

Aus dem Institut für Biologie  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. E. Hartmann  
und der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting  
der Universität zu Lübeck

**Untersuchung der Transkription von  
Schlüsselenzymen der Sexualsteroidbiosynthese  
in Androgen-abhängigen und -unabhängigen  
Geweben und ihre mögliche Bedeutung für die  
Geschlechtsdifferenzierung des Menschen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
an der Universität zu Lübeck  
**- aus der technisch-naturwissenschaftlichen Fakultät -**

vorgelegt von  
Ute Hoppe  
aus Lübeck  
Lübeck 2006

1. Berichterstatter: ..... Priv.-Doz. Dr. rer. nat. K.U. Kalies

2. Berichterstatter: ..... Prof. Dr. med. O. Hiort

Tag der mündlichen Prüfung: ..... 15.05.2007

Zum Druck genehmigt: ..... Lübeck, den 15.05.2007

gez. Prof. Dr. rer. nat. E. Hartmann

- Dekan der technisch-naturwissenschaftlichen Fakultät -

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungen

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Einführung in die Geschlechtsdeterminierung und Geschlechtsdifferenzierung .....	3
2.2 Die Bedeutung der Geschlechtshormone und ihre Auswirkung auf mögliche Geschlechtsdifferenzierungsstörungen.....	8
2.3 Schlüsselenzyme der Steroidbiosynthese .....	11
2.4 Untersuchungen der Enzyme und des AR in unterschiedlichen Geweben und Zellkulturen.....	19
2.5 Fragestellung .....	21
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1 Material .....	23
3.1.1 Geräte und Zubehör .....	23
3.1.2 Kommerzielle Gebrauchslösungen und Chemikalien .....	24
3.1.3 Kits .....	26
3.1.4 Einmalartikel.....	26
3.1.5 Molekularbiologische Reagenzien .....	27
3.1.6 Reagenzien für die Zellkultur .....	27
3.1.7 Lösungen für die Arbeit mit PCR-Produkten .....	28
3.1.8 Lösungen für RNA-Arbeiten.....	28
3.1.9 Gewebe- und Zellkulturproben.....	30
3.1.10 Primer.....	37
3.2 Labormethoden .....	39
3.2.1 Zellen .....	39

3.2.1.1	Anzüchtung der Primärkulturen.....	39
3.2.1.2	Bebrütung und Fütterung der Zellen.....	40
3.2.1.3	Trypsinierung (Passagierung) der Fibroblasten.....	40
3.2.1.4	Einfrieren und Lagerung von Zellkulturen.....	40
3.2.1.5	Auftauen von Zellkulturen .....	40
3.2.2	RNA Extraktion aus Zellen.....	41
3.2.3	Extraktion der Blut-RNA.....	42
3.2.4	Prüfung von Qualität und Quantität der isolierten RNA .....	42
3.2.5	cDNA-Erststrangsynthese (RT-PCR).....	43
3.2.6	Relative Quantifizierung.....	44
3.2.6.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
3.2.6.2	Real-Time PCR.....	44
3.2.6.3	LightCycler-RT-PCR .....	45
3.2.6.4	Das Fluoreszenzformat: SYBR Green I.....	47
3.2.6.5	Das Haushaltsgen ( <i>Housekeeping-Gen</i> , Referenzgen).....	48
3.2.6.6	Der cDNA-Standard und -Kalibrator .....	49
3.2.6.7	Erstellung der Standardkurven.....	50
3.2.6.8	Relative Quantifizierung mittels Real-Time PCR .....	51
3.2.6.9	Auswertung mit der Relativen Quantifizierungs Software .....	52
3.2.7	Sequenzierung der PCR-Produkte .....	53
3.2.8	Statistische Auswertung und Darstellung der Daten .....	56

#### **4 Ergebnisse** **58**

4.1	Das Haushaltsgen: die Porphobilinogen Deaminase .....	58
4.2	Amplifikation der untersuchten Gene und des Haushaltsgens .....	58
4.3	Vergleich der Transkriptionsprofile in den Normalkontrollen .....	60
4.3.1	Transkriptionsnachweis der Gene in der RNA aus Blutzellen .....	60
4.3.1.1	Keine geschlechts- jedoch eine altersabhängige	

	Veränderung im Transkriptionsprofil.....	61
4.3.2	Nachweis aller untersuchten Gene in der RNA aus Genitalhautfibroblastenproben.....	63
4.3.2.1	Überprüfung der altersabhängigen Transkription in Genitalhautfibroblasten .....	63
4.3.3	Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der Blut- und Genitalhautfibroblasten-RNA .....	66
4.3.4	Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der hVHF- und Skrotalhautfibroblastenproben .....	70
4.3.5	Hohe interindividuelle Variationsschwankungen in der Transkription der Gene .....	72
4.4	Untersuchung der Transkriptionsprofile von Patienten mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung.....	74
4.4.1	Veränderte Transkriptionsprofile einzelner Enzyme bei Patienten mit einer Hypospadie ungeklärter Ursache .....	74
4.4.2	Patienten mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung bekannter Ursache .....	79
4.4.2.1	RNA aus peripheren Blutzellen .....	79
4.4.2.2	RNA aus hVHF- und Skrotalhautfibroblasten .....	82
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>127</b>
	Hypospadieabbildung .....	127
<b>8</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>128</b>

## Abkürzungen

A	Androstendion
AIS	Androgen-Insensitivitäts Syndrom
AGS	Adrenogenitales Syndrom
AKR	Aldo-Ketoreduktase
AMH	Anti-Müller Hormon
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen-responsives Element
AS	Aminosäure
CAIS	komplettes Androgen-Insensitivitäts Syndrom
cDNA	complementary DNA
CP	Crossing Point
DEPC-H <sub>2</sub> O	mit Diethyl-Pyrocbonat versetztes Wasser
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E <sub>1</sub>	Östron
E <sub>2</sub>	Östradiol
hCG	humanes Choriongonadotropin
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase
HRE	Hormon responsives Element
HSD17B	Gen der 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase
HSP	Hitzeschockprotein
hVHF	humane Vorhautfibroblasten
J	Jahr
kD	Kilo-Dalton

LCH	Leydig-Zell-Hypoplasie
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Monat
MAIS	minimales Androgen-Insensitivitäts Syndrom
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MRNA	messenger-RNA
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenindinucleotid
NADP(H)	Nicotinamid-Adenindinucleotidphosphat
NTP	Nukleosidtriphosphat
NM	Blut-Normalkontrollen von Männern
NW	Blut-Normalkontrollen von Frauen
PAIS	partiellies Androgen-Insensitivitäts Syndrom
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SRD5A	Gen der 5alpha-Reduktase
SRY	Sex Determining Region of the Y-chromosome
T	Testosteron
U/min	Umdrehung pro Minute
17β-HSD	17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase
5αR	5alpha-Reduktase

## 1 Zusammenfassung

Die Metabolisierung von Sexualsteroiden ist für eine normale Geschlechtsentwicklung von großer Bedeutung. Bisher ist jedoch nur wenig über eine gewebespezifische extragonadale Steroidbiosynthese bekannt. Um neue Erkenntnisse zu erlangen, ist es sinnvoll, mehr über die Expression katalytisch wirkender Enzyme der Sexualsteroidbiosynthese zu erfahren. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die Transkriptionsprofile der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) Typ 1, 2, 3, 4, 5, 7 und 10, der 5 $\alpha$ -Reduktase (5 $\alpha$ R) Typ 1 und 2 sowie des Androgenrezeptors in der RNA aus peripheren Blutzellen, aus Vorhautfibroblastenproben (hVHF) und aus Skrