nicht mehr zueinander komplementäre DNA-Einzelstränge vor, da es aufgrund der Konversion von unmethyliertem Cytosin zu Uracil zu keiner komplementären Basenpaarung mit Guanin kommt. Uracil paart sich, wie Thymin, komplementär zu Adenin. Durch Amplifikation der zu untersuchenden Bereiche innerhalb der Bisulfit-behandelten DNA werden schlussendlich die zu Uracil konvertierten, ursprünglich unmethylierten Cytosine in Form von Thyminen amplifiziert. Hingegen werden die nicht konvertierten, methylierten Cytosine als Cytosine amplifiziert (Frommer et al., 1992).

Um den für die Pyrosequenzierung benötigten Matrizenstrang später isolieren zu können, wird ein am 5'-Ende biotinylierter Primer für die Synthese dieses DNA-Einzelstrangs verwendet.

### 2.2.10.2 Durchführung

Zur Herstellung des Reaktionsgemischs wurde das PyroMark® PCR Kit (Qiagen, Deutschland) verwendet. Insgesamt wurden sechs Primerpaare eingesetzt um die durch den Pyrosequenzierungsassay erfassten Bereiche abzudecken. Zuerst wurde für jedes der sechs Primerpaare ein Reaktionsansatz in einem 1,5 ml Reagenzgefäß angefertigt und gut gemischt.

**Tabelle 12:** Reaktionsansatz Pyro-PCR

12,5 µl	PyroMark® PCR Master Mix
2,5 µl	CoralLoad Concentrate®
0,5 µl	Primer forward
0,5 µl	Primer reverse
8 µl	H <sub>2</sub> O
<b>24 µl</b>	<b>Finales Volumen</b>

Abhängig wie viele DNA-Proben inklusive der Kontrollen, bestehend aus WGA, MK und einer Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O), zu untersuchen waren, wurde die Menge eines Reaktionsansatzes entsprechend vergrößert.

**Tabelle 13:** Reaktionsansatz Pyro-PCR für 1 DNA-Probe, WGA, MK, H<sub>2</sub>O

4 x 12,5 µl = 50 µl	PyroMark® PCR Master Mix
4 x 2,5 µl = 10 µl	CoralLoad Concentrate®
4 x 0,5 µl = 2 µl	Primer forward
4 x 0,5 µl = 2 µl	Primer reverse
4 x 8 µl = 32 µl	H <sub>2</sub> O
<b>4 x 24 µl = 96 µl</b>	<b>Finales Volumen</b>

Jeweils 24 µl wurden in ein 0,2 ml PCR Gefäß pipettiert und jeweils 1 µl Bisulfit-behandelte DNA (50 ng/µl), bzw. jeweils 1 µl WGA, MK oder H<sub>2</sub>O zugegeben, sodass jedes PCR-Gefäß ein finales Volumen von 25 µl aufwies. Nach kurzer Zentrifugation wurden die PCR-Gefäße in einen Thermocycler platziert und das entsprechende PCR-Programm gestartet.

**Tabelle 14:** Pyro-PCR-Programm

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initialisierung	15 min	95 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	45
Primer-annealing	30 s	60 °C Primerpaar 2 – 6) 55 °C (Primerpaar 1)	
Elongation	30 s	72°C	
Finale Elongation	10 min	72°C	
Pause	unbegrenzt	4 °C	

### **2.2.10.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Durch die hohe Anzahl an Zyklen in der Pyro-PCR konnte es einerseits zur Entstehung unspezifischer PCR-Amplifikate, andererseits zur Amplifikation möglicher Kontaminationen kommen. Mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Kontrolle der Pyro-PCR Produkte auf deren Qualität. Angefertigt wurde ein 2 % Agarosegel (siehe 2.2.6). Die Probetaschen wurden mit einem Gemisch aus 5 µl PCR-Produkt-Lösung und 2 µl Ladepuffer beladen. Als Längenstandard wurde 6 µl TriDye 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs, USA) verwendet. Nach dem Gelelektrophorese-Lauf zeigte sich bei der anschließenden Auswertung eine für jedes Primerpaar typische, klar abgrenzbare Bandenposition auf dem Gel. Die Wasser-Kontrolle sollte nicht darstellbar sein. Wenn an ihrer Stelle eine Bande sichtbar war, sprach dies für eine Kontamination einer der bei der Pyro-PCR eingesetzten Substrate.

### **2.2.11 Pyrosequenzierung**

#### **2.2.11.1 Prinzip**

Durch Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit, der damit verbundenen Konversion von unmethyliertem Cytosin zu Uracil, bzw. der ausbleibenden Umwandlung von methyliertem Cytosin (5-Methylcytosin) und einer anschließenden PCR wird ein künstlicher C zu T-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) kreiert. Der ursprüngliche Grad der Methylierung an jeder CpG-Position des zu untersuchenden DNA-Bereichs kann folglich durch das Verhältnis von Cytosin und Thymin an dieser Stelle bestimmt werden. Die Quantifizierung dieses Polymorphismus mittels Pyrosequenzierung ermöglicht somit Rückschlüsse auf den Grad der DNA-Methylierung (Tost und Gut, 2007; Uhlmann et al., 2002).

Das Prinzip der Pyrosequenzierung beruht auf der sog. sequencing by synthesis Methode. Hierbei wird durch die DNA-Polymerase, wenn es während des Sequenziervorgangs zur Inkorporation von Nukleotiden kommt, Pyrophosphat (PPi) freigesetzt, das über eine Enzymkaskade in ein Lichtsignal umgesetzt wird und welches in Echtzeit detektiert werden kann (Nyren, 1987; Nyren et al., 1993; Ronaghi et al., 1996; Ronaghi et al., 1998).

Initial bindet ein spezifischer Primer an die zu untersuchende DNA-Matrize und markiert den Startpunkt für eine DNA-Polymerase. Zyklisch wird jeweils nur eines der vier Nukleotide, ent-

sprechend der bekannten Basenabfolge, hinzugegeben, wobei es bei komplementärer Basenpaarung zur Abspaltung von  $\text{PPi}$  kommt. In Anwesenheit von Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) und  $\text{PPi}$  wird durch eine ATP-Sulfurylase ATP synthetisiert. In einer ATP-abhängigen Reaktion wird Luziferin von dem Enzym Luziferase zu Oxyluziferin oxidiert und dabei Licht emittiert und detektiert. Die Lichtemission ist proportional zur ATP- und somit auch zur  $\text{PPi}$ - bzw. eingebauter Nukleotid-Menge. Überschüssige Nukleotide und ATPs werden am Ende jedes Zyklus durch eine Apyrase (ATP-Diphosphatase) degradiert. Als Nukleotide dienen 2'-Deoxyribonucleosid-5'-( $\alpha$ -thio)-triphosphate ( $\text{dNTP}\alpha\text{S}$ ), welche von der DNA-Polymerase, nicht aber von der Luziferase als Substrate verwendet werden (Ronaghi et al. 1998).

Wenn während der Sequenzierung eine Position am Matrizenstrang erreicht wird, die komplementär zu einem Cytosin eines CpG-Dinukleotids ist, werden nacheinander  $\text{dCTP}\alpha\text{S}$  und  $\text{dTTP}\alpha\text{S}$  zugegeben. Ein detektiertes Lichtsignal durch Inkorporation von  $\text{dCTP}\alpha\text{S}$  spricht dafür, dass in der ursprünglichen DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorlag. Wird hingegen ein Lichtsignal durch Inkorporation von  $\text{dTTP}\alpha\text{S}$  ermittelt, kann davon ausgegangen werden, dass an dieser Stelle ein ehemals umethyliertes Cytosin vorlag, das durch die Bisulfidbehandlung zu Uracil (Thymin) konvertiert wurde. Aus dem Verhältnis der hierbei detektierten Signalstärken bei Zugabe von  $\text{dCTP}\alpha\text{S}$  (methyliertes Cytosin) und  $\text{dTTP}\alpha\text{S}$  (unmethyliertes Cytosin) lässt sich der Methylierungsgrad eines CpG\_Dinukleotides berechnen (Tost und Gut, 2007).

### **2.2.11.2 Durchführung**

Zuerst erfolgte die Aufreinigung der Pyro-PCR-Produkte. Zeigte sich in der Agarose-Gelelektrophorese in der Negativkontrolle keine Kontamination, konnten die Amplifikate verwendet werden. Die PCR-Produkte wurden auf eine PCR-Platte (Eppendorf AG, Deutschland) überführt und deionisiertes Wasser bis zu einem Volumen von 40  $\mu\text{l}$ /well hinzugefügt. Pro Reaktionsansatz wurde ein Mastermix bestehend aus 5  $\mu\text{l}$  Streptavidin/Sepharose™ (GE Healthcare, USA) und 40  $\mu\text{l}$  Binding Buffer (Qiagen, Deutschland) in einem 1,5 ml Reagenzgefäß angefertigt und jeweils 43  $\mu\text{l}$  in jedes well der PCR-Platte hinzu pipettiert. Die PCR-Platte wurde mit einer Klebefolie abgedichtet und mind. 10 Minuten bei höchster Stufe auf einem Plattenschüttler (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland) geschüttelt um die biotinylierten DNA-Einzelstränge an Streptavidin/Sepharose Beads zu immobilisieren. Währenddessen



wurde der Mastermix für die Sequenzierplatte (Biotage, Schweden) hergestellt, indem pro Reaktionsansatz 40 µl Annealing Buffer mit 0,5 µl Sequenzierprimer vermischt wurden. Hier-von wurden 40 µl in jedes well der Sequenzierplatte pipettiert.

Als nächstes wurde die Vakuum-Arbeitsstation (Biotage, Schweden) vorbereitet. Je eine von vier Plastikwannen wurde entweder mit deionisiertem Wasser, 70 % Ethanol, Denaturie-rungslösung (0,2 M NaOH) oder Waschpuffer (10 mM TRIS-Acetat) befüllt. Die PCR-Platte wurde vom Schüttler entfernt und zusammen mit der Sequenzierplatte auf der vorgesehe-nen Position der Arbeitsstation platziert und unmittelbar mit der Aufreinigung begonnen. Nach Anschalten der Vakuum-Pumpe wurden die Filternadeln des Vacuum Prep Tools zuerst in der Wanne mit Wasser gereinigt, indem ca. 10 Sekunden gewartet wurde bis Flüssigkeit im Absaugschlauch zu sehen war. Nach mehrmaligem Schwenken des Vacuum Prep Tools in der Luft, wurden die immobilisierten PCR-Produkte durch Eintauchen der Filternadeln in die wells der PCR-Platte aufgenommen. Anschließend wurden die Filternadeln des Vacuum Prep Tools hintereinander jeweils ca. 10 Sekunden in 70 % Ethanol, Denaturierungslösung und Waschpuffer gespült, um restliche Salze und nicht biotinylierte Einzelstrang DNA von der zu sequenzierenden Einzelstrang-DNA zu waschen. Zwischen den Waschvorgängen wurde das Vacuum Prep Tool jeweils mehrmals in der Luft geschwenkt, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Anschließend wurde das Vacuum Prep Tool über der Sequenzierplatte positio-niert, das Vakuum ausgeschaltet und die Filternadeln mit den immobilisierten DNA-Einzel-strängen in die Sequenzierlösung eingetaucht. Durch vorsichtiges Schütteln wurde die DNA in die Lösung überführt. Das Vacuum Prep Tool wurde anschließend, mit wieder angelegtem Vakuum, in einer Wanne mit deionisiertem Wasser gereinigt.

Die Sequenzierplatte wurde auf einer auf 85 °C vorgewärmten Heizplatte (VWR Internatio-nal, USA) für 2 Minuten platziert um Sekundärstrukturen der Einzelstrang DNA, die zur Stö-rung der Anlagerung der Primer führen könnten, zu beseitigen. Zur Primerhybridisierung wurde die Sequenzierplatte bei RT abgekühlt.

Für die Pyrosequenzierung wurde der an einen Computer angeschlossene Pyrosequenzierer PyroMark® Q96 ID (Biotage, Schweden) hochgefahren und das zugehörige Programm (Pyro-Mark CpG Software) am Computer gestartet. Nach Anlegen einer neuen Datei und Eintragen des zu verwendenden Assays, verwendeter Kartuschen-Nummer, sowie Angabe der Anzahl an Reaktionsansätzen wurden die erforderlichen Volumina zur Befüllung der Kartusche von der Software berechnet.

Zum Befüllen der Kartusche wurde das PyroMark® Gold Q96 Reagents Kit (Qiagen, Deutschland) verwendet. Das lyophilisierte Enzym- und Substrat-Gemisch wurde jeweils in 620 µl deionisiertem Wasser gelöst. Die Kartusche wurde mit Substrat- und Enzymgemisch, sowie den vier Nukleotiden beladen und zusammen mit der Sequenzierplatte in die vorhergesehenen Positionen im Pyrosequenzierer platziert. Anschließend konnte der Sequenzierungslauf gestartet werden.

Nach einem abgeschlossenen Lauf wurde dieser mit der PyroMark CpG Software analysiert, das Ergebnis im Programm selbst und auf dem Computer als Textdatei gespeichert. Die in der Textdatei befindlichen Informationen wurden schließlich mit Excel (Microsoft Office 2013) ausgewertet.

### **2.2.12 Biologische und technische Replikate**

Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der AR-mRNA-Expressions- und der AR-Promotor-Methylierungsanalysen wurden sowohl technische als auch biologische Replikate hergestellt. Technische Replikate wurden durch wiederholte Messungen bzw. Analysen eines bereits gemessenen bzw. analysierten Ausgangsmaterials (cDNA oder Bisulfit-behandelte DNA) realisiert. Für die Herstellung biologischer Replikate wurden die Kontroll-GF und AIS Typ 2-GF neu aufgetaut, in Kultur genommen, RNA extrahiert, cDNA synthetisiert und die AR mRNA-Expression mittels qPCR quantifiziert. Zusätzlich wurde aus der gleichen Zellpassage DNA isoliert und für die Methylierungsanalyse verwendet.

### **2.2.13 Statistische Auswertung**

Für die statistischen Berechnungen dieser Arbeit wurde die Software GraphPad Prism (Version 5) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt. Mittels D'Agostino-Pearson-Test wurde zunächst ermittelt, ob die experimentell erhobenen Datensätze aus dem APOD-Assay, den Expressionssmessungen und den Methylierungsanalysen einer Normalverteilung unterlagen.

Zur Feststellung eines signifikanten Unterschieds zwischen den Expressionsmittelwerten zweier normalverteilter Datensätze wurde ein Zweistichproben t-Test angewandt. Lag keine Normalverteilung vor wurde auf einen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zurückgegriffen.

Zur Überprüfung eines linearen Zusammenhangs zwischen AR-Aktivität und AR-mRNA-Expression sowie zwischen AR-mRNA-Expression und DNA-Methylierungsgrad wurde bei normalverteilten Datensätzen eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Für nicht normalverteilte Datensätze kam die Korrelationsanalyse nach Spearman zur Anwendung.

## **3 Ergebnisse**

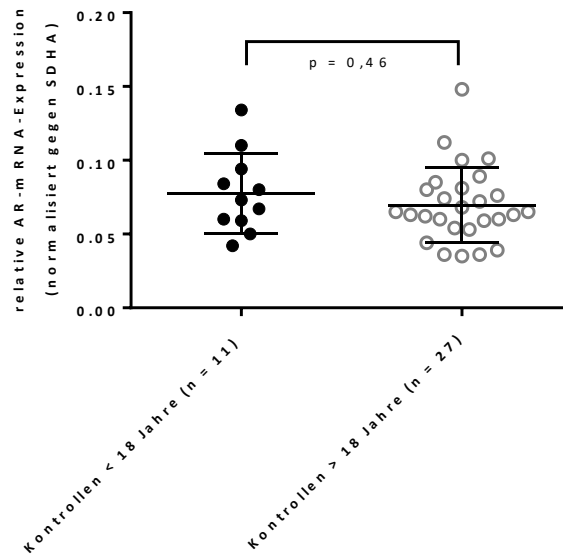
### **3.1 Analyse der AR-mRNA-Expression**

#### **3.1.1 Männliche Kontrollen (Skrotal- und Vorhautgewebe)**

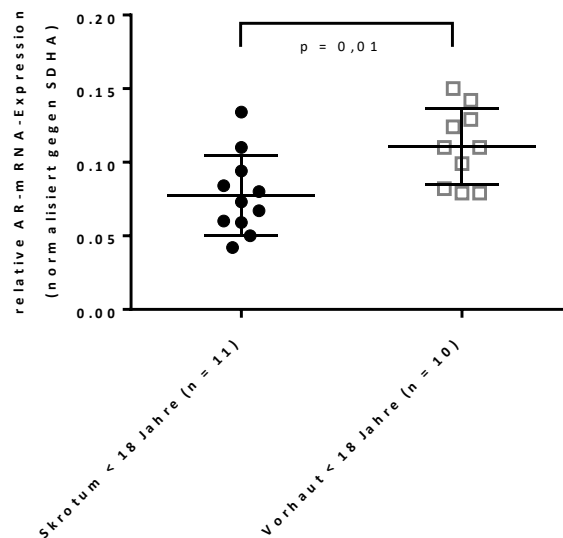
Bei den Kontroll-GF aus Skrotalgewebe wurde zunächst analysiert, ob sich ein Unterschied in der Höhe der AR-mRNA-Expression abhängig vom Alter zum Zeitpunkt der Biopsie der Kontroll-Individuen zeigte. Zwischen der Kindergruppe (0–10 Jahre, MW = 0,078; Standardabweichung (SA) = 0,027 ) und der Erwachsenengruppe (28–52 Jahre; MW = 0,07; SA = 0,025) konnte kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,46$ ) in der Höhe der AR-mRNA-Expression festgestellt werden (Abbildung 6)

Bei den Kontroll-GF aus Vorhautgewebe wurde die AR-mRNA-Expression in einer Kindergruppe (0–10 Jahre) analysiert und mit der AR-mRNA-Expression der entsprechenden Altersgruppe im Skrotalgewebe verglichen. Hierbei zeigte sich im Vorhautgewebe eine höhere AR-mRNA-Expression (MW= 0,11; SA = 0,026) als im Skrotalgewebe. Dieser Unterschied stellte sich als signifikant heraus ( $p = 0,01$ ) (Abbildung 7).

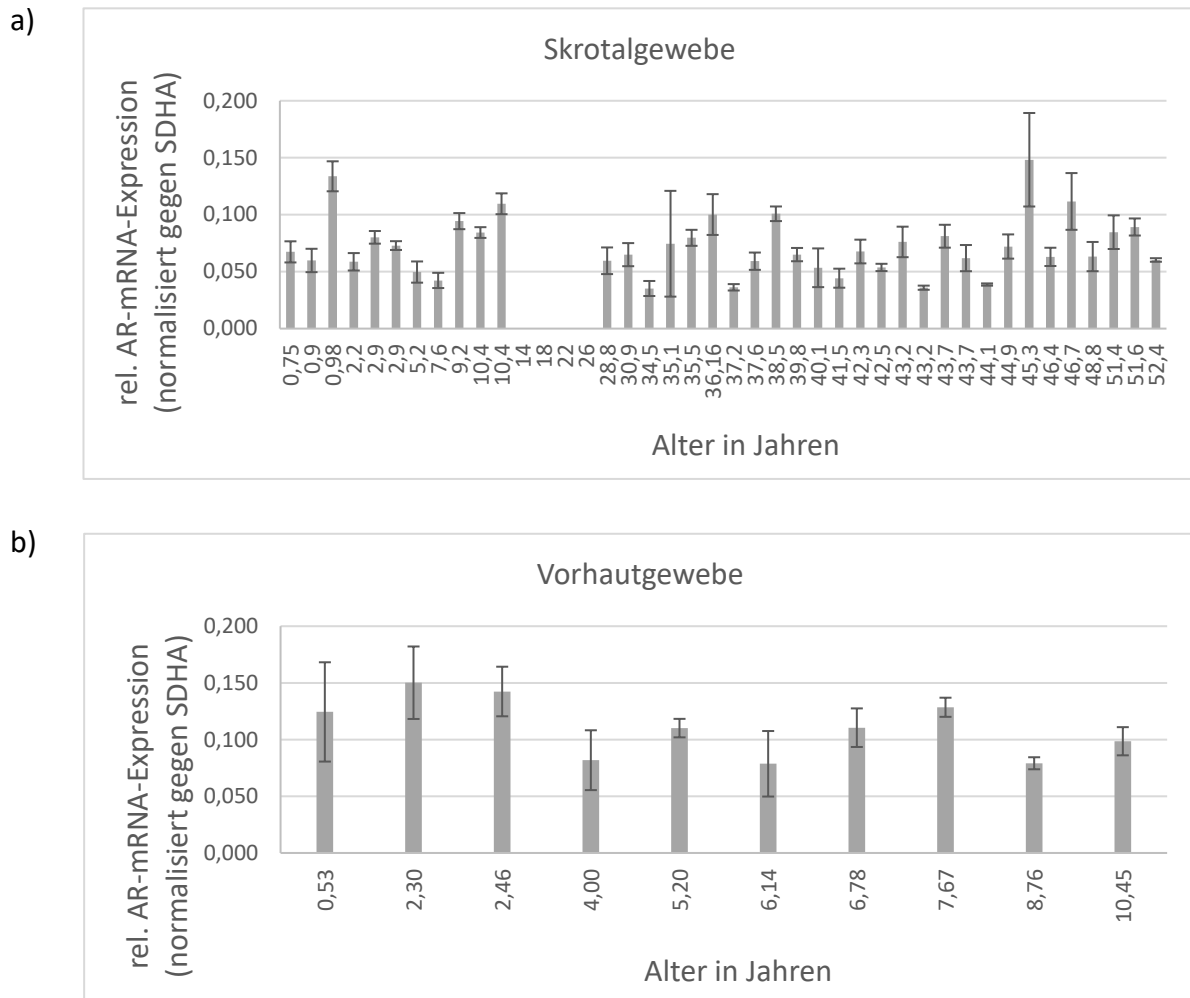
Durch Vergleich des Alters der Individuen zum Zeitpunkt der Biopsie und der dazugehörigen AR-mRNA-Expression fiel auf, dass im Skrotalgewebe, und angedeutet im Vorhautgewebe, die AR-mRNA-Expression bei Kindern einen U-förmigen Verlauf zu nehmen schien, mit einem initialen Gipfel im Alter von 1–2 Jahre, einem Abfall im Kleinkinds- und Grundschulalter und einem Anstieg am Ende der ersten Lebensdekade. Die AR-mRNA-Expressionshöhe im Skrotalgewebe bei Erwachsenen variierte im Alter ohne erkennbares Muster (Abbildung 8a und 8b). Ob dieses Expressionsmuster valide ist, müsste an einer deutlich größeren Kohorte überprüft werden.



**Abbildung 6: AR-mRNA-Expression in männlichen Kontroll-GF aus Skrotalgewebe**  
 AR-mRNA-Expression in GF von Kindern (< 18 Jahre) und Erwachsenen (>18 Jahre). Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikatmessungen. Die Signifikanzanalyse wurde mithilfe eines Zweistichproben t-Tests ( $p = 0,46$ ) durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung der jeweiligen Gruppe sind mit angegeben.



**Abbildung 7: AR-mRNA-Expression in männlichen Kontrollen aus Skrotal- und Vorhautgewebe**  
 AR-mRNA-Expression in GF von Kindern (< 18 Jahre). Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikatmessungen. Die Signifikanzanalyse wurde mithilfe eines Zweistichproben t-Tests ( $p = 0,01$ ) durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung der jeweiligen Kontroll-Gruppe sind mit angegeben.



### Abbildung 8: Altersabhängige AR-mRNA-Expression

**a)** AR-mRNA-Expression (dargestellt als Mittelwerte aus Triplikatmessungen) in Zusammenschau mit dem entsprechenden Alter der Kontroll-GF aus Skrotalgewebe (n = 38). Die Lücke zwischen 10 bis 30 Jahren ergibt sich aus dem Umstand, dass für diese Altersspanne keine GF von männlichen Kontrollen zur Verfügung standen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

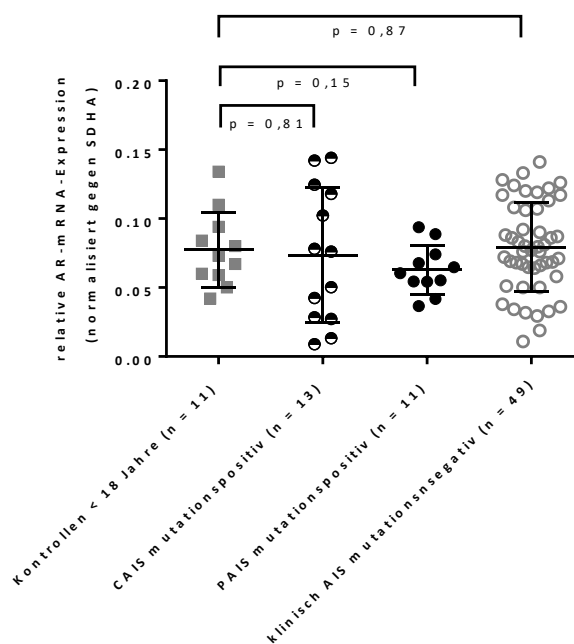
**b)** AR-mRNA-Expression (dargestellt als Mittelwerte aus Triplikatmessungen) in Zusammenschau mit dem entsprechenden Alter der Kontroll-GF aus Vorhautgewebe (n = 10). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

### 3.1.2 Individuen mit AIS (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)

Die AR-mRNA-Expression in GF aus Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe von mutationspositiven Individuen mit CAIS- und PAIS sowie von mutationsnegativen Individuen mit klinischem Verdacht auf AIS wurde mit der entsprechenden Kontrollgruppe verglichen. Die Mutationen im AR-Gen in der CAIS-Gruppe umfassten Missense- oder Nonsense Mutationen, in der PAIS

Gruppe Missense-Mutationen. Die Altersspanne der Individuen aller untersuchten GF reichte von 0 bis 17 Jahre.

Es wurde kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der AR-mRNA-Expression zwischen der männlichen Kontrollgruppe (MW = 0,078; SA = 0,027) und AIS-Proben mit genetisch bestätigter Androgenresistenz (MW CAIS mutationspositiv = 0,074; SA = 0,049; MW PAIS mutationspositiv = 0,063, SA = 0,018) bzw. den mutationsnegativen, klinisch diagnostizierten AIS-Proben (MW = 0,079; SA = 0,032) festgestellt (Abbildung 9).



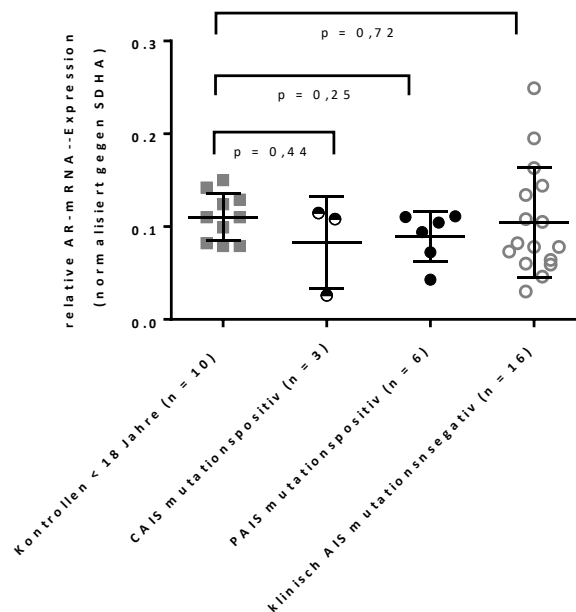
**Abbildung 9: AR-mRNA-Expression in GF aus Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe**

AR-mRNA-Expression in GF von männlichen Kontrollen (dargestellt als Mittelwerte aus Triplikatmessungen), GF von mutationspositiven Individuen mit CAIS- und PAIS und mutationsnegativen, klinisch diagnostizierten Individuen mit AIS (dargestellt sind die normalisierten Expressionswerte aus der qPCR-Messung). Der Mittelwert und die Standardabweichung der jeweiligen Gruppe sind mit angegeben. Mittels Zweistichproben t-Test wurden die p-Werte errechnet.

### 3.1.3 Individuen mit AIS (Vorhaut-/Labia minora-Gewebe)

Für die Analyse der AR-mRNA-Expression in GF aus Vorhaut-/Labia minora-Gewebe wurden mutationspositive Individuen mit CAIS- und PAIS sowie mutationsnegative Individuen mit klinischem Verdacht auf AIS mit der entsprechenden Kontrollgruppe verglichen. Eine Non-sense- oder Missense-Mutation im AR-Gen stellte die Ursache der kompletten Androgenresistenz dar, Missense-Mutationen fanden sich in der Gruppe der partiellen Androgenresistenz. Die Altersspanne der untersuchten GF reichte von 0 bis 16 Jahre.

Es bestand kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der AR-mRNA-Expression zwischen der männlichen Kontrollgruppe (MW = 0,11; SA = 0,026) und den Proben mit genetisch bestätigter Androgenresistenz (CAIS mutationspositiv MW = 0,08; SA = 0,049; PAIS mutationspositiv MW = 0,09; SA = 0,027) und der Gruppe aus mutationsnegativen Individuen mit klinischem Verdacht auf AIS (MW = 0,1; SA = 0,059) (Abbildung 10).



#### Abbildung 10: AR-mRNA-Expression in GF aus Vorhaut-/Labia minora-Gewebe

AR-mRNA-Expression in GF von männlichen Kontrollen (dargestellt als Mittelwerte aus Triplikatmessungen), GF von mutationspositiven Individuen mit CAIS- und PAIS und mutationsnegativen Individuen mit klinischem Verdacht auf AIS (dargestellt sind die normalisierten Expressionswerte aus der qPCR-Messung). Der Mittelwert und die Standardabweichung der jeweiligen Gruppe sind mit angegeben. Mittels Zweistichproben t-Test bzw. bzw. zweiseitigem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurden die p-Werte errechnet



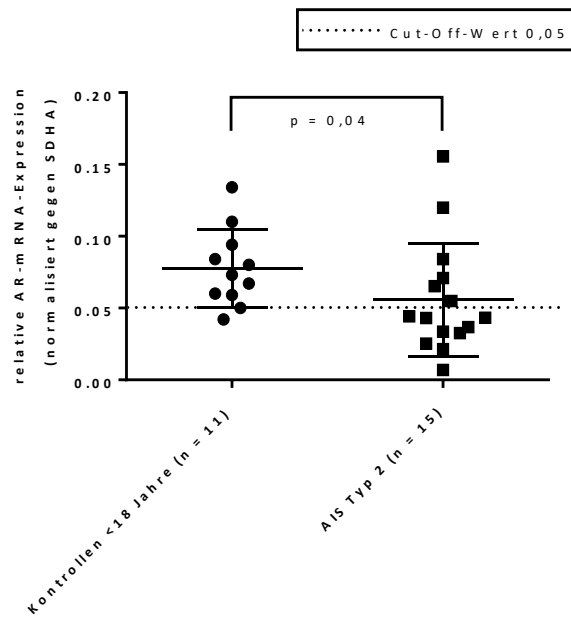
### 3.1.4 Individuen mit AIS Typ 2

Um zu überprüfen, ob die AR-mRNA-Expression in GF von Individuen mit nachgewiesenem AIS Typ 2 (pathologischer APOD-Assay), welche einen Teil der klinisch diagnostizierten AR-mutationsnegativen AIS Gruppe ausmacht, gegenüber normalen männlichen Kontrollen reduziert war, wurden die Ergebnisse der qPCR-Messungen beider Gruppen miteinander verglichen.

Die Altersspanne der Kontroll- und AIS Typ 2 Gruppe von GF aus Skrotal-/Labioskrotalgewebe reichte von 0 bis 16 Jahre. Hierbei wurde eine niedrigere AR-mRNA-Expression in der AIS Typ 2-Gruppe (MW = 0,055; SA = 0,039) als in der Kontrollgruppe (MW = 0,078; SA = 0,027) beobachtet. Dieser Unterschied konnte als signifikant nachgewiesen werden ( $p = 0,04$ ). Die AR-mRNA-Expression einer Zelllinie wurde als niedrig eingestuft, wenn der gemittelte Expressionswert um mehr als eine Standardabweichung unterhalb des Mittelwerts der Kontrollgruppe abwich (Cut-Off-Wert = 0,05). Die AR-mRNA-Expression lag in neun GF von Individuen mit AIS Typ 2 unterhalb des Cut-Off-Werts (GF89, GF107, GF176, GF179, GF280, GF40, GF177, GF109, GF174) (Abbildung 11).

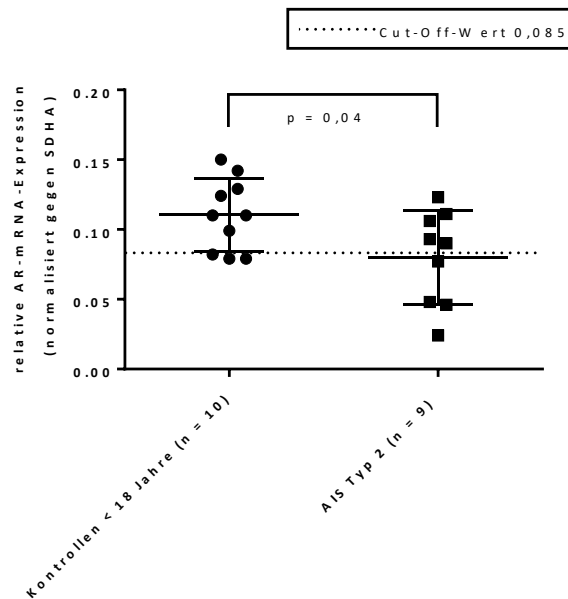
Bei den untersuchten GF aus Vorhaut-/Labia minora-Gewebe reichte die Altersspanne von 0 bis 12 Jahre. In der Expressionsanalyse konnte festgestellt werden, dass die AR-mRNA-Expression in der AIS Typ 2-Gruppe (MW = 0,08; SA = 0,034) ebenfalls geringer war als in der Kontrollgruppe (MW = 0,11; SA = 0,026). Dieser Unterschied stellte sich als signifikant heraus ( $p = 0,04$ ). Falls der Expressionswert einer Zelllinie um mehr als eine Standardabweichung unterhalb des Mittelwerts der Kontrollgruppe abwich (Cut-Off-Wert = 0,085), wurde die AR-mRNA-Expression als niedrig eingestuft. Die mittlere AR-mRNA-Expression in vier GF von Individuen mit AIS Typ 2 lag unterhalb des Cut-Off-Werts (GF160, GF162, GF158, GF157) (Abbildung 12).

Bei der Analyse der AR-mRNA-Expression in den AIS Typ 2-Proben aus Vorhaut-/Labia minora Gewebe fiel außerdem auf, dass die gemessenen Expressionswerte innerhalb einiger Zelllinien (GF166, GF159, GF164) auffallend variierten (Anhang 5c und d).



**Abbildung 11: AR-mRNA-Expression in funktionell nachgewiesenem AIS Typ 2 (pathologischer APOD-Assay) (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)**

AR-mRNA-Expression in GF von männlichen Kontrollen und von Individuen mit AIS Typ 2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikatmessungen. Der Mittelwert und die Standardabweichung der jeweiligen Gruppe sind mit angegeben. Die Grenze zwischen normaler und reduzierter AR-mRNA-Expression wurde bei 0,05 gezogen. Mittels Mann-Whitney-U-Test wurde der p-Wert errechnet.



**Abbildung 12: AR-mRNA-Expression in funktionell nachgewiesenem AIS Typ 2 (pathologischer APOD-Assay) (Vorhaut-/Labia minora-Gewebe)**

AR-mRNA-Expression in GF von männlichen Kontrollen und von Individuen mit AIS Typ 2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikatmessungen. Der Mittelwert und die Standardabweichung der jeweiligen Gruppe sind mit angegeben. Die Grenze zwischen normaler und reduzierter AR-mRNA-Expression wurde bei 0,085 gezogen. Mittels Zweistichproben T-Test wurde der p-Wert errechnet.

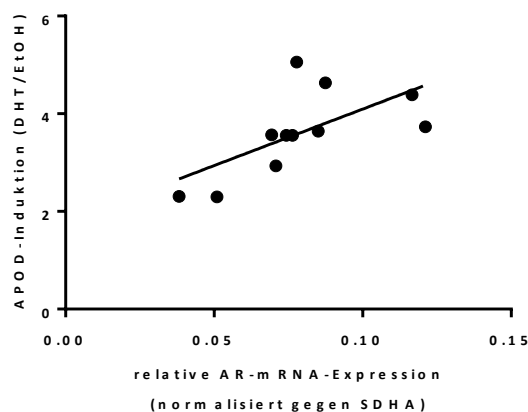
### 3.2 Zusammenhang zwischen AR-Aktivität und AR-mRNA-Expression

Als nächstes wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen AR mRNA Expression und AR-Funktionalität im APOD-Assay in allen AR-mutationsnegativen GF untersucht. Um mutationsbedingte verringerte AR-mRNA Expression (beispielsweise durch einen nonsense-mediated decay) auszuschließen, wurden AR-mutationspositive GF nicht mit in die Analyse aufgenommen. Es wurden die APOD-Induktionsmessungen in GF von männlichen Kontrollen sowie mutationsnegativen Individuen mit klinischem Verdacht auf AIS mit den AR-Expressionsmessungen korreliert und auf ihre Signifikanz hin überprüft.

### 3.2.1 Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe

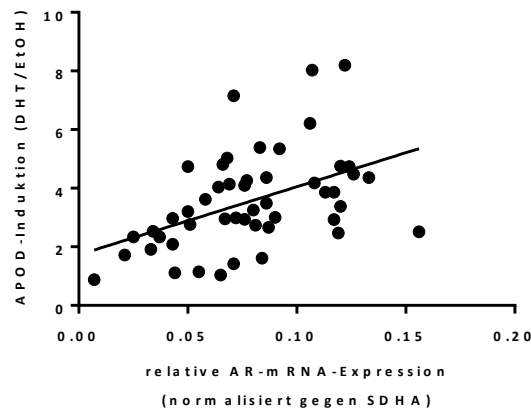
Bei den aus Skrotalgewebe stammenden GF der Erwachsenen-Kontrollgruppe konnte keine signifikante Korrelation zwischen der AR-Aktivität und der AR-mRNA-Expression festgestellt werden ( $r = 0,24$ ,  $p = 0,23$ ). Bei den GF der Kinder-Kontrollgruppe zeigte sich hingegen eine mittelmäßig starke, positive Korrelation ( $r = 0,65$ ; Pearson-Korrelationskoeffizient), die sich als signifikant herausstellte ( $p = 0,03$ ). Je höher die AR-mRNA-Expression gemessen wurde, desto höher schien die AR-Aktivität im APOD-Assay (Abbildung 13).

In GF von mutationsnegativen Individuen mit klinischem Verdacht auf AIS wurde eine geringe, positive Korrelation ( $r = 0,48$ ; Spearman-Korrelationskoeffizient) nachgewiesen, die sich als signifikant herausstellte ( $p = 0,003$ ) (Abbildung 14).



**Abbildung 13: Korrelation zwischen AR-Aktivität (APOD-Induktion) und AR-mRNA-Expression in Kontroll-GF aus Skrotalgewebe von kindlichen Kontrollindividuen**

Für die Berechnung der Korrelation wurden die AR-mRNA-Expressionswerte, der ausschließlich im Rahmen des APOD-Assays extrahierten RNA, aller GF der Kinder-Kontrollgruppe ( $n = 11$ ) und die jeweils dazugehörenden Ergebnisse der APOD-Induktion verwendet. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson betrug  $r = 0,65$  ( $p = 0,03$ ). Zusätzlich ist die Regressionsgerade dargestellt.



**Abbildung 14: Korrelation zwischen AR-Aktivität (APOD-Induktion) und AR-mRNA-Expression in GF aus Skrotalgewebe von AR-mutationsnegativen AIS-Individuen**

Für die Berechnung der Korrelation wurden AR-mRNA-Expressionswerte, der ausschließlich im Rahmen des APOD-Assays extrahierten RNA, aller GF von mutationsnegativen Individuen mit klinischem Verdacht auf AIS ( $n = 49$ ) und die jeweils dazugehörigen Ergebnisse der APOD-Induktion verwendet. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman betrug  $r = 0,48$  ( $p = 0,0003$ ). Zusätzlich ist die Regressionsgerade dargestellt.

### 3.2.2 Vorhaut-/Labia minora-Gewebe

Bei der Prüfung des Zusammenhangs zwischen AR-Aktivität und AR-mRNA-Expression der aus Vorhautgewebe stammenden GF der Kinder-Kontrollgruppe wurde keine signifikante Korrelation festgestellt, ( $r = -0,53$ ;  $p = 0,11$ ).

In GF von mutationsnegativen Individuen mit klinischem Verdacht auf AIS konnte ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang ( $r = 0,01$ ; Spearman-Korrelationskoeffizient;  $p = 0,96$ ) zwischen der AR-Aktivität und der AR-mRNA-Expression nachgewiesen werden.

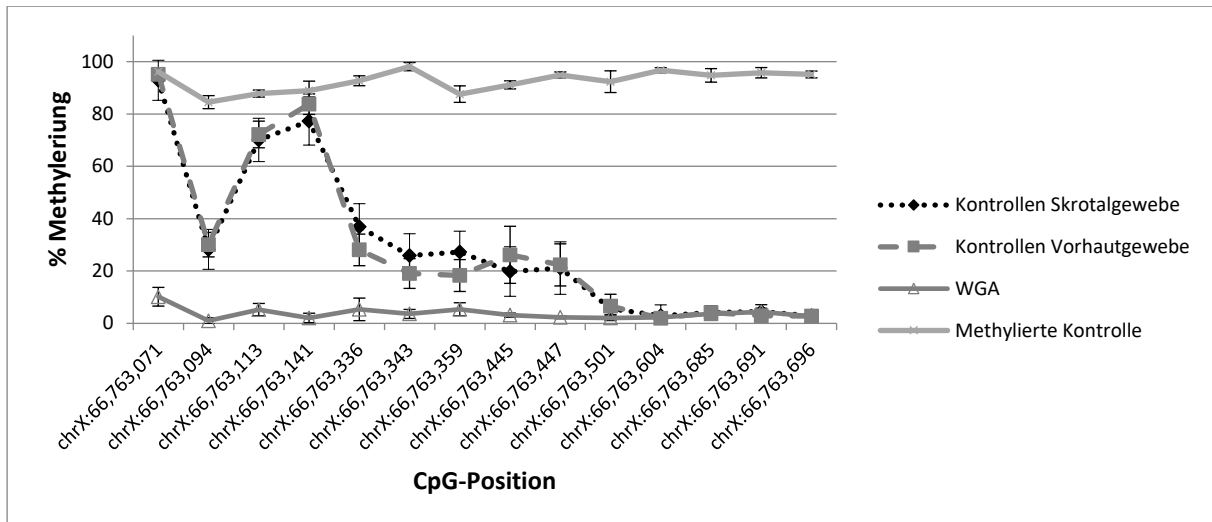
### 3.3 Methylierungsanalyse

Basierend auf den Ergebnissen der Methylierungsanalyse des Human-Methylation27 DNA Analysis Bead Chip und des daraus resultierenden Pyrosequenzierungsassays erfolgte die Analyse der DNA-Methylierung der AR-Promotorregion in GF aus Vorhaut- und Skrotalgewebe von männlichen Kontrollen mit normaler AR-Aktivität und von Individuen mit AIS Typ 2. Untersucht wurden die CpG-Dinukleotide an den Positionen chrX:66763071 (CpG 1) bis chrX:66763696 (CpG 14) innerhalb der proximalen AR-Promotorregion (Abbildung 4). Die Methylierungsanalyse jedes GF wurde mindestens in Duplikatmessungen, inklusive eines biologischen Replikats, durchgeführt.

#### 3.3.1 Männliche Kontrollen (Skrotal-und Vorhautgewebe)

In den Kontroll-GF aus Skrotalgewebe wurde in dem am weitesten stromaufwärts zum Transkriptionsstartpunkt liegenden Bereich eine hohe Methylierung festgestellt (CpG 1–4: MW = 67 %, SA = 23,9 %), gefolgt von einer kontinuierlichen Abnahme (CpG 5–9: MW = 26 %, SA = 6 %). Die geringste Methylierung der untersuchten Region wurde in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes festgestellt (CpG 10–14: MW = 4 %, SA = 1 %).

In den Kontroll-GF aus Vorhautgewebe konnte ein ähnliches Methylierungsmuster im untersuchten Promotorbereich nachgewiesen werden. Einer anfänglich hohen Methylierung (CpG 1–4: MW = 70 %, SA = 24,6 %), folgte eine kontinuierliche Abnahme (CpG 5–9: MW = 22 %, SA = 3,9 %) bis in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes eine sehr geringe Methylierung nachgewiesen wurde (CpG 10–14: MW = 4 %, SA = 1,6 %) (Abbildung 15). Die Methylierung der der geschilderten CpG-Dinukleotid-Bereiche in Vorhaut- und Skrotalgewebe unterschied sich nicht signifikant (CpG 1–4:  $p = 0,9$ ; CpG 5–9:  $p = 0,43$ ; CpG 10–14:  $p = 0,75$ ). Die Signifikanzanalyse hinsichtlich eines Unterschieds in der Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide zwischen GF aus Skrotalgewebe zu GF aus Vorhautgewebe ergab einen signifikanten Unterschied an CpG 4 (chrX:66763141;  $p = 0,01$ ) und CpG 7 (chrX:66763359;  $p = 0,01$ ). Diese Signifikanzanalysen wurde mittels Zweistichproben t-Test durchgeführt.



**Abbildung 15: DNA-Methylierungsanalyse von männlichen Kontroll-GF (Skrotal- und Vorhautgewebe)**

Dargestellt ist das Methylierungslevel der analysierten CpG-Dinukleotide entsprechend ihrer chromosomalen Position im Promotorbereich in GF aus Skrotal- und Vorhautgewebe von männlichen Kontrollen (0,5–10,4 Jahre). Die angezeigten Werte ergeben sich aus der durchschnittlichen Methylierung von jeweils neun individuellen GF. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Als Kontrolle ist die Methylierungsanalyse der WGA- und MK-Kontrollen als Durchschnitt von jeweils sieben Messungen dargestellt.

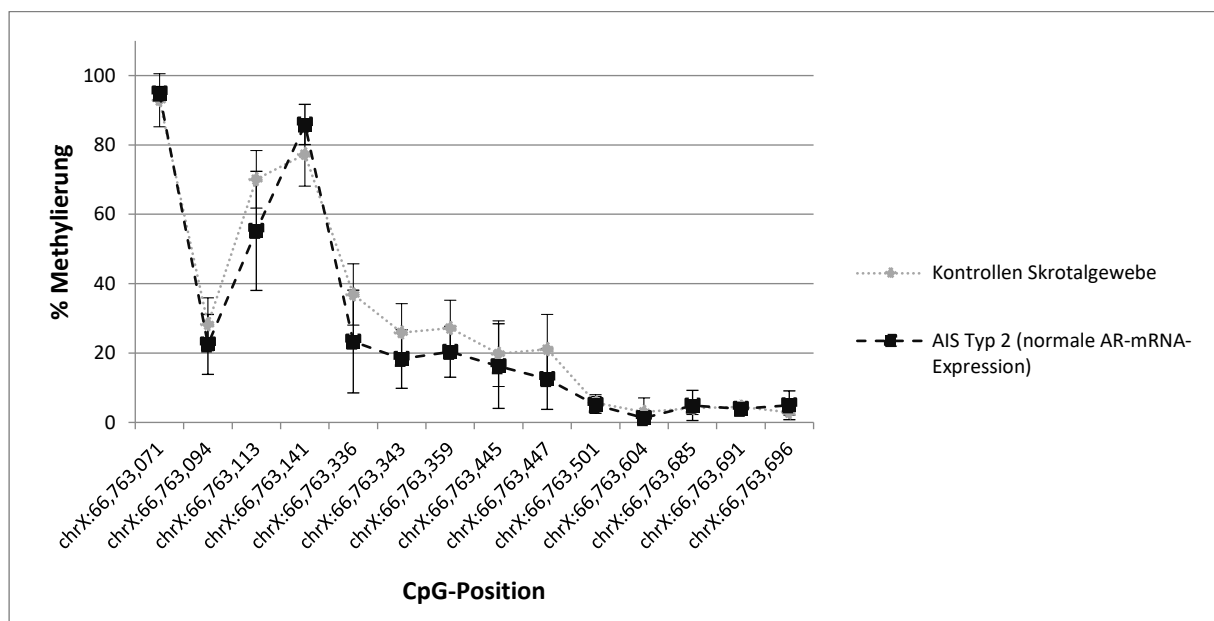
### 3.3.2 Individuen mit AIS Typ 2 (Skrotal-/Labia majora-Gewebe)

Als nächstes wurde die Methylierung der GF aus Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe von Individuen mit AIS Typ 2 und normaler AR-mRNA-Expression analysiert und mit der entsprechenden Kontrollgruppe verglichen (Anhang 13).

Das Methylierungsmuster des untersuchten AR-Promotorbereichs in AIS Typ 2-Proben mit normaler AR-mRNA-Expression war dem Methylierungsmuster der Kontrollgruppe sehr ähnlich. Die durchschnittliche Methylierung aller untersuchten GF (GF90, GF171, GF104, GF173, GF175) war im Anfangsbereich am höchsten (CpG 1-4: MW = 65 %, SA = 28 %), verringerte sich zunehmend im zentralen Abschnitt (CpG 5–9: MW = 18 %, SA = 4,4 %) und sank im letzten Abschnitt nahe des Transkriptionsstartpunktes auf ein Minimum ab (CpG 10–14: MW = 4 %, SA = 1,4 %). Es wurde kein signifikanter Unterschied der durchschnittlichen Methylierung der beschriebenen Abschnitte des AR-Promotorbereichs im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (CpG 1-4:  $p = 0,9$ ; CpG 5–10:  $p = 0,23$ ; CpG 11–14:  $p = 0,8$ ). Für diese Signifikanzanalysen wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet. (Abbildung 16). Auch die Signifikanzanalyse hinsichtlich eines Unterschieds in der Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide

im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab keinen signifikanten Unterschied. Diese Signifikanzanalyse wurde mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt.

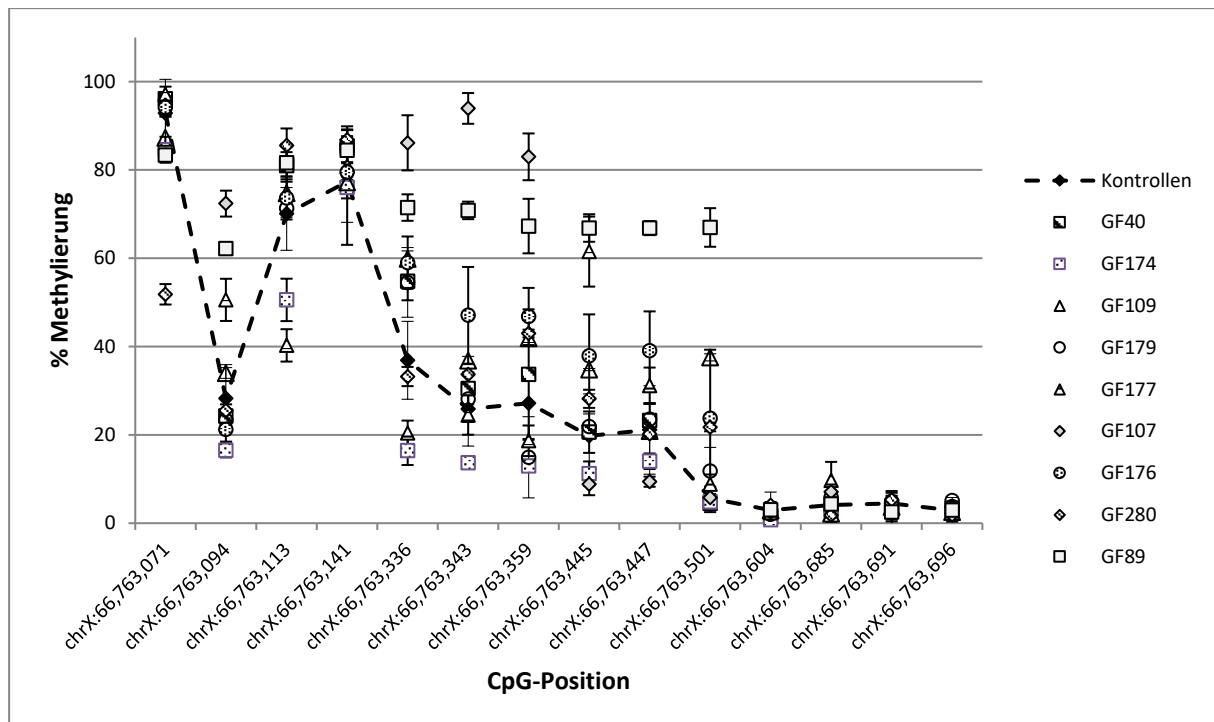
Anschließend wurde die Methylierung in AIS Typ 2-Proben mit niedriger AR-mRNA-Expression überprüft. Dabei wurde in vier GF ein hohes Methylierungslevel in der zentralen Region des untersuchten Promotorbereichs festgestellt. Im gesamten zentralen Abschnitt (chrX:66763336 - chrX:66763501, CpG 5–9) wurde ein hohes Methylierungslevel in GF89 (MW = 69 %, SA = 2,1 %), GF109 (MW= 39 %, SA = 12,6 %) und GF176 (46 %, SA = 7,6 %) nachgewiesen. In GF107 wurde eine sehr starke Methylierung des 5. bis 7. CpG-Dinukleotids (chrX:66,763,336 - chrX:66,763,359; MW= 88%, MW = 4,6 %) festgestellt. Ab der Position chrX:66,763,604 (CpG 11) fiel das Methylierungslevel der CpG-Dinukleotide in allen untersuchten GF ab (Abbildung 17).



**Abbildung 16: DNA-Methylierungsanalyse von Individuen mit AIS Typ 2 und normaler AR-mRNA-Expression (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)**

Dargestellt ist die durchschnittliche Methylierung der analysierten CpG-Dinukleotide entsprechend ihrer chromosomalen Position im Promotorbereich in GF aus Skrotalgewebe von Kontrollen (0–10 Jahre) und von Individuen mit AIS Typ 2 und normaler AR-mRNA-Expression (0–16 Jahre). Die angezeigten Werte der Kontrollgruppe entsprechen dem durchschnittlichen Methylierungslevel von neun individuellen GF von männlichen Individuen. Die Werte der AIS Typ 2 Gruppe mit normaler AR-mRNA-Expression entsprechen dem durchschnittlichen Methylierungslevel von fünf individuellen GF (GF90, GF171, GF104, GF173, GF175). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.





**Abbildung 17: DNA-Methylierungsanalyse von Individuen mit AIS Typ 2 und niedriger AR-mRNA-Expression (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)**

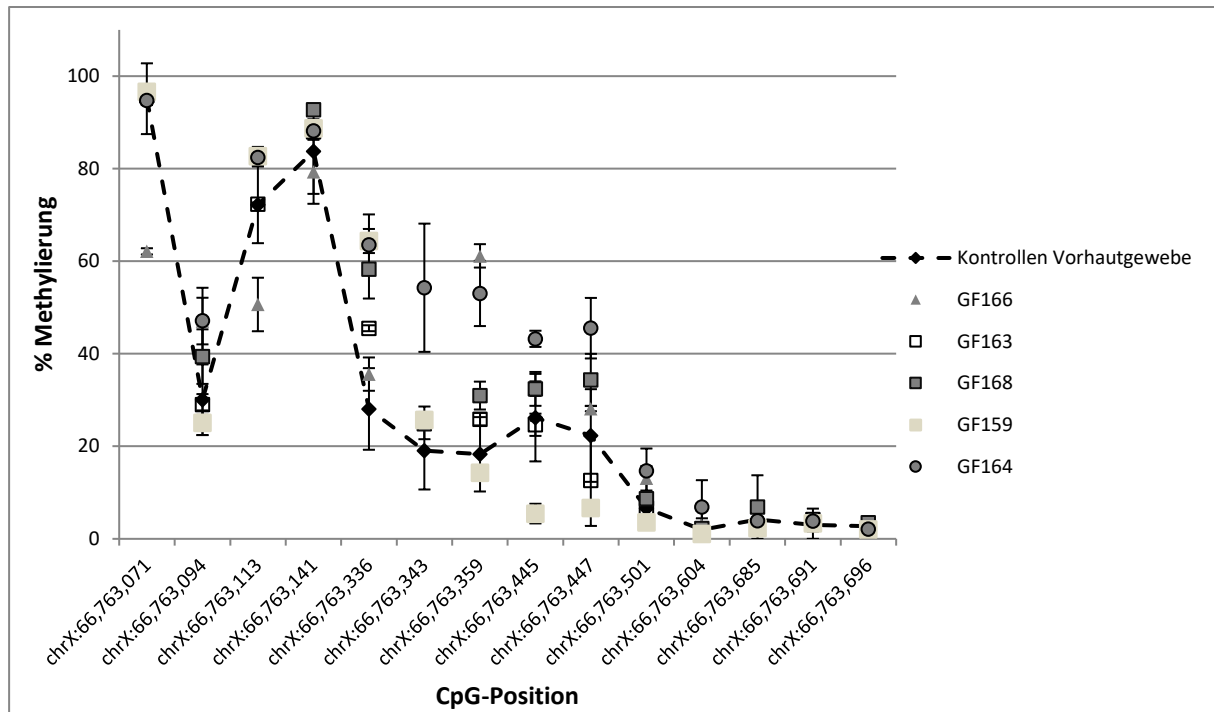
Dargestellt ist die durchschnittliche Methylierung der analysierten CpG-Dinukleotide entsprechend ihrer chromosomalen Position im AR-Promotorbereich in GF von männlichen Kontrollen (jeweils angezeigt als Mittelwert von neun individuellen GF) und von Individuen mit AIS Typ 2, deren relative AR-mRNA-Expression unter 0,05 lag (GF40, GF174, GF109, GF179, GF177, GF107, GF176, GF280, GF89). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

### 3.3.3 Individuen mit AIS Typ 2 (Vorhaut-/Labia minora-Gewebe)

In GF aus Vorhaut-/Labia minora-Gewebe von AIS Typ 2-Proben mit normaler AR-mRNA-Expression zeigte sich wider Erwarten ein von der Kontrollgruppe abweichendes Methylierungsmuster (Anhang 14). Eine hohe Methylierung des zentralen Abschnitt (CpG 5–9) des untersuchten AR-Promotorbereichs wurde in GS529 (MW = 52 %, SA = 7,2 %) festgestellt sowie an Position chrX:66,763,336 (CpG5) in GF168 (MW = 58 %, SA = 6,4 %), GF159 (MW = 64 %, SA = 2,6 %). In GF166 wurde eine hohe Methylierung an Position chrX:66,763,359 (CpG 7; MW = 61 %, SA = 2,5) nachgewiesen. Ab der Position chrX:66,763,604 (CpG 10) fiel das Methylierungslevel der CpG-Dinukleotide in allen untersuchten GF ab (Abbildung 18).

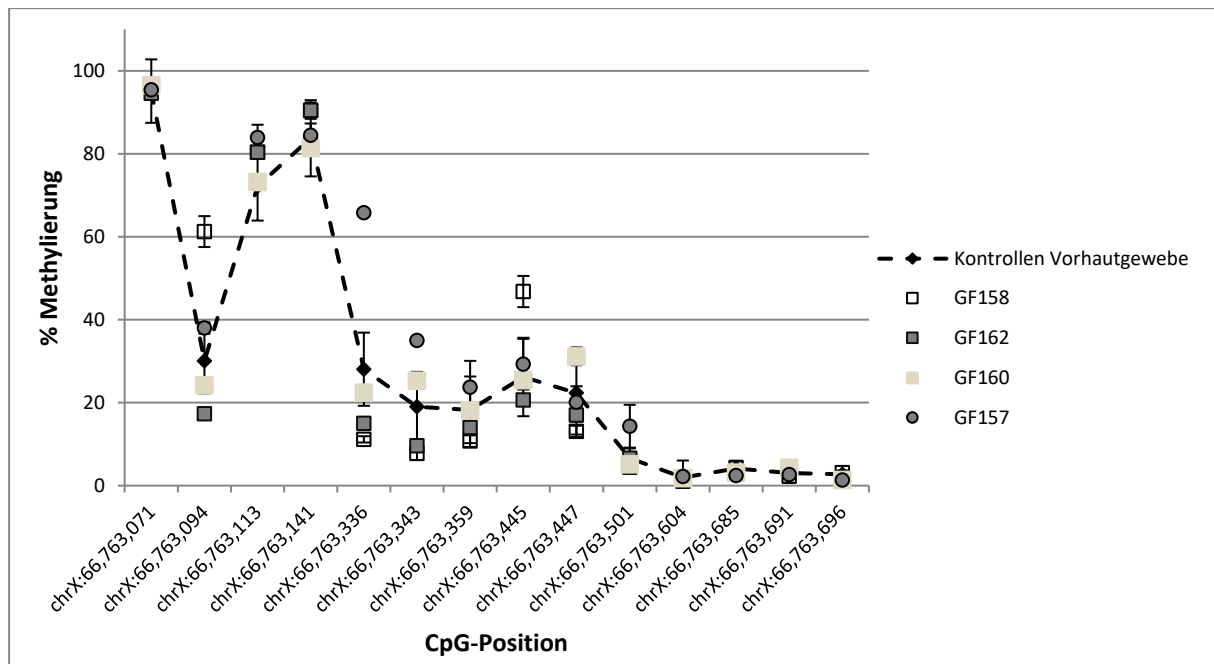
Als nächstes wurde die DNA-Methylierung des AR-Promotorbereichs in GF von Individuen mit AIS Typ 2-Proben sowie niedriger mRNA-Expression analysiert. Hierbei konnte ein zur Kontrollgruppe ähnliches Methylierungsmuster festgestellt werden. Lediglich an Position

chrX:66,763,336 (CpG5) in GF157 wurde eine hohe Methylierung nachgewiesen (MW = 65 %, SA = 0,88 %) (Abbildung 19)



**Abbildung 18: DNA-Methylierungsanalyse von Individuen mit AIS Typ 2 und normaler AR-mRNA-Expression (Vorhaut-/Labia minora-Gewebe)**

Dargestellt ist die durchschnittliche Methylierung der analysierten CpG-Dinukleotide entsprechend ihrer chromosomalen Position im AR-Promotorbereich in GF von männlichen Kontrollen (jeweils angezeigt als Mittelwert von neun individuellen GF) und in GF von Individuen mit AIS Typ 2 und normaler AR-mRNA-Expression (GF166, GF163, GF168, GF159, GF164). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.



**Abbildung 19: DNA-Methylierungsanalyse von Individuen mit AIS Typ 2 und niedriger AR-mRNA-Expression (Vorhaut-/Labia minora-Gewebe)**

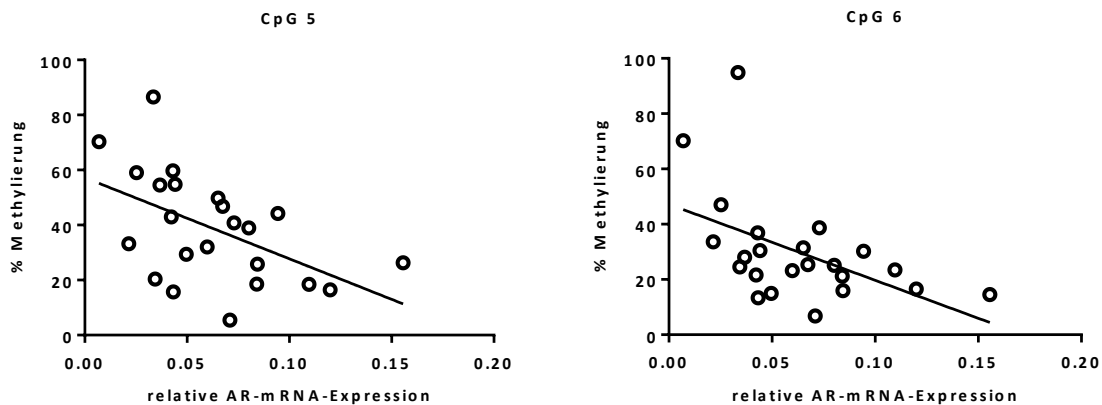
Dargestellt ist die durchschnittliche Methylierung der analysierten CpG-Dinukleotide entsprechend ihrer chromosomalen Position im AR-Promotorbereich in GF von männlichen Kontrollen (jeweils angezeigt als Mittelwert von neun individuellen GF) und in GF von Individuen mit AIS Typ 2 und niedriger AR-mRNA-Expression (GF158, GF162, GF160, GF157). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

### 3.4 Zusammenhang zwischen AR-mRNA-Expression und CpG-Methylierungslevel

Nachdem die Ergebnisse der AR-mRNA-Expressions-Messungen und der AR-Promotor-Methylierungsanalyse feststanden, wurde überprüft ob eine niedrige AR-mRNA-Expression mit einer erhöhten Methylierung der untersuchten AR-Promotorregion in Zusammenhang stand. Hierfür wurde ein Korrelationskoeffizient zwischen der AR-mRNA-Expression und dem Methylierungslevel jedes analysierten CpG-Dinukleotids aller mittels Pyrosequenzierung analysierten Proben berechnet.

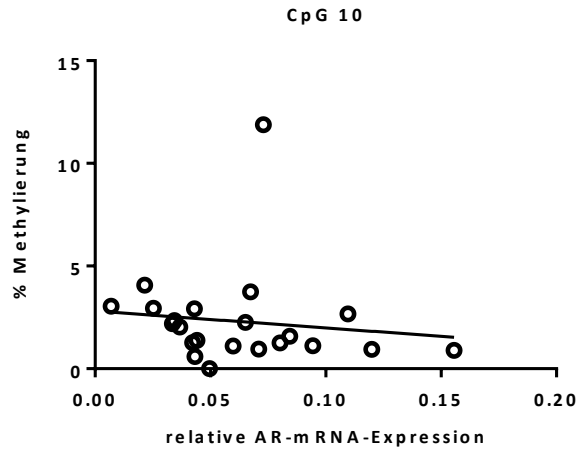
In den GF aus Skrotalgewebe wurde eine mittelmäßig starke, negative Korrelation an den Positionen chrX:66,763,336 (CpG 5;  $r = -0,52$ ; Pearson-Korrelationskoeffizient) und chrX:66,763,343 (CpG 6;  $r = -0,54$ ; Spearman-Korrelationskoeffizient) festgestellt, die sich als signifikant herausstellte. Weiterhin zeigte sich eine schwache, negative Korrelation an Posi-

tion chrX:66,763,501 (CpG 10;  $r = -0,42$ ; Spearman-Korrelationskoeffizient), die sich als signifikant herausstellte. Je höher die Methylierung einer dieser beiden CpG-Dinukleotide in GF festgestellt wurde, desto niedriger war die in gleichen GF gemessene AR-mRNA-Expression (Abbildung 20 und 21). Alle weiteren CpGs zeigten keine signifikante Korrelation zwischen AR-mRNA-Expression und Methylierung.



**Abbildung 20: Korrelation zwischen AR-mRNA-Expression und Methylierungslevel von CpG 5 und CpG 6 (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)**

In die Berechnung der Korrelation wurden die Ergebnisse der AR-mRNA-Expressionsmessungen und der Methylierungsanalyse von allen GF aus Skrotalgewebe einbezogen (Kontroll- und AIS Typ 2-Gruppe), die in der Pyrosequenzierung analysiert wurden. Der Korrelationskoeffizient für CpG 5 betrug  $r = -0,52$  (Pearson Korrelationskoeffizient;  $p = 0,011$ ) und für CpG 6  $r = -0,54$  (Spearman Korrelationskoeffizient;  $p = 0,007$ ). Zusätzlich ist jeweils die Regressionsgerade dargestellt.



**Abbildung 21: Korrelation zwischen AR-mRNA-Expression und Methylierungslevel von CpG 10 (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)**

In die Berechnung der Korrelation wurden die Ergebnisse der AR-mRNA-Expressionsmessungen und der Methylierungsanalyse von allen GF aus Skrotalgewebe einbezogen (Kontroll- und AIS Typ 2-Gruppe), die in der Pyrosequenzierung analysiert wurden. Der Korrelationskoeffizient für CpG 10 betrug  $r = -0,42$  (Spearman Korrelationskoeffizient;  $p = 0,048$ ). Zusätzlich ist die Regressionsgerade dargestellt

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodendiskussion: Bisulfit-Pyrosequenzierung

Zur Detektion und Analyse von DNA-Methylierung existiert heutzutage eine Vielzahl von Methoden, die sich darin unterscheiden ob der Fokus auf einzelne Gene oder auf das gesamte Genom gerichtet wird. Während genomweite Methylierungsanalysen auch an nicht aufbereiteter DNA durchgeführt werden können, beispielsweise durch Verwendung von Proteinen, die mit 5-Methylcytosin interagieren, erfordert eine genspezifische Methylierungsanalyse meist die Amplifikation der im Fokus stehenden Zielsequenz. Die dabei verwendete DNA-Polymerase unterscheidet jedoch nicht zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinen. Folglich würden alle 5-Methylcytosine als normales Cytosin amplifiziert. Aus diesem Grund werden vor einer Amplifikation Verfahren angewendet, um die Information über den Methylierungszustand über eine PCR hinaus zu erhalten. Beispiele hierfür sind der Einsatz von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen (MSRE) oder die chemische Modifikation von Cytosin-Basen durch Behandlung mit Bisulfit (Dahl und Guldborg, 2003; Kurdyukov und Bullock, 2016).

Methylierungsanalysen, die auf der Verwendung von MSRE basieren, unterliegen oft der Beschränkung, dass nur Informationen über die Methylierung von CpG-Dinukleotiden innerhalb der für das Enzym spezifischen Restriktionsstelle erhalten werden. Mit der in dieser Arbeit durchgeführten Bisulfit-Methode kann hingegen der Methylierungsstatus jedes CpG-Dinukleotids im Genom bestimmt werden (Dahl und Guldborg, 2003). Außerdem bleibt hierbei die DNA-Integrität erhalten, weswegen nahezu alle Techniken, die zur Amplifikation, Modifikation und Analyse von DNA-Molekülen anwendbar sind, auch an Bisulfit-behandelter DNA durchgeführt werden können. Die Möglichkeit zur Amplifikation mittels PCR erlaubt den Einsatz von geringsten Ausgangsmengen (ca. 1 ng) an genomischer DNA (Ammerpohl et al., 2009). Allerdings ist die Bisulfit-Methode anfällig für Reaktionsartefakte, die sich auf die Verlässlichkeit der Ergebnisse einer Methylierungsanalyse auswirken können. Falls die DNA während der Bisulfit-Behandlung nicht vollständig denaturiert vorliegt, gelingt die Bisulfit-induzierte Konversion von unmethyliertem Cytosin zu Uracil nur inkomplett. Besonders CpG-reiche Sequenzen tendieren dazu nicht komplett zu denaturieren. Dies kann zur Ermittlung falsch hoher Methylierungswerte führen. Um die Renaturierung der DNA-Einzelstränge wäh-

rend der Bisulfit-Reaktion zu verhindern, wird der Reaktionsansatz mehrmals auf 95 °C erhitzt (Ammerpohl et al., 2009; Dahl und Guldborg, 2003). Umgekehrt kann es sein, dass 5-Methylcytosine infolge der Bisulfit-Behandlung zu Thymin desaminiert werden, was zur Ermittlung von zu niedrigen Methylierungswerten führen kann. Die Reaktionen dabei laufen jedoch viel langsamer ab als bei der Konversion von unmethyliertem Cytosin zu Uracil und betreffen max. 2–3 % der methylierten Cytosine (Frommer et al., 1992; Wang et al., 1980). Ein weiterer Aspekt, der berücksichtigt werden muss, ist, dass DNA bei langer Inkubation im Bisulfit-Reaktionsansatz unter zu sauren Bedingungen depuriniert und degradiert (Frommer et al., 1992; Raizis, et al., 1995). Mit dem in dieser Arbeit für die Bisulfit-Konvertierung verwendeten Kit (EpiTect® Bisulfit Kit, Qiagen) wurde die Inkubationszeit, im Gegensatz zu den in früheren Protokollen veranschlagten 16 Stunden, auf ca. fünf Stunden begrenzt (Tost und Gut, 2007). Ein im Kit enthaltener DNA Protect Buffer zeigt durch Farbumschlag den optimalen pH-Bereich des Reaktionsansatzes an und schützt die DNA vor Degradierung.

Um die nachfolgenden Amplifikations- und Sequenzierreaktionen nicht zu stören, muss die DNA anschließend an die Bisulfit-Behandlung aufgereinigt werden (Munson et al., 2007).

Um die Matrize für die Sequenzierung leichter isolieren zu können werden für die Amplifikation der Bisulfit-behandelten DNA Primerpaare verwendet, von denen je ein Primer mit Biotin markiert ist. Da überschüssige biotinylierte Primer im weiteren Verlauf auch mittels Bindung an Streptavidin isoliert werden und als falsche Sequenzierprimer die Pyrosequenzierung stören können, wird durch eine hohe Anzahl an PCR-Zyklen sichergestellt, dass alle Primer zu einem DNA-Strang verlängert werden. Zum Ausschluss der Amplifikation kleinster Mengen an Kontaminationen werden Negativkontrollen in die PCR einbezogen, die keine DNA enthalten. Um einerseits zu überprüfen, ob genug PCR-Produkt für die Pyrosequenzierung entstanden ist und andererseits die Amplifikation von Kontaminationen auszuschließen, schließt sich jedem PCR-Lauf eine Agarosegelelektrophorese an. In dieser sollten sich für jeden Reaktionsansatz, ausgenommen der Negativkontrolle, klar abgrenzbare Einzelbanden zeigen. Zusätzlich kann durch räumliche Trennung der Prä- und Post-PCR-Prozesse das Kontaminationsrisiko minimiert werden (Tost und Gut, 2007). Bei allen für diese Arbeit verwendeten PCR-Produkten wurde eine Kontamination mittels Agarosegelelektrophorese ausgeschlossen.

Sequenzierungen amplifizierter, Bisulfit-behandelter DNA gelten als Goldstandard genspezifischer Methylierungsanalysen (Dahl und Guldberg, 2003). Die Bisulfit-Pyrosequenzierung ermöglicht eine direkte Quantifizierung der DNA-Methylierung von prinzipiell jeder Sequenz und lässt die gleichzeitige Analyse mehrerer Proben zu. Obwohl es sich um ein schnelles Sequenzierverfahren handelt, lassen sich Ergebnisse zuverlässig reproduzieren, was auf die hohe Sensitivität der Pyrosequenzierung zurückzuführen ist. Unmethylierte Cytosine, die nicht Bestandteil von CpG-Dinukleotiden sind, dienen als interne Kontrolle, um eine ausreichende Bisulfit-Konversion zu bestätigen und tragen damit zur Präzision dieser Methode bei (Ammerpohl et al., 2009; Tost und Gut, 2007). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit zur Qualitätskontrolle in jeder Pyrosequenzierung der Methylierungsstatus einer vollständig methylierten Kontrolle (MK) sowie einer vollständig unmethylierten Kontrolle (WGA) analysiert. Ein Nachteil der Pyrosequenzierung stellt die geringe Leseweite von max. 150 bp dar. Verdünnungseffekte sowie das Risiko für eine inkomplette Inkorporation hinzugefügter Nukleotide nehmen mit der Länge des sequenzierten Abschnitts zu und können zu einem Frameshift im Pyrosequenzierprogramm führen. Eine weitere Schwäche offenbart sich in der mitunter schwierigen Konstruktion geeigneter Sequenzierprimer, da die Reaktionstemperatur während der Pyrosequenzierung, aufgrund der Thermolabilität der Luziferase, nicht über 28 °C steigen darf (Tost und Gut, 2007).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Bisulfit-Pyrosequenzierung erfolgte unter Beachtung des eben Genannten stets in Duplikaten. Insgesamt kann von repräsentativen Ergebnissen ausgegangen werden.

## 4.2 AR-mRNA-Expression in Kontrollen

Bei der Analyse der AR-mRNA-Expression in GF aus Vorhautgewebe fiel auf, dass die mittlere relative Expression der zweiten und dritten Messung (ein biologisches Replikat und davon zusätzlich ein technisches Replikat) niedriger war als die zuerst gemessene AR-mRNA-Expression (Anhang 3c). Dieser Unterschied war zudem statistisch signifikant ( $p = 0,04$ , Zweistichproben t-Test). Dem Gegenüber konnte kein signifikanter Unterschied in der AR-mRNA-Expression der zweiten und dritten Messung (ein biologisches Replikat und davon zusätzlich ein technisches Replikat) in den GF aus Skrotalgewebe festgestellt werden (Anhang 2c), ob-



wohl die Experimente zur Messung der Expression in den GF aus beiden Geweben vom gleichen Untersucher in gleicher Art und Weise erfolgten. Es gab keine bedeutenden Unterschiede in der Zellpassage zwischen GF aus Vorhaut- und Skrotalgewebe (Anhang 2c und 3c). Vorstellbar wäre, dass die GF aus Vorhautgewebe empfindlicher auf den Einfrier- und/oder Auftauprozess reagierten als GF aus Skrotalgewebe und dadurch die AR-mRNA-Expression beeinflusst wurde. Oder dass GF aus der Vorhaut schneller ihre AR-Expression verlieren, sobald sie aus ihrem Zellverband gerissen wurden. Eine eindeutige Erklärung für den signifikanten Unterschied in der AR-mRNA-Expression in GF aus Vorhautgewebe zwischen der ersten und den folgenden Messungen konnte jedoch nicht gefunden werden.

Während in GF aus Skrotalgewebe von männlichen Kontrollen kein signifikanter Unterschied in der mittleren AR-mRNA-Expression zwischen der Gruppe aus GF von Kindern und der Gruppe aus GF von Erwachsenen nachgewiesen werden konnte und die AR-mRNA-Level in der Erwachsenengruppe zwischen den individuellen GF ohne erkennbares Muster altersunabhängig variierte, scheint sich in der Kindergruppe ein angedeuteter altersabhängiger Verlauf der AR-mRNA-Expression zwischen den verschiedenen GF zu zeigen (Abbildung 8a). Dieser altersabhängige Verlauf war auch andeutungsweise in den GF aus Vorhautgewebe darstellbar (Abbildung 8b). Interessanterweise wurde in einer älteren Publikation ein ähnlicher Verlauf in Bezug auf das AR-Protein beobachtet. Hierbei konnte ein Absinken des AR-Proteins im Zytoplasma und im Zellkern in GF aus Vorhautgewebe bei Kindern innerhalb des ersten Lebensjahres und ein Wiederanstieg der Menge des AR-Proteins gegen Ende der ersten Lebensdekade bis zu einem Spitzenwert bei Vollendung des 20. Lebensjahres nachgewiesen werden (Roehrborn et al., 1987). Um die festgestellte altersabhängige AR-mRNA-Expression in GF von Kindern in einen physiologischen Kontext einzuordnen, wäre es vorstellbar, dass der beobachtete Anstieg der AR-mRNA-Expression in Skrotalgewebe gegen Ende der ersten Lebensdekade in Zusammenhang mit dem Beginn der Pubertät und einer erhöhten Sekretion von Androgenen steht (Swerdloff und Odell, 1975). Allerdings lässt sich kein Zusammenhang zwischen den erhöhten AR-mRNA-Expressionswerten gegen Ende des ersten Lebensjahres und der sog. Mini-Pubertät, eine postnatale Phase mit transient erhöhter Sekretion von Gonadotropinen und Androgenen, ableiten. Die hormonellen Veränderungen während der Mini-Pubertät treten kurz nach der Geburt auf und normalisieren sich auf präpubertäre Werte nach ca. sechs bis neun Monaten (Grumbach, 2005; Kuiri-Hanninen et al., 2014). Es wäre aber auch denkbar, dass die AR-Expression im Vergleich zu den Androgenen nach der

Minipubertät langsamer sinkt. Allerdings ist es aufgrund der hier untersuchten, kleinen Kohorte (GF aus Skrotalgewebe:  $n = 11$ ; GF aus Vorhautgewebe:  $n = 9$ ) möglich, dass es sich bei dem beobachteten altersabhängigen Verlauf der AR-mRNA-Expression um ein zufälliges Artefakt handeln könnte. Eine Ausweitung der mRNA-Expressionsanalysen auf eine größere Kohorte von Individuen  $< 18$  Jahre, unter Einschluss des Altersbereich von 10 bis 18 Jahren, könnte zur Aufklärung einer möglichen Altersabhängigkeit der AR-mRNA-Expression im Kindes-/Jugendalter beitragen.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse der Korrelationsanalyse, dass während der Kindheit in Skrotalgewebe die AR-Aktivität (APOD-Induktion) signifikant mit der AR-mRNA-Expression korreliert, wohingegen dieser Zusammenhang im Erwachsenenalter verloren geht. Dies deutet auf einen Wechsel im Regulationsmechanismus der Androgensensitivität in verschiedenen Entwicklungsstadien von der Kindheit zum Erwachsenenalter hin.

Dem entgegen konnte in GF aus Vorhautgewebe kein signifikanter Zusammenhang zwischen der AR-Aktivität und der AR-mRNA-Expression festgestellt werden. Da die mRNA-Expressionmessungen im Vorhautgewebe aber nicht in allen Fällen valide reproduziert werden konnten, ist eine genaue Aussage zur Korrelation zwischen AR-Aktivität und Expression in diesem Gewebetyp nicht möglich. Zudem zeigt sich kein Unterschied in der Höhe der AR-Aktivität (APOD-Induktion) zwischen Skrotal- und Vorhautgewebe (Anhang 2b und 3b), obwohl die AR-mRNA-Expression im Vorhautgewebe höher gemessen wurde (Anhang 12). GF aus Skrotalgewebe und Vorhautgewebe stammen zwar aus zwei direkt benachbarten, androgenabhängigen Geweben, unterscheiden sich jedoch in ihrem embryologischen Ursprung. Während sich das Skrotum aus den Genitalwülsten entwickelt, entstammt der Penis dem Genitalhöcker. Die unterschiedliche Topologie kann zu Unterschieden in der Genexpression in GF aus Vorhaut- oder Skrotalgewebe führen (Holterhus et al., 2007). Außerdem kann sich die unterschiedliche Expression von AR-Coregulatoren auf eine gewebespezifische Androgenwirkung auswirken (Heinlein und Chang, 2002a). Bebermeier et al. konnten unterschiedliche Expressionslevel von AR-Coregulatoren u. a. in Geweben aus dem Fortpflanzungsapparat nachweisen und vermuteten, dass unterschiedliche AR-Coregulator-Expressionsprofile zu einer gewebespezifischen Androgenwirkung führen können (Bebermeier et al., 2006). Denkbar wäre, dass der unterschiedliche embryologischen Ursprung und damit verbunden die unterschiedliche Expression von AR-Coregulatoren sowie deren Interaktion mit dem AR zu den in

dieser Arbeit festgestellten Unterschiede zwischen GF aus Skrotal- und Vorhautgewebe beigetragen haben.

### **4.3 AR-mRNA-Expression in Individuen mit AIS**

Die gemittelte AR-mRNA-Expression zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen aus mutationspositiven Individuen mit CAIS und PAIS unterschied sich nicht signifikant. Bei einigen GF von mutationspositiven Individuen mit CAIS wurden jedoch sehr niedrige AR-mRNA-Level festgestellt (Abbildung 9 und 10). Diese könnten auf einen sog. Nonsense-mediated mRNA Decay zurückzuführen sein. Hierbei kommt es zur beschleunigten Degradierung der mRNA, aufgrund eines durch Nonsense-Mutation entstandenen irregulären Stopcodons in der transkribierten mRNA (Quigley et al., 1995).

Bei einem Teil der in dieser Arbeit untersuchten GF von Individuen mit AIS Typ 2 wurde eine normale AR-mRNA-Expression nachgewiesen (Abbildung 11 und 12). Die mittels APOD-Assay festgestellte pathologische AR-Aktivität in diesen Individuen muss dementsprechend auf anderen, posttranskriptionellen Mechanismen beruhen. Bereits 1994 wurde vermutet, dass eine Mutation im 5'-UTR des AR-Gens, trotz normaler AR-mRNA-Expression, zu einer Störung der AR-mRNA-Translation und dadurch zu AIS führen könnte (Mizokami und Chang, 1994). 22 Jahre später konnten Hornig et al. diese Hypothese bestätigen, indem bei zwei nicht verwandten Individuen mit CAIS sowie fehlender Mutation in der AR-kodierenden Sequenz des AR-Gens eine Mutation im 5'-UTR nachgewiesen werden konnte, die zu einer gestörten AR-Translation und dadurch pathologischen AR-Aktivität führte (Hornig et al., 2016a). Sequenzieranalysen der untranslatierten Bereiche des AR-Gens stellen somit eine weitere Möglichkeit in der AIS Typ 2-Diagnostik dar.

Weiterhin ist trotz eines bis heute fehlenden Nachweises einer AR-Cofaktor-Mutation, die kausal mit einer Androgenresistenz zusammenhängt, nicht auszuschließen, dass in Zukunft durch verbesserte Analysetechniken, wie beispielsweise Exom-Sequenzierungen, eine zu AIS führende Cofaktor-Mutation bei Individuen mit AIS Typ 2 entdeckt werden kann.

## 4.4 Methylierungsanalysen in Skrotal-/Labioskrotalgewebe

Sowohl in den Kontroll-GF als auch in den GF von Individuen mit AIS Typ 2 und normaler AR-mRNA-Expression zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Methylierungslevel im untersuchten Bereich. Im am weitesten vom TSS entfernt liegenden Abschnitt ließ sich eine hohe DNA-Methylierung nachweisen. An den nachfolgenden, näher am TSS liegenden, CPGs nahm das Methylierungslevel kontinuierlich ab (Abbildung 16). Diese Ergebnisse decken sich mit der Feststellung, dass eine DNA-Hypomethylierung in unmittelbarer Nähe zum TSS die Expression des korrespondierenden Gens ermöglicht. Eine DNA-Hypermethylierung in diesem Bereich ist dahingegen mit einer erniedrigten Expression des korrespondierenden Gens assoziiert (Jiang et al., 2012; Jones, 2012).

In den GF aus Skrotal-/Labioskrotalgewebe konnte weiterhin festgestellt werden, dass eine hohe Methylierung an zwei CpG-Dinukleotiden im zentralen Bereich der proximalen Promotorregion (chrX:66,763,336 = CpG 5 und chrX:66,763,343 = CpG 6) mittelmäßig stark negativ mit der entsprechenden AR-mRNA-Expression korrelierte und dieser Zusammenhang zudem signifikant war (Abbildung 20). Weiterhin zeigte sich, dass eine hohe Methylierung im letzten Drittel des proximalen Promotorbereichs (chrX:66,763,501 = CpG 10) schwach negativ mit der entsprechenden AR-mRNA-Expression korrelierte. Auch dieser Zusammenhang war signifikant. Sechs der neun GF von AIS Typ 2 Individuen mit niedriger AR-mRNA-Expression zeigten eine Hypermethylierung an CpG 5 (GF89, GF107, GF176, GF179, GF40, GF109) (Abbildung 17). In vier dieser Fälle wurden zusätzlich hohe Methylierungswerte an CpG 6 nachgewiesen (GF89, GF107, GF176, GF109). Vier der GF von AIS Typ 2 Individuen mit niedriger AR-mRNA-Expression zeigten eine Hypermethylierung an CpG 10 (GF89, GF176, GF280, GF109). Die Methylierung des proximalen AR-Promotorbereichs in GF von Individuen mit AIS Typ 2 und normaler AR-mRNA-Expression unterschied sich nicht signifikant von der Methylierung in GF von männlichen Kontrollen (Abbildung 16).

Dass die Methylierung von CpG-Dinukleotiden im Promotorbereich zur Reduktion oder sogar Stilllegung der Expression des korrespondierenden Gens führen kann, wurde bereits umfassend untersucht (Jones und Laird, 1999). Bei Untersuchungen an humanen Prostatakri- nomzellen wurde bereits ein Zusammenhang zwischen einer hohen CpG-Methylierung im AR-Promotorbereich und einer Reduktion der AR-mRNA-Expression beschrieben (Jarrard et al., 1998; Kinoshita et al., 2000; Nakayama et al., 2000). Eine weiteren Publikation assoziierte

eine reduzierte AR-mRNA-Expression mit einer hohen CpG-Methylierung im AR-Promotorbereich in GF aus Vorhautgewebe von Kindern mit Hypospadie (Vottero et al., 2011). Während diese Studien jedoch Methylierungen in CpG-Inseln im AR-Promotorbereich analysierten, lag der Fokus dieser Arbeit auf einem Bereich mit geringerer CpG-Dichte (CpGI-shore), welcher upstream zu einer CpG-Insel liegt, die sich in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstartpunkts befindet. Der in dieser Arbeit in GF festgestellte inverse Zusammenhang zwischen einer Methylierung von zwei spezifischen CpG-Dinukleotiden außerhalb einer CpG-Insel und der Abnahme der AR-mRNA-Expression wurde bisher noch nicht beschrieben.

CpG-Methylierung beeinflusst die Gen-Expression durch einigen Mechanismen, die entweder isoliert oder in Kombination auftreten können. Die Anwesenheit der Methylgruppe an spezifischen CpGs an sich könnte direkt die Bindung von Transkriptionsfaktoren blockieren und so die Gen-Expression reduzieren (Tate und Bird, 1993). Jedoch enthält eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren keine CpGs in ihrer DNA-Erkennungssequenz. Aus diesem Grund wird angenommen, dass es sich bei einer durch DNA-Methylierung bedingten direkten Blockade von Transkriptionsfaktoren um keinen universalen Mechanismus handelt (Ambrosi et al., 2017). Ein wahrscheinlicherer Mechanismus der durch DNA-Methylierung induzierten Gen-Expressionshemmung ist die Bindung von Methyl-bindenden Proteinen (methyl cpG binding domain proteins) an methylierte CpGs, wodurch die Rekrutierung Histon-modifizierende Proteine, wie beispielsweise Histon-Deacetylasen (HDACs), ermöglicht wird. Die Bindung von Histon-Deacetylasen am Promotorbereich kann zur Konvertierung der Chromatinstruktur in einen verdichteten (kondensierten), transkriptionell inaktiven Zustand führen (Feng und Zhang, 2001; Jones et al., 1998; Lorincz et al., 2004; Nan et al., 1998). Außerdem kann sich eine CpG-Methylierung auch direkt auf die Chromatinstruktur auswirken und zur Reduktion der Gen-Expression beitragen, indem durch DNA-Methylierung die Histonzusammensetzung der Nukleosome beeinflusst wird (Zilberman et al., 2008).

Vor dem Hintergrund dieser, durch DNA-Methylierung initiierten, Mechanismen zur Beeinflussung der Genexpression, bekräftigen die Ergebnisse dieser Arbeit die These, dass eine Hypermethylierung im AR-Promotorbereich verantwortlich für die Störung der Androgenrezeptorfunktion eines relevanten Anteils von Individuen mit AIS ohne Mutation im AR-Gen sein dürfte. Darüber hinaus konnte ein bis dato unbekannter, regulatorischer Bereich (CpG 5 und 6) entdeckt werden, der auch einen Einfluss bei anderen AR-abhängigen Krankheitsbil-

den haben könnte (Hornig et al., 2018). Auf der Basis dieser Erkenntnisse eröffnen sich vielversprechende Ansätze für weitere Forschungen mit tieferen Einblicken in die Komplexität der molekularen Regulationsprozesse der Geschlechtsentwicklung.

## 4.5 Methylierungsanalyse in Vorhaut-/Labia minora-Gewebe

In den Kontroll-GF aus Vorhautgewebe ließ sich ein ähnliches Methylierungsmuster wie bei den Kontroll-GF aus Skrotalgewebe nachweisen (Abbildung 15). Auch hier lässt sich die festgestellte DNA-Hypomethylierung in unmittelbarer Nähe des TSS mit einer normalen AR-mRNA-Expression vereinbaren (siehe 4.4).

Wider Erwarten zeigten sich in den Methylierungsanalysen des proximalen AR-Promotorbereichs in GF aus Vorhaut-/Labia-minora-Gewebe von Individuen mit AIS Typ 2 im Vergleich zum Skrotalgewebe unterschiedliche Ergebnisse. Während die Methylierungslevel in GF von Individuen mit AIS Typ 2 und niedriger AR-mRNA-Expression den Methylierungsleveln der Kontroll-GF sehr ähnlich waren (Abbildung 19), konnte eine Hypermethylierung an Position chrX:66,763,336 (CpG 5) in drei GF von Individuen mit AIS Typ 2 und normaler AR-mRNA-Expression festgestellt werden (Abbildung 18). In einem dieser Fälle (GF164) wurde zusätzlich an CpG 6 ein hoher Methylierungswert ermittelt. Interessanterweise handelt es sich bei GF164 um GF eines Individuums, von dem auch ein Biopsat aus Skrotalgewebe existiert (GF173). In den GF aus Skrotalgewebe (GF173) wurden im Gegensatz zu den GF aus Vorhautgewebe konstantere Expressionsdaten gemessen, außerdem zeigte sich in der Methylierungsanalyse bei eben diesen GF aus Skrotalgewebe niedrige Methylierungslevel im zentralen Bereich (CpG 5–9) (Anhang 13 und 14). Auf der Suche nach einer Erklärung für diese Ergebnisse wurden neben den teilweise variierenden Ergebnissen der Expressionsmessungen innerhalb der GF von Individuen mit AIS Typ 2 (Anhang 5c) auch Auffälligkeiten während des Wachstums der entsprechenden GF festgestellt. Bei der Begutachtung der Zellkulturdocumentation fiel auf, dass eine hohe Anzahl an Zellen beim Auftauen abstarben, die überlebenden GF initial sehr langsam proliferierten und dann einen plötzlichen Wachstumsschub erfuhren. Möglicherweise kam es dabei zur Selektion bestimmter Zellen, deren Genexpressionsmuster sich verändert hatte. Die Interpretation des Zusammenhangs zwischen AR-mRNA-Expression und CpG-Methylierung in GF aus Vorhautgewebe erschien aufgrund der inkonsistenten AR-mRNA-Expressionsdaten einiger GF von AIS Typ 2 Individuen nicht sinnvoll.

Dementgegen wurden bei den GF aus Skrotalgewebe derartige Auffälligkeiten nicht festgestellt.

## 4.6 Weitere Experimente

Um den im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Reduktion der AR-mRNA-Expression zu validieren, wurde die Region ab Position chrX:66,763,278 bis chrX:66,763,597 (CpG 5-11) des AR-Promotors von Hornig et al. in Transfektionsexperimenten mit Reporteranalysen weiter untersucht (Ergebnisse von Experimenten anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass der Bereich ab Position chrX:66,763,324 bis chrX:66,763,383 (CpG 5–7) einen aktivierenden Einfluss auf die Transkription eines Reportergens ausübte, wenn der Bereich in unmethylierem Zustand vorlag. Wenn die CpG-Dinukleotide jedoch *in vitro* methyliert wurden, zeigte sich eine starke Reduktion der Expression des Reportergens. Diese Ergebnisse bewiesen, dass der Bereich um CpG 5–7 je nach Methylierungsgrad Enhancer- oder Silencer-Funktion besitzt und somit auch eine Rolle in die Regulation der AR-mRNA-Expression spielen kann. Weiterhin wurden mittels eines DNA-Pulldown-Assay an den methylierten Bereich (CpG 5-7) der AR-Promotorregion gebundene Proteine identifiziert, die in der Lage sind die Chromatinstruktur zu beeinflussen. In einem sich anschließenden Experiment wurde der Kondensationszustand des Chromatins durch eine Restriktionsanalyse untersucht. Dazu wurde der Zugang von spezifischen Restriktionsenzymen zum zentralen Abschnitt des proximalen AR-Promotorbereichs je nach Methylierungsgrad überprüft. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass der hoch methylierte zentrale Abschnitt des untersuchten Promotorbereichs in GF eines Individuums mit AIS Typ 2 (GF89) vor einem Restriktionsverdau geschützt war. In Kontroll-GF sowie in GF eines Individuums mit CAIS und ausschließlich hoher Methylierung an CpG 7, wurde hingegen ein durch die Restriktionsenzyme bedingter Verdau des zentralen Abschnitts des proximalen AR-Promotorbereichs beobachtet (Hornig et al., 2018). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit und weitere von Hornig et al. durchgeführte Experimente konnten somit einen zuvor noch nicht beschriebenen, die AR-mRNA-Expression regulierenden Bereich der proximalen AR-Promotorregion identifizieren. Insbesondere konnte nachgewiesen werden, dass die Methylierung zweier spezifischer CpGs (CpG 5 und 6) des untersuchten proximalen AR-Promotorbereichs zu einer Reduktion der AR-mRNA-Expression führt.

## 4.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit und die von Hornig et al. (Hornig et al., 2018) weitergeführten Experimente liefern erstmals Hinweise, dass bei einem Teil von Individuen mit AIS Typ 2 die Methylierung zweier spezifischer CpG-Dinukleotide in einem bisher unbekanntem regulatorischen Bereich in der proximalen AR-Promotorregion, zu einer Reduktion der AR-mRNA-Expression und AR-Aktivität führt. Diese Erkenntnisse geben Aufschluss über eine mögliche Ursache einer Androgenresistenz bei klinisch diagnostizierten Individuen mit AIS, bei welchen keine Mutation im AR-Gen nachgewiesen werden kann.

Vorstellbar wäre, dass diese Art der epigenetischen Fehlregulation eine Rolle in der Pathogenese weiterer androgenabhängiger Krankheitsbilder spielen könnte, bei welchen keine ursächliche Mutation im AR-Gen sowie kein Androgenbiosynthesedefekt gefunden werden kann. Wie bereits erwähnt, wurde eine durch DNA-Methylierung im AR-Promotorbereich bedingte Reduktion der AR-mRNA-Expression bei Kindern mit isoliert auftretender Hypospadie und in einem Teil von Patienten mit Prostatakarzinom assoziiert (Jarrard et al., 1998; Kinoshita et al., 2000; Nakayama et al., 2000; Vottero et al., 2011). Weitere Studien zur Untersuchung von DNA-Methylierungen im AR-Promotorbereich bei Patienten mit idiopathischem Hodenhochstand (Kryptorchismus), idiopathischem Mikropenis und idiopathischer Infertilität könnten Aufschluss darüber geben, ob dieser epigenetische Mechanismus auch einen Einfluss auf die Entstehung dieser Anomalien haben könnte (Sasagawa, et al., 2002).

Weiterhin stellt sich die Frage, welche vorgeschalteten Mechanismen zur Methylierung des in dieser Arbeit untersuchten AR-Promotorbereichs in Individuen mit AIS Typ 2 geführt haben. Gegenstand zukünftiger Studien wird es sein, diese Mechanismen zu identifizieren.



## 5 Zusammenfassung

Eine häufige Ursache für eine Störung der Geschlechtsentwicklung bei Individuen mit einem 46, XY Karyotyp ist die durch einen Androgenrezeptordefekt hervorgerufene Androgenresistenz (AIS). Das klinische Erscheinungsbild (Phänotyp) erstreckt sich von Individuen mit komplett weiblichen äußeren Genitale (CAIS) über Individuen mit ambivalentem äußeren Genitale (PAIS) bis hin zu Individuen mit weitestgehend unauffällig männlichem, äußeren Genitale, bei welchen lediglich die Spermatogenese und/oder die pubertäre Virilisierung beeinträchtigt ist (MAIS). Während in nahezu allen Individuen mit CAIS eine Mutation im Androgenrezeptorgens für die Androgenrezeptordysfunktion verantwortlich ist, kann bei 50 bis 75 % der Individuen mit klinisch diagnostizierten, milderer Formen der Androgenresistenz keine Mutation im Androgenrezeptorgen nachgewiesen werden.

Durch den an Genitalhautfibroblasten angewandten, funktionellen APOD-Assay kann die Androgenrezeptorfunktion unabhängig von einer Mutation beurteilt und dadurch eine Androgenresistenz diagnostiziert werden. Dies führte zur Entdeckung der mutationsnegativen AIS-Gruppe AIS Typ 2 (Hornig et al., 2016b). Ziel dieser Arbeit war zum einen, mittels Expressionsanalysen Genitalhautfibroblasten von Individuen mit AIS Typ 2 und reduzierter Androgenrezeptor-mRNA-Expression zu identifizieren. Zum anderen sollte der Methylierungsgrad im Androgenrezeptorpromotor in Genitalhautfibroblasten von Individuen mit AIS Typ 2 und niedriger Androgenrezeptor-mRNA-Expression analysiert werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Androgenrezeptor-mRNA-Expressionsreduktion zu überprüfen.

Hierfür wurde die Androgenrezeptor-mRNA-Expression in Genitalhautfibroblasten aus Vorhaut- und Skrotalgewebe von männlichen Kontrollen und in Genitalhautfibroblasten aus Labia majora- (Labioskrotal)/Labia minora-Gewebe von AIS Individuen mittels qPCR relativ quantifiziert. Der Methylierungsgrad der CpG-Dinukleotide eines bestimmten Bereichs der proximalen Androgenrezeptorpromotorregion wurde mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung analysiert. Durch Korrelationsanalysen wurde anschließend ein Zusammenhang zwischen Androgenrezeptor-mRNA-Expression und CpG-Methylierungsgrad überprüft.

In vier von neun Genitalhautfibroblasten aus Labia minora Gewebe (homolog zu Vorhaut-Gewebe) von Individuen mit AIS Typ 2 konnte eine im Vergleich zu männlichen Kontrollen niedrigere Androgenrezeptor-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Jedoch variierte die

Expression zwischen den Messungen teilweise deutlich, was am ehesten auf eine Störung während der Zellkultivierung zurückzuführen war. Auch die Methylierungsanalysen ergaben widersprüchliche Ergebnisse, weswegen auf eine Korrelationsanalyse in Genitalhautfibroblasten aus Vorhaut- bzw homologem Gewebe verzichtet wurde.

In neun von fünfzehn Genitalhautfibroblasten aus Labia majora Gewebe (homolog zu Skrotalgewebe) von Individuen mit AIS Typ 2 konnte eine im Vergleich zu männlichen Kontrollen niedrigere Androgenrezeptor-mRNA-Expression festgestellt werden. Weiterhin wurde durch Methylierungs- und Korrelationsanalysen ein inverser Zusammenhang zwischen Androgenrezeptor-mRNA-Expression und Methylierungsgrad an zwei spezifischen CpG-Dinukleotiden im proximalen Androgenrezeptorpromotorbereich identifiziert. Hornig et al. konnten in weiteren Experimenten den regulatorischen Einfluss dieser zwei CpG-Dinukleotide auf die Androgenrezeptor-mRNA-Expression bestätigen (Hornig et al., 2018).

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Erkenntnisse über einen epigenetischen Mechanismus, der zu einer Androgenresistenz führen kann, ohne, dass eine Mutation in der Androgenrezeptor-kodierenden Sequenz des Androgenrezeptorgens vorliegt. Vorstellbar ist, dass diese epigenetische Fehlregulation eine Bedeutung in der Pathogenese weiterer androgenabhängiger Krankheitsbilder hat.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adachi, M., Takayanagi, R., Tomura, A., Imasaki, K., Kato, S., Goto, K., ... Nawata, H. (2000). Androgen-Insensitivity Syndrome as a Possible Coactivator Disease. *New England Journal of Medicine*, *343*(12), 856–862.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM200009213431205>
- Ambrosi, C., Manzo, M., & Baubec, T. (2017). Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 429, pp. 1459–1475.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.008>
- Ammerpohl, O., Bens, S., Appari, M., Werner, R., Korn, B., Drop, S. L. S., ... Holterhus, P. M. (2013). Androgen Receptor Function Links Human Sexual Dimorphism to DNA Methylation. *PLoS ONE*, *8*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073288>
- Ammerpohl, O., Martin-Subero, J. I., Richter, J., Vater, I., & Siebert, R. (2009). Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1790*(9), 847–862. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.02.001>
- Appari, M., Werner, R., Wünsch, L., Cario, G., Demeter, J., Hiort, O., ... Holterhus, P. M. (2009). Apolipoprotein D (APOD) is a putative biomarker of androgen receptor function in androgen insensitivity syndrome. *Journal of Molecular Medicine*, *87*(6), 623–632.  
<https://doi.org/10.1007/s00109-009-0462-3>
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, *226*(5252), 1209–1211.
- Beato, M., & Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: An update. *Human Reproduction Update*, Vol. 6, pp. 225–236. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.3.225>
- Bebermeier, J.-H., Brooks, J. D., DePrimo, S. E., Werner, R., Deppe, U., Demeter, J., ... Holterhus, P.-M. (2006). Cell-line and tissue-specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *84*(11), 919–931. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0081-1>
- Berta, P., Hawkins, J. B., Sinclair, A. H., Taylor, A., Griffiths, B. L., Goodfellow, P. N., & Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, *348*(6300), 448–450. <https://doi.org/10.1038/348448a0>
- Boehmer, A. L. M., Brüggewirth, H., Van Assendelft, C., Otten, B. J., Verleun-Mooijman, M. C. T., Niermeijer, M. F., ... Drop, S. L. S. (2001). Genotype Versus phenotype in families

- with androgen insensitivity syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(9), 4151–4160. <https://doi.org/10.1210/jc.86.9.4151>
- Brown, C. J., Goss, S. J., Lubahn, D. B., Joseph, D. R., Wilson, E. M., French, F. S., & Willard, H. F. (1989). Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 44(2), 264–269. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169–193.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), 597–601. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>
- Chang, C. S., Kokontis, J., & Liao, S. T. (1988). Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science*, 240(1975), 324–326. Retrieved from [m:%5CProject Team Management%5CPreclinical Programs%5CScientific Information%5CPDF Articles%5CSciMag240\(4850\)324.pdf](m:%5CProject%20Team%20Management%5CPreclinical%20Programs%5CScientific%20Information%5CPDF%20Articles%5CSciMag240(4850)324.pdf)
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J., & Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research*, 20(7), 1717–1723. <https://doi.org/10.1093/nar/20.7.1717>
- Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L., & Frommer, M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research*, 22(15), 2990–2997.
- Coffey, K., & Robson, C. N. (2012). Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *Journal of Endocrinology*, Vol. 215, pp. 221–237. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0238>
- Dahl, C., & Guldberg, P. (2003). DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology*, 4(4), 233–250.
- Davey, R. A., & Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical Biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 37(1), 3–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27057074>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4810760>
- Dupont, C., Armant, D. R., & Brenner, C. A. (2009, September). Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Seminars in Reproductive Medicine*, Vol. 27, pp.

- 351–357. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1237423>
- Efstratiadis, A., Kafatos, F. C., Maxam, A. M., & Maniatis, T. (1976). Enzymatic in vitro synthesis of globin genes. *Cell*, 7(2), 279–288.
- Elfferich, P., Van Royen, M. E., Van De Wijngaart, D. J., Trapman, J., Drop, S. L. S., Van Den Akker, E. L. 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. <https://doi.org/10.1159/000351820>
- Feng, Q., & Zhang, Y. (2001). The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes & Development*, 15(7), 827–832. <https://doi.org/10.1101/gad.876201>
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., ... Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1827–1831. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827>
- 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. <https://doi.org/10.1002/humu.22046>
- Grino, P. B., Griffin, J. E., & Wilson, J. D. (1990). Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*, 126(2), 1165–1172. <https://doi.org/10.1210/endo-126-2-1165>
- Grumbach, M. M. (2005). A window of opportunity: the diagnosis of gonadotropin deficiency in the male infant. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(5), 3122–3127. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-2465>
- Hawkins, T. L., Detter, J. C., & Richardson, P. M. (2002). Whole genome amplification--applications and advances. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(1), 65–67. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00286-0)
- Hayatsu, H., Wataya, Y., & Kazushige, K. (1970). The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine. *Journal of the American Chemical Society*, 92(3), 724–726.
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2002a). Androgen receptor (AR) coregulators: An overview. *Endocrine Reviews*, Vol. 23, pp. 175–200. <https://doi.org/10.1210/er.23.2.175>
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2002b). The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. *Molecular Endocrinology*, 16(10), 2181–

2187. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0070>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, *10*(4), 413–417.  
<https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, *11*(9), 1026–1030.
- Hiort, O, & Holterhus, P. M. (2000). The molecular basis of male sexual differentiation. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, *142*(2), 101–110. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1420101>
- Hiort, Olaf. (2013). The differential role of androgens in early human sex development. *BMC Medicine*, Vol. 11. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-152>
- Hiort, Olaf, Birnbaum, W., Marshall, L., W??nsch, L., Werner, R., Schr??der, T., ... Holterhus, P. M. (2014). Management of disorders of sex development. *Nature Reviews Endocrinology*, Vol. 10, pp. 520–529. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.108>
- Holterhus, P-M. (2013). [Intersex and differences of sex development: background, diagnostics, and concepts of care]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, *56*(12), 1686–1694. <https://doi.org/10.1007/s00103-013-1850-y>
- Holterhus, P M, Werner, R., Hoppe, U., Bassler, J., Korsch, E., Ranke, M. B., ... Hiort, O. (2005). Molecular features and clinical phenotypes in androgen insensitivity syndrome in the absence and presence of androgen receptor gene mutations. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *83*(12), 1005–1013.  
<https://doi.org/10.1007/s00109-005-0704-y>
- Holterhus, Paul-Martin, Deppe, U., Werner, R., Richter-Unruh, A., Bebermeier, J.-H., Wünsch, L., ... Brooks, J. D. (2007). Intrinsic androgen-dependent gene expression patterns revealed by comparison of genital fibroblasts from normal males and individuals with complete and partial androgen insensitivity syndrome. *BMC Genomics*, *8*, 376.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-376>
- Holterhus, Paul Martin, Sinnecker, G. H. G., & Hiort, O. (2000). Phenotypic diversity and testosterone-induced normalization of mutant L712F androgen receptor function in a kindred with androgen insensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *85*(9), 3245–3250. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.9.6812>

- Hornig, N. C., Ukat, M., Schweikert, H. U., Hiort, O., Werner, R., Drop, S. L. S., ... Holterhus, P. M. (2016). Identification of an AR mutation-negative class of androgen insensitivity by determining endogenous AR activity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *101*(11), 4468–4477. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1990>
- Hornig, Nadine C., De Beaufort, C., Denzer, F., Cools, M., Wabitsch, M., Ukat, M., ... Holterhus, P. M. (2016). A recurrent germline mutation in the 5'UTR of the androgen receptor causes complete androgen insensitivity by activating aberrant uORF translation. *PLoS ONE*, *11*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154158>
- Hornig, Nadine C, Rodens, P., Dörr, H., Hubner, N. C., Kulle, A. E., Schweikert, H.-U., ... Holterhus, P.-M. (2018). Epigenetic Repression of Androgen Receptor Transcription in Mutation-Negative Androgen Insensitivity Syndrome (AIS Type II). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *103*(12), 4617–4627. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2018-00052>
- Huang, S., Ye, L., & Chen, H. (2017). Sex determination and maintenance: the role of DMRT1 and FOXL2. *Asian Journal of Andrology*, Vol. 19, pp. 619–624. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.194420>
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, *6*(4), 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
- Hughes, I. A., Davies, J. D., Bunch, T. I., Pasterski, V., Mastroyannopoulou, K., & Macdougall, J. (2012). Androgen insensitivity syndrome. *The Lancet*, *380*(9851), 1419–1428. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60071-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60071-3)
- Hughes, I. A., & Deeb, A. (2006). Androgen resistance. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 20, pp. 577–598. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2006.11.003>
- Hunter, I., Hay, C. W., Esswein, B., Watt, K., & McEwan, I. J. (2017). Tissue control of androgen action: The ups and downs of androgen receptor expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.08.002>
- Jang, H. S., Shin, W. J., Lee, J. E., & Do, J. T. (2017). CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes*, Vol. 8, pp. 2–20. <https://doi.org/10.3390/genes8060148>
- Jarrard, D. F., Kinoshita, H., Shi, Y., Sandefur, C., Hoff, D., Meisner, L. F., ... Nassif, N. (1998).

- Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Research*, 58(23), 5310–5314.
- Jiang, J., Zhao, L. J., Zhao, C., Zhang, G., Zhao, Y., Li, J. R., ... Wei, L. H. (2012). Hypomethylated CpG around the transcription start site enables TERT expression and HPV16 E6 regulates TERT methylation in cervical cancer cells. *Gynecologic Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.11.023>
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Jones, P. a, & Laird, P. W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics*, 21(2), 163–167. <https://doi.org/10.1038/5947>
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., ... Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, 19(2), 187–191. <https://doi.org/10.1038/561>
- Kashimada, K., & Koopman, P. (2010). Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development*, 137(23), 3921–3930. <https://doi.org/10.1242/dev.048983>
- Kim, H. J., & Lee, W. J. (2009). Insulin-like growth factor-I induces androgen receptor activation in differentiating C2C12 skeletal muscle cells. *Molecules and Cells*, 28(3), 189–194. <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0118-8>
- Kimura, N., Mizokami, A., Oonuma, T., Sasano, H., & Nagura, H. (1993). Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 41(5), 671–678. <https://doi.org/10.1177/41.5.8468448>
- Kinoshita, H., Shi, Y., Sandefur, C., Meisner, L. F., Chang, C., Choon, A., ... Jarrard, D. F. (2000). Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer. *Cancer Research*, 60(13), 3623–3630.
- Koochekpour, S. (2010). Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, Vol. 12, pp. 639–657. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.89>
- Kuiri-Hanninen, T., Sankilampi, U., & Dunkel, L. (2014). Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. *Hormone Research in Paediatrics*, 82(2), 73–80. <https://doi.org/10.1159/000362414>
- Kurdyukov, S., & Bullock, M. (2016, March). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right



- Method (M. Ehrlich, Ed.). *Biology*, Vol. 5. <https://doi.org/10.3390/biology5010003>
- Lee, Y. S., Kirk, J. M. W., Stanhope, R. G., Johnston, D. I., Harland, S., Auchus, R. J., ... Hughes, I. A. (2007). Phenotypic variability in 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency and diagnostic pitfalls. *Clinical Endocrinology*, *67*(1), 20–28.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.02829.x>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lorincz, M. C., Dickerson, D. R., Schmitt, M., & Groudine, M. (2004). Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, *11*(11), 1068–1075.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb840>
- Lubahn, D. B., Joseph, D. R., Sullivan, P. M., Willard, H. F., French, F. S., & Wilson, E. M. (1988). Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science*, *240*(4850), 327–330. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3353727>
- Lyons, L. S., Rao, S., Balkan, W., Faysal, J., Maiorino, C. A., & Burnstein, K. L. (2008). Ligand-independent activation of androgen receptors by Rho GTPase signaling in prostate cancer. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *22*(3), 597–608.  
<https://doi.org/10.1210/me.2007-0158>
- Machado, A. C. D., Zhou, T., Rao, S., Goel, P., Rastogi, C., Lazarovici, A., ... Rohs, R. (2015). Evolving insights on how cytosine methylation affects protein-DNA binding. *Briefings in Functional Genomics*, *14*(1), 61–73. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elu040>
- MacLean, H. E., Warne, G. L., & Zajac, J. D. (1997). Localization of functional domains in the androgen receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *62*(4), 233–242. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(97\)00049-6](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(97)00049-6)
- McPhaul, M. J., Marcelli, M., Zoppi, S., Griffin, J. E., & Wilson, J. D. (1993). Genetic basis of endocrine disease. 4. The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *76*(1), 17–23. <https://doi.org/10.1210/jcem.76.1.8421085>
- Mizokami, A., & Chang, C. (1994). Induction of translation by the 5'-untranslated region of human androgen receptor mRNA. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(41), 25655–

25659.

- Mizuguchi, H., Nakatsuji, M., Fujiwara, S., Takagi, M., & Imanaka, T. (1999). Characterization and application to hot start PCR of neutralizing monoclonal antibodies against KOD DNA polymerase. *Journal of Biochemistry*, *126*(4), 762–768.
- Mongan, N. P., Tadokoro-Cuccaro, R., Bunch, T., & Hughes, I. A. (2015). Androgen insensitivity syndrome. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *29*(4), 569–580. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.005>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *51*(1), 263–273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Munson, K., Clark, J., Lamparska-Kupsik, K., & Smith, S. S. (2007, May). Recovery of bisulfite-converted genomic sequences in the methylation-sensitive QPCR. *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, pp. 2893–2903. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm055>
- Nakayama, T., Watanabe, M., Suzuki, H., Toyota, M., Sekita, N., Hirokawa, Y., ... Shiraishi, T. (2000). Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *80*(12), 1789–1796.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, *393*(6683), 386–389. <https://doi.org/10.1038/30764>
- Nyren, P. (1987). Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Analytical Biochemistry*, *167*(2), 235–238.
- Nyren, P., Pettersson, B., & Uhlen, M. (1993). Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Analytical Biochemistry*, *208*(1), 171–175. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1024>
- Paul, N., Shum, J., & Le, T. (2010). Hot start PCR. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *630*, 301–318. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0_19)
- Quigley, C. A., Bellis, A. De, 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. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-3-271>

- Raizis, A. M., Schmitt, F., & Jost, J. P. (1995). A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Analytical Biochemistry*, *226*(1), 161–166.  
<https://doi.org/10.1006/abio.1995.1204>
- Rana, K., Davey, R. A., & Zajac, J. D. (2014). Human androgen deficiency: insights gained from androgen receptor knockout mouse models. *Asian Journal of Andrology*, *16*(2), 169–177. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122590>
- Rey, R. A., & Grinspon, R. P. (2011). Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *25*(2), 221–238. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.013>
- 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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *81*(8), 2994–2998. <https://doi.org/10.1210/jc.81.8.2994>
- Roehrborn, C. G., Lange, J. L., George, F. W., & Wilson, J. D. (1987). Changes in amount and intracellular distribution of androgen receptor in human foreskin as a function of age. *The Journal of Clinical Investigation*, *79*(1), 44–47. <https://doi.org/10.1172/JCI112805>
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., & Nyrén, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry*, *242*(1), 84–89. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0432>
- Ronaghi, M., Uhlén, M., & Nyrén, P. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, Vol. 281, pp. 363–365.  
<https://doi.org/10.1126/science.281.5375.363>
- Ruizeveld de Winter, J. A., Trapman, J., Vermey, M., Mulder, E., Zegers, N. D., & van der Kwast, T. H. (1991). Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, *39*(7), 927–936.  
<https://doi.org/10.1177/39.7.1865110>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, *239*(4839), 487–491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis

- for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4732), 1350–1354.
- Sasagawa, I., Suzuki, Y., Muroya, K., & Ogata, T. (2002). Androgen receptor gene and male genital anomaly. *Archives of Andrology*, 48(6), 461–466.  
<https://doi.org/10.1080/0148501029009372>
- Shapiro, R., & Weisgras, J. M. (1970). Bisulfite-catalyzed transamination of cytosine and cytidine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40(4), 839–843.  
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)90979-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)90979-4)
- Silva, T. S. e, Richetti, F., Cunha, D. P. P. S., Amarante, A. C. M., Leão, J. Q. de S., & Longui, C. A. (2011). Absolute measurement of androgen receptor mRNA in peripheral blood mononuclear, preputial skin and urethral mucosa cells of control individuals with phimosis using qRT-PCR. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 55(8), 665–668. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302011000800024>
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., ... Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240–244.  
<https://doi.org/10.1038/346240a0>
- Sinnecker, G. H. G., Hiort, O., Nitsche, E. M., Holterhus, P.-M., & Kruse, K. (1996). Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. *Eur J Pediatr*, 156(1), 7–14.  
<https://doi.org/10.1007/s004310050542>
- Stahlberg, A., Hakansson, J., Xian, X., Semb, H., & Kubista, M. (2004). Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry*, 50(3), 509–515. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.026161>
- Swerdloff, R. S., & Odell, W. D. (1975). Hormonal mechanisms in the onset of puberty. *Postgraduate Medical Journal*, 51(594), 200–208. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2495948/>
- Takeda, H., Chodak, G., Mutchnik, S., Nakamoto, T., & Chang, C. (1990). Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. *The Journal of Endocrinology*, 126(1), 17–25.
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2009.  
<https://doi.org/10.1155/2009/574398>

- Tate, P. H., & Bird, A. P. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development*, 3(2), 226–231.
- Temin, H. M., & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226(5252), 1211–1213.
- Tost, J. J., & Gut, I. G. (2007). DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature Protocols*, 2(9), 2265–2275. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.314>
- Tost, J., & Gut, I. G. (2007). DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc*, 2(9), 2265–2275. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.314>
- Tost, Jörg, & Gut, I. G. (2007). DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature Protocols*, 2(9), 2265–2275. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.314>
- Trapman, J., Klaassen, P., Kuiper, G. G., van der Korput, J. A., Faber, P. W., van Rooij, H. C., ... Brinkmann, A. O. (1988). Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 153(1), 241–248. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3377788>
- Uhlmann, K., Brinckmann, A., Toliat, M. R., Ritter, H., & Nurnberg, P. (2002). Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis*, 23(24), 4072–4079. <https://doi.org/10.1002/elps.200290023>
- van de Wijngaart, D. J., Dubbink, H. J., van Royen, M. E., Trapman, J., & Jenster, G. (2012). Androgen receptor coregulators: Recruitment via the coactivator binding groove. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 352, pp. 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.007>
- Verma, I. M., Temple, G. F., Fan, H., & Baltimore, D. (1972). In vitro synthesis of DNA complementary to rabbit reticulocyte 10S RNA. *Nature: New Biology*, 235(58), 163–167.
- Vottero, A., Minari, R., Viani, I., Tassi, F., Bonatti, F., Neri, T. M., ... Ghizzoni, L. (2011). Evidence for epigenetic abnormalities of the androgen receptor gene in foreskin from children with hypospadias. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(12). <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0511>
- Waddington, C. H. (1942). The Epigenotype. *Endeavour*, 1, 18–20. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>
- Wang, R. Y. H., Gehrke, C. W., & Ehrlich, M. (1980). Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Research*, 8(20), 4777–4790. <https://doi.org/10.1093/nar/8.20.4777>

- Wilhelm, D., Palmer, S., & Koopman, P. (2007). Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiological Reviews*, *87*(1), 1–28.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2006>
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, *39*(1), 75–85.
- Wu, X., & Brewer, G. (2012, May). The Regulation of mRNA Stability in Mammalian Cells: 2.0. *Gene*, Vol. 500, pp. 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.021>
- Yang, J. H., Menshenina, J., Cunha, G. R., Place, N., & Baskin, L. S. (2010). Morphology of mouse external genitalia: Implications for a role of estrogen in sexual dimorphism of the mouse genital tubercle. *Journal of Urology*, *184*(4 SUPPL.), 1604–1609.  
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.03.079>
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., & Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature*, *456*(7218), 125–129.  
<https://doi.org/10.1038/nature07324>

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifikation der Androgenresistenz nach Phänotyp (modifiziert nach Sinnecker et al., 1996)	6
Abbildung 2: DHT-abhängige, AR-induzierte APOD-mRNA-Expression (modifiziert nach Hornig et al., 2016b)	8
Abbildung 3: DNA-Methylierungsstatus-Heatmap des AR-Promotors (Ammerpohl et al., 2013)	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung des proximalen AR Promotor-Bereichs (Hornig et al., 2018)	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konversion (Clark et al., 1994)	36
Abbildung 6: AR-mRNA-Expression in männlichen Kontroll-GF aus Skrotalgewebe	45
Abbildung 7: AR-mRNA- Expression in männlichen Kontrollen aus Skrotal- und Vorhautgewebe	45
Abbildung 8 a und b: Altersabhängige AR-mRNA- Expression	46
Abbildung 9: AR-mRNA- Expression in GF aus Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe	47
Abbildung 10: AR-mRNA- Expression in GF aus Vorhaut-/Labia minora-Gewebe	48
Abbildung 11: AR-mRNA-Expression in funktionell nachgewiesenem AIS Typ 2 (pathologischer APOD-Assay) (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)	50
Abbildung 12: AR-mRNA- Expression in funktionell nachgewiesenem AIS Typ 2 (pathologischer APOD-Assay) (Vorhaut-/Labia minora-Gewebe)	51
Abbildung 13: Korrelation zwischen AR-Aktivität (APOD-Induktion) und AR-mRNA-Expression in Kontroll-GF aus Skrotalgewebe von kindlichen Kontrollindividuen	52
Abbildung 14: Korrelation zwischen AR-Aktivität (APOD-Induktion) und AR-mRNA-Expression in GF aus Skrotalgewebe von AR-mutationsnegativen AIS-Individuen	53
Abbildung 15: DNA-Methylierungsanalyse von männlichen Kontrollen (Skrotal- und Vorhautgewebe)	55

Abbildung 16: DNA-Methylierungsanalyse von Individuen mit AIS Typ 2 und normaler AR-mRNA- Expression (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)	56
Abbildung 17: DNA-Methylierungsanalyse von Individuen mit AIS Typ 2 und niedriger AR-mRNA- Expression (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)	57
Abbildung 18: DNA-Methylierungsanalyse von Individuen mit AIS Typ 2 und normaler AR-mRNA- Expression (Vorhaut-/Labia minora-Gewebe)	58
Abbildung 19: DNA-Methylierungsanalyse von Individuen mit AIS Typ 2 und niedriger AR-mRNA- Expression (Vorhaut-/Labia minora-Gewebe)	59
Abbildung 20: Korrelation zwischen AR-mRNA- Expression und Methylierungslevel von CpG 5 und CpG 6 (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)	60
Abbildung 21: Korrelation zwischen AR-mRNA- Expression und Methylierungslevel von CpG 10 (Skrotal-/Labioskrotal-Gewebe)	61



## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte	12
Tabelle 2: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien	13
Tabelle 3: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Verbrauchsartikel	15
Tabelle 4: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Kit-Systeme	16
Tabelle 5: Bezeichnung und Sequenzen der verwendeten qPCR-Primer	17
Tabelle 6: Bezeichnung und Sequenzen der verwendeten Pyro-PCR-Primer	17
Tabelle 7: Bezeichnung und Sequenzen der verwendeten Pyrosequenzier-Primer	18
Tabelle 8: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Software	18
Tabelle 9: qPCR Master-Mix je Reaktionsansatz	29
Tabelle 10: qPCR Protokoll für AR- und APOD-mRNA-Expressionsmessung	30
Tabelle 11: Bisulfit-Konversion Programm	36
Tabelle 12: Reaktionsansatz Pyro-PCR	37
Tabelle 13: Reaktionsansatz Pyro-PCR für 1 DNA-Probe, WGA, MK, H2O	38
Tabelle 14: Pyro-PCR-Programm	38

## 9 Anhang

**Anhang 1:** Klinische Daten, relative mRNA-Expressionsergebnisse und APOD-Induktionswerte in GF aus Skrotalgewebe von Kontrollen (Erwachsene); Das Verhältnis aus DHT zu Ethanol gibt die DHT-induzierte AR-abhängige APOD-Gen-Expression unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (+ SS = 0,1 % Serum; - SS = 10 % Serum) an. Werte oberhalb des Cutoff-Werts sprechen für eine normale AR-Aktivität (nach Hornig et al., 2016b und nicht publizierten Daten von Dr. N. C. Hornig).

Zelllinie	Alter bei Biopsie (Jahre)	AR-mRNA (Mittelwert aus 3 Messungen)	AR-mRNA (Standardabweichung)	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,29 (+ SS)	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,43 (- SS)
GF-28	28,8	0,060	0,012	3,97	3,23
GF-3	30,9	0,065	0,010	6,45	4,18
GF-21	34,5	0,035	0,007	2,54	2,33
GF-7	35,1	0,074	0,046	2,97	2,97
GF-1	35,5	0,080	0,007	4,01	5,19
GF-30	36,16	0,100	0,018	3,81	3,97
GF-15	37,2	0,036	0,003	2,69	2,08
GF-2	37,6	0,059	0,008	2,87	2,47
GF-25	38,5	0,101	0,006	3,36	4,52
GF-24	39,8	0,065	0,006	3,04	2,34
GF-22	40,1	0,053	0,017	3,83	4,31
GF-17	41,5	0,044	0,008	3,39	3,88
GF-8	42,3	0,068	0,010	4,08	4,04
GF-18	42,5	0,054	0,003	4,41	3,68
GF-6	43,2	0,076	0,013	3,53	3,26
GF-16	43,2	0,036	0,002	2,94	2,69
GF-12	43,7	0,081	0,010	4,80	3,49
GF-23	43,7	0,062	0,012	4,33	3,51
GF-10	44,1	0,039	0,001	3,00	3,70
GF-19	44,9	0,072	0,011	3,15	3,05
GF-27	45,3	0,148	0,041	2,95	2,79

## Anhang

GF-11	46,4	0,063	0,008	3,55	3,68
GF-5	46,7	0,112	0,025	3,53	4,17
GF-9	48,8	0,063	0,013	4,39	5,13
GF-26	51,4	0,085	0,015	4,66	3,03
GF-14	51,6	0,089	0,007	3,51	3,72
GF-29	52,4	0,060	0,002	2,37	2,19

**Anhang 2 a, b, c:** Klinische Daten, relative mRNA-Expressionsergebnisse und APOD-Induktionswerte von GF aus Skrotalgewebe von Kontrollen (Kinder); Das Verhältnis aus DHT zu Ethanol (EtOH) gibt die DHT-induzierte AR-abhängige APOD-Gen-Expression unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (+ SS = 0,1 % Serum; - SS = 10 % Serum) an. Werte oberhalb des Cutoff-Werts sprechen für eine normale AR-Aktivität (nach Hornig et al., 2016b und nicht publizierten Daten von Dr. N. C. Hornig).

a)

Zelllinie	Diagnose	Verfügbare klinische Angaben	Alter bei Biopsie (Jahre)
GF-43	Orchidopexie	Hodenhochstand rechts	0,75
GF-35	Orchidopexie	Hodenhochstand beidseits	0,9
GF-41	Orchidopexie	Hodenhochstand links	0,98
GF-39	Orchidopexie	keine weiteren Angaben	2,2
GF-37	Orchidopexie	Hodenhochstand rechts	2,9
GF-34	Orchidopexie	Hodenhochstand rechts	2,9
GF-38	Orchidopexie	Hodenhochstand links	5,2
GF-36	Orchidopexie	Hodenhochstand beidseits	7,6
GF-42	Orchidopexie	Hodenhochstand rechts	9,2
GF-170	Palmure	keine weiteren Angaben	10,4
GF-33	Orchidopexie	Hodenhochstand beidseits	10,4

Anhang

b)

Zelllinie	AR-mRNA (Mittelwert aus 3 Messungen)	AR-mRNA (Standardabweichung)	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,29 (0,1 %)	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,43 (10 %)
GF-43	0,067	0,009	3,56	3,36
GF-35	0,060	0,010	3,56	4,32
GF-41	0,134	0,013	4,39	3,10
GF-39	0,059	0,008	3,57	4,11
GF-37	0,080	0,006	4,63	4,56
GF-34	0,073	0,004	2,93	3,84
GF-38	0,050	0,009	2,31	2,25
GF-36	0,042	0,007	2,30	2,22
GF-42	0,094	0,007	3,64	2,26
GF-170	0,084	0,005	5,06	4,39
GF-33	0,110	0,009	3,73	5,03

c)

Zelllinie	1. Messung (AR-mRNA)	2. Messung (AR-mRNA)	3. Messung (AR-mRNA)	Zell-Passage 1. Messung	Zellpassage 2./3. Messung
GF-43	0,0764150	0,0545983	0,0710511	3	4
GF-35	0,0743254	0,0523742	0,0527385	4	5
GF-41	0,1166291	0,1486509	0,1358419	4	3
GF-39	0,0693481	0,0547879	0,0518325	3	5
GF-37	0,0874741	0,0740683	0,0788361	3	3
GF-34	0,0708052	0,0782915	0,0695889	4	4
GF-38	0,0382075	0,0497210	0,0610020	3	4
GF-36	0,0509420	0,0412346	0,0346740	3	3
GF-42	0,0850821	0,0957224	0,1022378	2	2
GF-170	0,0777507	0,0883883	0,0868699	3	4
GF-33	0,1211612	0,1088188	0,0987552	4	4

**Anhang 3 a, b, c:** Klinische Daten, relative mRNA-Expressionsergebnisse und APOD-Induktionswerte von GF aus Vorhautgewebe von Kontrollen (Kinder); Das Verhältnis aus DHT zu Ethanol (EtOH) gibt die DHT-induzierte AR-abhängige APOD-Gen-Expression unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (+ SS = 0,1 % Serum; - SS = 10 % Serum) an. Werte oberhalb des Cutoff-Werts sprechen für eine normale AR-Aktivität (nach Hornig et al., 2016b und nicht publizierten Daten von Dr. N. C. Hornig).

a)

Zelllinie	Diagnose	Alter bei Biopsie (Jahre)
GF-124	Phimose	0,53
GF-128	kulturelle Indikation	2,30
GF-126	Phimose	2,46
GF-127	Phimose, Lichen sclerosus	4,00
GF-125	Phimose	5,20
GF-120	Phimose	6,14
GF-123	Phimose	6,78
GF-122	Phimose	7,67
GF-121	Phimose	8,76
GF-119	Phimose	10,45

b)

Zelllinie	AR mRNA (Mittelwert)	AR mRNA (Standardabweichung)	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,36 (+ SS)	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,57 (- SS)
GF-124	0,124	0,044	2,96	2,40
GF-128	0,150	0,032	3,01	2,58
GF-126	0,142	0,022	2,56	2,88
GF-127	0,082	0,026	3,39	2,92
GF-125	0,110	0,008	4,59	3,48
GF-120	0,079	0,029	4,24	3,04
GF-123	0,110	0,017	4,23	4,27
GF-122	0,129	0,008	3,92	4,45
GF-121	0,079	0,005	4,11	3,43

Anhang

GF-119	0,099	0,012	5,58	5,82
--------	-------	-------	------	------

c)

Zelllinie	1. Messung (AR-mRNA)	2. Messung (AR-mRNA)	3. Messung (AR-mRNA)	Zell-Passage 1. Messung	Zellpassage 2./3. Messung
GF-124	0,186	0,090	0,097	4	5
GF-128	0,194	0,119	0,137	4	3
GF-126	0,149	0,113	0,166	4	3
GF-127	0,115	0,051	0,079	2	3
GF-125	0,122	0,105	0,103	3	3
GF-120	0,118	0,069	0,049	5	4
GF-123	0,133	0,108	0,091	2	3
GF-122	0,117	0,134	0,135	3	2
GF-121	0,084	0,072	0,081	4	4
GF-119	0,112	0,101	0,082	1	2

**Anhang 4 a, b, c, d:** Klinische Daten, relative mRNA-Expressionsergebnisse und APOD-Induktionswerte von GF aus Labioskrotalgewebe von Individuen mit AIS Typ 2; Das Verhältnis aus DHT zu Ethanol (EtOH) gibt die DHT-induzierte AR-abhängige APOD-Gen-Expression unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (+ SS = 0,1 % Serum; - SS = 10 % Serum) an. Werte oberhalb des Cutoff-Werts sprechen für eine normale AR-Aktivität (nach Hornig et al., 2016b und nicht publizierten Daten von Dr. N. C. Hornig).

a)

Zelllinie	Klinische Verdachtsdiagnose	Verfügbare klinische Angabe	Alter bei Biopsie (Jahre)
GF-107	PAIS	Mikropenis; Hoden inguinal gelegen; penoskrotale Hypospadie	0,03
GF-104	PAIS	Mikropenis; Scrotum bipartitum; skrotale Hypospadie	0,09
GF-176	PAIS	Klitorishypertrophie; Labia majora teilweise fusioniert; Vagina und Urethra öffnen in Sinus urogenitalis (VSD)	0,22

## Anhang

GF-90	PAIS	Hoden inguinal gelegen	15,16
GF-89	PAIS	Vergrößerte Labia majora; Mikrophallus; rechter Hoden inguinal gelegen	0,66
GF-179	PAIS	Mikropenis, Skrotum bipartitum; skrotale Hypospadie; rudimentäre Vaginaanlage	0,87
GF-175	PAIS	Klitoris ähnlich erscheinender Glans penis; perineale Hypospadie; Scrotum bifidum (Hexadaktylie bds Hände und Füße, Herzrhythmusstörungen)	0,98
GF-96	PAIS	Perineale Hypospadie	1,33
GF-172	PAIS	Mikropenis; perineale Hypospadie; beginnende posteriore labiale Fusion	1,68
GF-173	PAIS	Scrotum bifidum; skrotale Hypospadie; Sinus urogenitalis-Rest; rudimentäre Vaginalanlage; rechter Hoden inguinal gelegen	2,69
GF-40	Orchidopexie	Orchidopexie bei beidseitigem Hodenhochstand	8,50
GF-171	PAIS	normale Hodendifferenzierung; geringe Virilisierung; Gonadektomie in der Kindheit; kurze, blind endende Vagina; spärliche Achsel- und Schambehaarung	16,80
GF-177	PAIS	Kuppelförmiges Skrotum	1,00
GF-109	PAIS	Scrotum bifidum; rechter Hoden inguinal gelegen; kleine männliche Harnröhre	1,29
GF-174	PAIS	Skrotale Hypospadie; Scrotum bifidum; Mikropenis; blind endende Urethra (Kleinwuchs; neurologische Entwicklungsstörungen; auffällige Facies)	3,21

Anhang

b)

Zelllinie	AR-mRNA (Mittelwert)	AR-mRNA Standardabweichung	APOD-Induk- tion DHT/E- tOH Cutoff = 2,29 (0,1 %)	APOD-Induk- tion DHT/E- tOH Cutoff = 2,43 (10 %)
GF-107	0,034	0,002	2,27	2,53
GF-104	0,071	0,002	1,30	1,42
GF-176	0,025	0,009	2,45	2,34
GF-90	0,120	0,008	2,26	3,38
GF-89	0,007	0,004	1,26	0,88
GF-179	0,037	0,008	3,26	2,34
GF-175	0,156	0,024	1,99	2,51
GF-96	0,021	0,008	2,61	1,72
GF-172	0,055	0,015	1,43	1,15
GF-173	0,084	0,003	1,46	1,61
GF-40	0,044	0,008	1,54	1,11
GF-171	0,065	0,003	1,02	1,04
GF-177	0,034	0,005	2,59	1,91
GF-109	0,043	0,011	1,64	2,97
GF-174	0,043	0,006	1,98	2,09

c)

Zelllinie	1. Mes- sung (AR- mRNA)	2. Messung (AR-mRNA)	3. Messung (AR-mRNA)	Zellpassage 1. Messung	Zellpassage 2. und 3. Messung
GF-107	0,034	0,031	0,035	5	5
GF-104	0,069	0,071	0,073	7	7
GF-176	0,019	0,019	0,038	4	4
GF-90	0,128	0,122	0,110	6	6
GF-89	0,011	0,008	0,001	9	9
GF-179	0,038	0,027	0,045	5	6
GF-175	0,141	0,137	0,189	7	8
GF-96	0,032	0,019	0,014	8	6



## Anhang

GF-172	0,080	0,044	0,056	4	5
GF-173	0,088	0,084	0,080	4	4
GF-40	0,033	0,049	0,051	3	3
GF-171	0,068	0,067	0,061	4	2
GF-177	0,029	0,041	0,033	5	6
GF-109	0,065	0,043	0,043	5	5
GF-174	0,036	0,044	0,049	4	6

d)

Zelllinie	weitere Messungen (AR-mRNA)	Zellpassage der weiteren Messungen
GF-172	0,039	3
GF-109	0,031/0,052/0,032/0,036	6/6/8/8

**Anhang 5 a, b, c:** Klinische Daten, relative mRNA-Expressionsergebnisse und APOD-Induktionswerte von GF aus Vorhaut-/Labia-minora-Gewebe von Individuen mit AIS Typ 2; Das Verhältnis aus DHT zu Ethanol (EtOH) gibt die DHT-induzierte AR-abhängige APOD-Gen-Expression unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (+ SS = 0,1 % Serum; - SS = 10 % Serum) an. Werte unterhalb des Cutoff-Werts sprechen für eine AR-Dysfunktion (nach Hornig et al., 2016b und nicht publizierten Daten von Dr. N. C. Hornig).

a)

Zelllinie	klinische Verdachtsdiagnose	Phänotyp	Alter bei Biopsie (Jahre)
GF-166	PAIS	Scrotum bifidum; penoskrotale Hypospadie; Analtresie; Rekourethrale Fistel	0,07
GF-163	PAIS	Mikropenis; Skrotum labia majora ähnlich; penoskrotale Hypospadie	0,5
GF-160	PAIS	langgestreckte prox. Urethra; gemeinsame Mündung von Harnröhre und rudimentärer Vagina im Sinus urogenitalis	2,35
GF-164	PAIS	Scrotum bifidum; skrotale Hypospadie; Sinus urogenitalis-	2,75

Anhang

		Rest, rudimentäre Vaginalanlage, rechter Hoden inguinal gelegen	
GF-162	PAIS	Hypoplastische Corpora cavernosa; Penisdeviation nach links; Z.n. Vesicourethralem Reflux; Urethradivertikel; Blasen-divertikel; Urethralklappe	4,87
GF-158	MAIS	Mikropenis	9,6
GF-168	PAIS	Inkomplette Vaginaanlage; Mikropenis	10,07
GF-159	MAIS	Hypogenitalismus	11,31
GF-157	MAIS	Mikropenis; Z.n.Hodenhochstand mit 3 Jahren	12,08

b)

Zelllinie	AR mRNA (Mittelwert)	AR-mRNA (Standardabweichung)	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,36 (+ SS)	DHT/EtO-HAPOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,57 (-SS)
GF-166	0,10643131	0,087127699	1,11	1,39
GF-163	0,122688654	0,018800904	2,22	2,43
GF-160	0,045785788	0,009008555	2,11	2,69
GF-164	0,090403046	0,012841691	1,52	1,38
GF-162	0,048295026	0,002119485	2,08	1,83
GF-158	0,023791847	0,004083456	1,76	2,31
GF-168	0,093324397	0,011741798	2,17	1,27
GF-159	0,111316138	0,049936225	1,95	1,13
GF-157	0,077163335	0,00448547	2,23	3,08

c)

Zelllinie	1. Messung (AR-mRNA)	2. Messung (AR-mRNA)	3. Messung (AR-mRNA)	Zellpassage 1. Messung	Zellpassage 2. und 3. Messung
GF-166	0,24914	0,03432	0,03716	9	9
GF-163	0,13444	0,14762	0,12414	6	6

Anhang

GF-160	0,05852	0,03901	0,03983	4	4
GF-164	0,10769	0,07695	0,08657	7	7
GF-162	0,04559	0,05077	0,04853	5	6
GF-158	0,02956	0,02105	0,02076	7	6
GF-168	0,07829	0,10695	0,09473	7	8
GF-159	0,19479	0,12158	0,17495	6	6
GF-157	0,07280	0,08333	0,07536	6	6

d)

Zelllinie	weitere Messungen (ARmRNA)	Zellpassage der weiteren Messungen
GF-166	0,105	8
GF-163	0,092/0,115	5/5
GF159	0,07/0,081/0,072/0,064	7/7/4/4

**Anhang 6:** Klinische Daten, relative mRNA-Expressionsergebnisse und APOD-Induktionswerte von GF aus Labioskrotalgewebe von mutationspositiven Individuen mit CAIS; Das Verhältnis aus DHT zu Ethanol (EtOH) gibt die DHT-induzierte AR-abhängige APOD-Gen-Expression unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (+ SS = 0,1 % Serum; - SS = 10 % Serum) an. APOD-Induktionswerte unterhalb des Cutoff-Werts sprechen für eine AR-Dysfunktion (nach Hornig et al., 2016b und nicht publizierten Daten von Dr. N. C. Hornig).

Zelllinie	Diagnose	Mutation	Alter bei Biopsie (Jahre)	AR mRNA	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,29 (0,1 %)	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,43 (10 %)
GF-77	CAIS	Nonsense Mutation	1,19	0,076	0,90	1,21
GF-72	CAIS	Nonsense Mutation	4,25	0,013	0,90	1,06
GF-69	CAIS	Nonsense Mutation	5,41	0,042	0,95	0,91

## Anhang

GF-70	CAIS	Nonsense Mutation	14,83	0,118	0,90	1,01
GF-85	CAIS	Nonsense Mutation	14	0,050	0,86	1,05
GF-74	CAIS	Nonsense Mutation	17	0,028	0,75	1,45
GF-75	CAIS	Nonsense Mutation	0,12	0,009	1,03	0,97
GF-76	CAIS	Nonsense Mutation	2,64	0,144	0,80	0,90
GF-73	CAIS	Nonsense Mutation	17,22	0,125	0,70	0,84
GF-84	CAIS	Missense Mutation	0,83	0,102	0,55	1,04
GF-71	CAIS	Missense Mutation	1,25	0,027	0,98	0,97
GF-83	CAIS	Missense Mutation	3,5	0,142	1,94	1,62
GF-82	CAIS	Missense Mutation	17,2	0,078	1,18	0,85

**Anhang 7:** Klinische Daten, relative mRNA-Expressionsergebnisse und APOD-Induktionswerte von GF aus Labioskrotalgewebe von mutationspositiven Individuen mit PAIS; APOD-Induktionswerte unterhalb des Cutoffwerts sprechen für eine AR-Dysfunktion (nach Hornig et al., 2016b und nicht publizierten Daten von Dr. N. C. Hornig).

Zelllinie	Diagnose	Mutation	Alter bei Biopsie (Jahre)	AR mRNA	APOD-Induktion DHT/E-tOH Cutoff = 2,29 (0,1 %)	APOD-Induktion DHT/E-tOH Cutoff = 2,43 (10 %)
GF-275	PAIS	Missense Mutation	0,90	0,055	2,20	1,97
GF-59	PAIS	Missense Mutation	1,08	0,060	2,23	2,35

## Anhang

GF-61	PAIS	Missense Mutation	1,16	0,037	2,00	1,07
GF-65	PAIS	Missense Mutation	1,35	0,074	1,23	1,06
GF-68	PAIS	Missense Mutation	1,61	0,068	1,38	1,16
GF-64	PAIS	Missense Mutation	4,08	0,054	2,12	2,39
GF-246	PAIS	Missense Mutation	6,83	0,054	4,53	9,58
GF-247	PAIS	Missense Mutation	7,43	0,089	4,32	3,82
GF-63	PAIS	Missense Mutation	8	0,042	1,29	1,85
GF-62	PAIS	Missense Mutation	13,08	0,094	1,54	1,59
GF-250	PAIS	Missense Mutation	16,16	0,065	1,50	1,33

**Anhang 8:** Klinische Daten, relative mRNA-Expressionsergebnisse und APOD-Induktionswerte von GF aus Labia minora-Gewebe von mutationspositiven Individuen mit CAIS; Das Verhältnis aus DHT zu Ethanol (EtOH) gibt die DHT-induzierte AR-abhängige APOD-Gen-Expression unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (+ SS = 0,1 % Serum; - SS = 10 % Serum) an. APOD-Induktionswerte unterhalb des Cutoff-Werts sprechen für eine AR-Dysfunktion. (nach Hornig et al., 2016b und nicht publizierten Daten von Dr. N. C. Hornig).

Zelllinie	Diagnose	Mutation	Alter bei Biopsie (Jahre)	AR mRNA	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,36 (0,1 %)	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,57 (10 %)
GF-211	CAIS	Missense Mutation	2,76	0,11	1,01	1,01

## Anhang

GF-155	CAIS	Missense Mutation	1	0,11	1,87	1,44
GF-156	CAIS	Nonsense Mutation	17	0,03	0,62	1,18

**Anhang 9:** Klinische Daten, relative mRNA-Expressionsergebnisse und APOD-Induktionswerte von GF aus Labia minora-Gewebe von mutationspositiven Individuen mit PAIS; APOD-Induktionswerte unterhalb des Cutoff-Werts sprechen für eine AR-Dysfunktion. (nach Hornig et al., 2016b und nicht publizierten Daten von Dr. N. C. Hornig).

Zelllinie	Diagnose	Mutation	Alter bei Biopsie (Jahre)	AR mRNA	APOD-Induktion DHT/E-tOH Cutoff = 2,36 (0,1 %)	APOD-Induktion DHT/E-tOH Cutoff= 2,57 (10 %)
GF-148	PAIS	Missense Mutation	0,01	0,104	1,73	1,35
GF-147	PAIS	Missense Mutation	1,33	0,094	2,24	2,55
GF-149	PAIS	Missense Mutation	11,55	0,111	1,75	2,29
GF-151	PAIS	Missense Mutation	14	0,043	1,61	1,74
GF-214	PAIS	Missense Mutation	16,24	0,072	1,76	2,03
GF-150	PAIS	Missense Mutation	1	0,110	2,28	2,08

**Anhang 10:** Klinische Daten, relative mRNA-Expressionsergebnisse und APOD-Induktionswerte von Genitalhautfibroblasten aus Labioskrotalgewebe von Individuen mit klinischem Erscheinungsbild einer Androgenresistenz, aber normaler AR-Aktivität. Das Verhältnis aus DHT zu Ethanol (EtOH) gibt die DHT-induzierte AR-abhängige APOD-Gen-Expression unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (+ SS = 0,1 % Serum; - SS = 10 % Serum) an. APOD-Induktionswerte oberhalb des Cutoff-Werts sprechen für eine normale AR-Aktivität (nach Hornig et al., 2016b und nicht publizierten Daten von Dr. N. C. Hornig).

Zelllinie	Alter bei Biopsie (Jahre)	AR mRNA	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,29 (0,1 %)	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,43 (10 %)
GF-115	0,03	0,076	4,61	2,94
GF-111	0,05	0,107	8,97	8,03
GF-108	0,46	0,113	5,50	3,86
GF-93	0,58	0,108	3,49	4,18
GF-101	0,92	0,124	3,54	4,74
GF-100	1,00	0,117	3,59	3,86
GF-102	1,02	0,086	4,48	3,49
GF-92	1,08	0,064	3,69	4,04
GF-94	1,16	0,122	4,20	8,20
GF-99	1,25	0,087	3,07	2,66
GF-97	1,44	0,119	3,49	2,47
GF-87	1,46	0,106	6,68	6,21
GF-98	1,63	0,117	3,66	2,93
GF-95	1,66	0,050	2,51	3,20
GF-113	1,76	0,067	4,33	2,95
GF-112	2,58	0,066	4,13	4,81
GF-106	10,14	0,076	4,06	4,10
GF-88	10,30	0,077	3,95	4,26
GF-110	11,14	0,058	6,84	3,62
GF-270	0,09	0,069	5,66	4,14

## Anhang

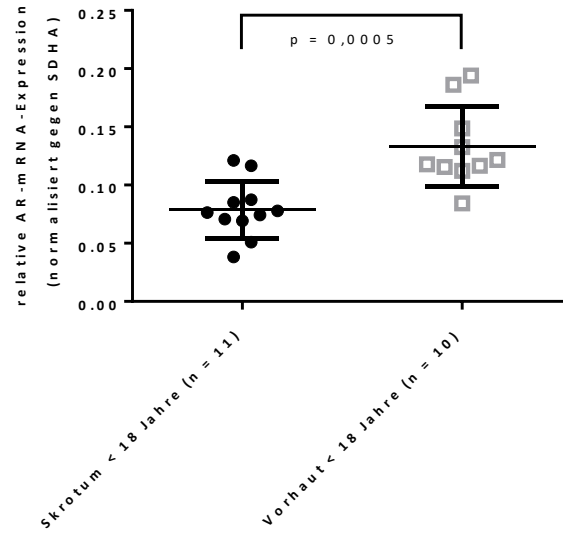
GF-265	1,13	0,050	5,50	4,74
GF-276	0,27	0,071	5,08	7,15
GF-264	0,26	0,126	6,13	4,48
GF-280	2,93	0,086	4,88	4,36
GF-256	2,36	0,083	4,19	5,39
GF-269	5,31	0,081	4,00	2,74
GF-283	1,98	0,080	3,43	3,25
GF-281	10,23	0,090	3,14	3,00
GF-263	0,11	0,051	2,62	2,76
GF-261	0,09	0,072	2,60	2,99
GF-285	5,00	0,133	4,04	4,36
GF-286	9,00	0,068	6,00	5,03
GF-322	0,41	0,120	3,88	4,75
GF-288	6,34	0,092	4,84	5,35

**Anhang 11:** Klinische Daten, relative mRNA-Expressionsergebnisse und APOD-Induktionswerte von Genitalhalhautfibroblasten aus Vorhaut-/Labia-minora-Gewebe von Individuen mit klinischem Erscheinungsbild einer Androgenresistenz, aber normaler AR-Aktivität. Das Verhältnis aus DHT zu Ethanol (EtOH) gibt die DHT-induzierte AR-abhängige APOD-Gen-Expression unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (+ SS = 0,1 % Serum; - SS = 10 % Serum) an. Werte oberhalb des Cutoff-Werts sprechen für eine normale AR-Aktivität. (nach Hornig et al., 2016b und nicht publizierten Daten von Dr. N. C. Hornig).

Zelllinie	Alter bei Biopsie (Jahre)	AR mRNA	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,36 (0,1 %)	APOD-Induktion DHT/EtOH Cutoff = 2,57 (10 %)
GF-169	2,43	0,060	5,84	6,11
GF-167	11,55	0,082	3,07	2,45
GF-218	2,43	0,078	3,03	3,99
GF-220	10,60	0,064	2,95	3,82
GF-221	3,00	0,163	4,72	5,05
GF-222	0,30	0,144	4,26	3,20
GF-223	6,34	0,105	6,89	7,29



**Anhang 12:** relative AR-mRNA-Expression in männlichen Kontrollen aus Skrotal- und Vorhautgewebe in GF von Kindern (< 18 Jahre). Dargestellt sind die gemessenen AR-mRNA-Expressionswerte der aus dem APOD-Assay extrahierten RNA. Die Signifikanzanalyse wurde mithilfe eines Zweistichproben t-Tests durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung der jeweiligen Kontroll-Gruppe sind mit angegeben.



## Anhang

**Anhang 13:** Methylierungsdaten aller untersuchten CpG-Dinukleotide in GF aus Skrotal-/Labioskrotalgewebe. Angegeben ist die Methylierung (Methyl. in %) als Mittelwert aus mindestens zwei Methylierungsanalysen sowie die Standardabweichung (SA in %).

Zelllinie		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	CpG 10	CpG 11	CpG 12	CpG 13	CpG 14
GF-43	Methyl.(%)	95,4	29,6	71,3	82,6	46,8	25,4	24,3	17,3	20,2	7,0	3,7	4,1	3,5	3,8
	SA (%)	0,2	3,0	1,6	0,5	0,5	0,6	0,6	0,9	0,8	0,2	0,5	0,0	0,2	0,1
GF-35	Methyl.(%)	91,9	31,0	67,5	73,9	34,3	26,6	25,8	14,1	16,4	3,7	1,1	4,1	5,1	2,7
	SA (%)	1,5	1,0	2,4	12,0	6,3	9,9	7,5	2,7	1,5	0,6	0,9	2,7	1,5	0,4
GF-37	Methyl.(%)	95,3	27,1	71,1	79,9	39,5	24,1	30,5	29,1	20,3	5,8	1,3	4,7	4,7	3,5
	SA (%)	0,8	0,8	1,3	2,1	1,6	3,5	2,8	1,3	1,0	0,5	1,5	0,5	0,7	0,6
GF-34	Methyl.(%)	96,3	42,7	75,7	78,6	40,8	38,7	34,4	38,9	42,9	8,1	11,9	5,0	5,6	3,1
	SA (%)	0,5	4,9	0,7	7,0	1,7	2,5	3,4	1,4	2,3	2,3	2,9	0,8	1,2	0,7
GF-38	Methyl.(%)	94,6	23,2	83,4	88,3	29,4	14,9	17,0	8,8	8,5	5,6	0,0	4,5	3,3	2,8
	SA (%)	0,9	5,0	2,9	0,3	1,8	0,9	1,5	1,3	0,3	0,8	0,0	1,0	0,9	0,7
GF-36	Methyl.(%)	94,8	27,3	66,6	69,7	43,7	22,9	25,7	11,4	10,3	2,6	0,8	1,3	2,7	1,9
	SA (%)	0,8	7,9	4,9	9,8	3,2	3,6	5,4	7,1	6,6	1,9	1,2	1,8	2,0	1,0
GF-42	Methyl.(%)	83,2	26,6	60,7	78,8	44,2	30,2	25,8	16,6	21,7	6,0	1,1	4,6	4,6	3,0
	SA (%)	16,9	1,7	11,3	7,8	1,4	3,9	0,9	1,9	1,6	1,3	1,1	1,8	0,8	0,5
GF-170	Methyl.(%)	93,3	21,5	64,6	73,2	26,0	16,0	17,2	19,7	17,9	3,5	1,5	3,9	5,2	2,4
	SA (%)	0,3	1,3	1,7	8,3	0,9	1,1	0,9	0,8	4,2	0,8	1,0	1,8	0,6	0,2
GF-33	Methyl.(%)	94,0	19,8	81,6	75,3	18,5	23,5	42,9	14,0	30,7	8,2	2,7	4,3	4,5	2,8
	SA (%)	0,9	1,4	0,9	11,9	4,4	5,0	5,4	0,7	2,1	1,8	0,4	0,6	0,1	0,4
GF-89	Methyl.(%)	83,4	62,2	81,6	84,4	71,5	70,8	67,3	66,9	66,8	67,0	3,0	4,4	2,5	3,0
	SA (%)	0,2	0,3	4,3	4,6	3,0	2,0	6,2	3,1	1,6	4,4	0,8	0,9	2,1	0,6
GF-40	Methyl.(%)	96,1	24,2	81,0	85,4	54,8	30,5	33,7	20,6	23,3	4,5	1,4	3,9	3,0	3,4
	SA (%)	0,5	1,6	3,1	3,8	4,3	3,6	14,8	4,7	3,8	2,0	0,8	1,3	2,2	0,4
GF-107	Methyl.(%)	94,7	72,4	81,9	84,7	86,1	93,9	83,0	8,8	9,4	5,8	2,5	7,1	5,2	1,9
	SA (%)	1,4	2,9	7,5	2,9	6,2	3,5	5,3	2,5	1,1	0,0	0,4	1,6	1,6	1,5
GF-96	Methyl.(%)	51,8	25,5	85,5	86,8	33,2	33,7	43,0	28,2	20,2	21,7	4,1	1,8	5,2	3,7
	SA (%)	2,3	1,4	0,2	3,1	2,2	0,1	0,9	2,1	0,2	0,9	0,7	1,8	1,0	0,3
GF-176	Methyl.(%)	27,1	13,5	42,9	44,9	17,7	16,9	21,9	15,1	10,2	11,3	2,4	1,8	3,1	2,0
	SA (%)	24,8	12,0	42,6	41,9	15,5	16,8	21,0	13,1	10,0	10,4	1,7	0,0	2,1	1,7
GF-179	Methyl.(%)	95,7	23,4	71,3	85,6	54,5	28,1	14,9	21,9	23,5	11,8	2,0	5,9	4,4	5,1
	SA (%)	0,0	1,2	2,0	1,6	7,9	5,3	9,2	2,9	3,8	5,4	0,7	0,8	0,3	0,7
GF-109	Methyl.(%)	87,2	34,0	74,7	77,2	59,9	36,8	41,9	34,8	20,8	37,5	2,9	2,2	3,6	2,5
	SA (%)	4,7	1,2	1,3	1,2	1,8	0,9	0,9	0,2	6,2	0,8	0,5	0,0	0,3	0,7
GF-174	Methyl.(%)	84,6	16,5	50,6	76,0	16,5	13,7	13,0	11,2	14,0	4,9	0,8	2,8	3,3	2,5
	SA (%)	2,9	1,6	4,8	13,0	3,3	1,2	0,7	2,7	1,8	1,1	1,1	0,9	1,4	0,7
GF-177	Methyl.(%)	97,1	50,6	40,3	80,9	20,4	24,5	18,7	61,5	31,1	8,8	2,3	9,7	3,5	3,8
	SA (%)	1,8	4,8	3,7	2,2	2,8	4,5	3,5	7,9	4,1	2,2	1,5	4,2	3,8	0,6
GF-90	Methyl.(%)	92,8	29,5	71,8	94,5	16,5	16,6	21,2	32,2	24,1	3,5	0,9	1,4	2,9	4,6
	SA (%)	3,4	2,2	3,2	5,5	4,1	0,1	0,9	0,7	0,9	0,7	0,9	0,4	0,0	0,8
GF-171	Methyl.(%)	92,0	29,1	71,3	76,4	49,8	32,4	32,6	9,7	9,0	6,1	2,0	2,9	3,2	2,8
	SA (%)	1,5	4,7	3,1	4,2	2,3	4,9	7,1	1,7	1,6	1,9	0,7	0,3	0,2	0,7
GF-104	Methyl.(%)	96,2	7,2	33,0	86,5	5,5	6,8	10,9	3,2	3,5	2,5	1,0	13,4	5,0	1,8
	SA (%)	0,8	1,0	3,3	2,9	1,3	0,7	3,2	0,2	1,2	0,5	0,1	1,4	2,1	0,1
GF-173	Methyl.(%)	95,7	28,1	63,9	87,4	18,5	21,2	15,1	29,7	21,8	3,9	1,6	2,7	4,1	2,4
	SA (%)	0,2	2,0	5,4	2,0	1,6	3,3	1,2	3,1	3,2	0,5	0,3	0,1	1,1	0,6
GF-175	Methyl.(%)	97,2	18,6	36,0	84,8	26,3	14,5	22,0	6,5	4,2	9,2	0,9	4,1	4,2	13,0
	SA (%)	0,9	2,4	6,2	2,6	6,9	0,4	1,3	0,6	0,1	0,2	0,9	0,1	0,7	2,5

**Anhang 14:** Methylierungsdaten aller untersuchten CpG-Dinukleotide in GF aus Vohaut-/Labbia minora-Gewebe. Angegeben ist die Methylierung (Methyl. in %) als Mittelwert aus mindestens zwei Methylierungsanalysen sowie die Standardabweichung (SA in %).

Zelllinie		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	CpG 10	CpG 11	CpG 12	CpG 13	CpG 14
GF-128	Methyl.(%)	94,5	30,7	70,3	84,7	20,7	15,4	15,1	18,4	16,8	2,0	2,5	3,3	4,0	2,5
	SA (%)	0,9	3,7	1,8	1,0	3,4	5,9	2,8	2,7	4,8	0,5	0,6	1,4	0,9	0,4
GF-123	Methyl.(%)	95,9	31,3	79,6	85,9	30,7	20,5	22,9	32,2	29,6	6,7	3,5	5,5	4,0	3,8
	SA (%)	0,6	0,6	7,3	4,3	0,9	0,8	1,1	4,2	2,2	0,3	0,8	1,6	0,3	0,3
GF-121	Methyl.(%)	93,8	32,5	72,6	79,2	33,3	29,1	26,6	36,6	27,1	11,7	2,4	4,0	4,3	3,1
	SA (%)	0,3	3,3	1,9	1,8	1,5	2,5	2,7	2,7	2,3	2,1	0,6	0,9	1,1	0,9
GF-127	Methyl.(%)	96,2	34,0	74,7	83,5	33,6	19,5	18,9	16,8	16,1	4,1	2,6	3,8	5,0	3,2
	SA (%)	0,7	0,2	0,0	2,9	4,8	1,6	2,7	2,6	2,7	0,4	0,1	1,2	0,5	0,7
GF-122	Methyl.(%)	97,7	27,1	69,2	85,7	19,6	15,9	13,8	29,8	26,3	5,5	1,0	4,0	1,2	3,7
	SA (%)	1,8	4,4	4,1	1,8	3,1	7,4	2,4	9,1	11,3	1,8	0,8	1,0	1,6	2,8
GF-126	Methyl.(%)	94,5	26,3	70,4	84,2	28,2	21,1	15,4	16,2	14,5	4,2	1,8	2,9	1,3	2,7
	SA (%)	2,6	4,8	0,3	7,3	1,2	2,7	7,2	0,5	0,8	0,8	0,8	2,9	1,3	1,0
GF-119	Methyl.(%)	95,3	27,9	73,1	83,9	34,0	16,0	17,4	30,9	20,1	11,2	1,4	4,6	2,2	1,7
	SA (%)	3,7	3,1	4,5	2,7	3,6	2,5	8,8	16,3	8,9	5,4	1,5	3,6	1,6	1,2
GF-120	Methyl.(%)	93,5	27,0	64,9	86,7	29,8	15,9	20,0	25,7	25,5	8,7	2,2	2,7	1,6	1,3
	SA (%)	0,5	7,1	0,5	0,2	2,8	0,9	3,4	11,5	9,9	5,2	0,2	2,7	1,6	0,0
GF-124	Methyl.(%)	94,4	33,5	72,5	81,1	25,3	17,8	14,1	20,8	22,1	3,2	0,7	5,7	2,8	1,9
	SA (%)	0,2	3,9	1,1	2,3	3,0	1,6	1,6	5,2	0,8	2,2	1,0	3,2	4,0	0,9
GF-158	Methyl.(%)	96,2	61,3	80,4	90,4	11,2	7,8	10,7	46,8	13,1	4,4	1,5	4,3	2,3	3,1
	SA (%)	0,4	3,7	1,2	2,0	0,8	1,6	1,4	3,8	1,4	1,5	0,6	1,5	1,6	0,5
GF-162	Methyl.(%)	94,6	17,3	80,4	90,5	15,0	9,6	14,0	20,7	17,0	6,6	1,0	2,8	3,8	1,7
	SA (%)	0,4	0,9	0,7	0,2	0,8	1,1	1,1	0,7	1,5	2,5	1,0	0,1	1,1	0,3
GF-160	Methyl.(%)	96,5	24,2	73,2	81,4	22,4	25,3	18,1	25,4	31,2	5,1	1,8	3,1	4,3	1,3
	SA (%)	0,4	2,0	1,7	0,4	0,9	1,9	5,7	3,7	2,1	0,0	0,5	1,2	0,9	0,3
GF-157	Methyl.(%)	95,4	38,0	84,0	84,5	65,8	35,0	23,7	29,3	20,1	14,3	2,2	2,5	2,7	1,4
	SA (%)	1,2	1,4	3,1	2,9	0,9	0,4	6,3	6,1	3,9	5,2	0,0	0,2	0,4	0,3
GF-168	Methyl.(%)	96,7	39,4	82,5	92,8	58,3	24,8	31,0	32,4	34,4	8,7	2,2	6,9	3,3	3,5
	SA (%)	0,2	5,9	0,8	1,0	6,4	0,8	3,0	3,7	5,6	1,4	2,2	6,9	3,3	0,1
GF-159	Methyl.(%)	96,7	25,1	82,7	88,7	64,4	25,7	14,3	5,5	6,7	3,6	1,1	2,3	3,4	2,1
	SA (%)	0,7	2,7	2,0	2,0	2,6	1,0	1,2	2,1	1,0	0,2	0,9	0,4	0,4	0,2
GF-166	Methyl.(%)	62,1	47,1	50,7	79,3	35,6	25,1	61,2	32,5	28,1	13,1	2,9	2,6	3,5	2,7
	SA (%)	0,7	5,0	5,8	6,9	3,6	3,5	2,5	1,6	0,6	2,7	0,5	0,5	0,3	0,5
GF-163	Methyl.(%)	95,8	29,0	72,3	87,9	45,5	25,6	25,9	24,7	12,6	6,7	1,5	2,9	4,2	1,8
	SA (%)	0,2	2,2	0,3	0,5	0,6	1,6	1,4	2,4	9,8	0,1	0,2	0,0	0,7	0,1
GF-164	Methyl.(%)	94,8	47,1	82,4	88,2	63,6	54,3	53,0	43,2	45,5	14,7	6,9	3,9	3,8	2,1
	SA (%)	1,0	7,1	1,1	1,0	6,5	13,9	7,0	1,8	6,5	4,8	5,8	0,7	0,5	0,8

**Anhang 15: Bewilligung des Fortsetzungsantrags durch die Ethikkommission**

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

**ETHIK-KOMMISSION**



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 0431 / 597-18 09  
Telefax 0431 / 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)**

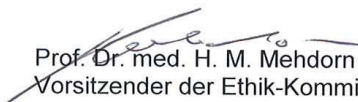
Sehr geehrter Herr Kollege Holterhus,

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 Glönicke  
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

## 10 Danksagung

Nachstehenden Personen möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen, deren Unterstützung diese Dissertation, von der Laborarbeit bis zur schriftlichen Anfertigung und Korrektur, erst möglich gemacht haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus bedanken, der mir durch die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe diese Arbeit ermöglicht hat, sowie für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung während des gesamten Zeitraums dieser Dissertation.

Ein großer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Nadine Hornig für die sehr gute Betreuung und für ein stets offenes Ohr für jegliche Probleme während der Laborarbeit sowie während der schriftlichen Anfertigung.

Martin Ukat danke ich für die gute Laboreinarbeitung.

Brigitte Karwelies und Tanja Stampe danke ich für ihre großen Hilfen und die angenehme Zusammenarbeit im Laboralltag.

Vielen Dank an die Mitarbeiter /-innen des kinderendokrिनologischen Labors, des humangenetischen Labors sowie des kinderonkologischen Labors für ihre Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, deren fortwährende Unterstützung mir in jeglichen Bereichen immer sicher war und ist und ohne die ich nicht bis hierhergekommen wäre.

## 11 Publikationsliste

Inhalte dieser Dissertation wurden als Originalarbeiten publiziert:

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 & Metabolism*, 104(10):4630-4638. [https://doi: 10.1210/jc.2019-00108](https://doi.org/10.1210/jc.2019-00108)

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 & Metabolism*, 103(12), 4617–4627. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2018-00052>

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. 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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(11), 4468–4477. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1990>

Inhalte dieser Dissertation waren Bestandteil folgender Poster:

Hornig, N. C., Demiri, J., Rodens, P., Murga Penas, E. M., Caliebe, A., Schweikert, H.-U., Audi, L., Hiort, O., Werner, R., O., Holterhus, P.-M (2018). Reduced androgen receptor expression in patients with 45,X/46,XY mosaicism. *European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE)*.

Hornig, N. C., Rodens, P., Dörr, H., Hubner, N. C., Kulle, A. E., Schweikert, H.-U., Hiort, O., Werner, R., Gonzalves, S., Eckstein, A. K., Ammerpohl, O., Holterhus, P.-M. (2018). Erhöhte Methylierung im Androgenrezeptor Promotor als Ursache einer Androgenresistenz. *JA-PED – Gemeinsame Jahrestagung der AGPD e. V. und der DGKED e. V.*

Hornig, N. C., Rodens, P., Schweikert, H.-U., Hiort, O., Werner, R., Gonzalves, S., Eckstein, A. K., Ammerpohl, O., Holterhus, P. M. (2016). Androgen insensitivity due to increased methylation in the androgen receptor promoter. *International Congress of Andrology (ICA)*.

Hornig, N. C., Rodens, P., Ukat, M., Demiri, J., Eckstein, A. K., van der Horst, C., Seif, C., Ammerpohl, O., Holterhus, P.-M. (2015). Korrelation von Expression und transkriptioneller Aktivität des Androgenrezeptors in kultivierten menschlichen Genitalhautfibroblasten. JA-PED – Gemeinsame Jahrestagung der AGPD e. V. und der DGKED e. V.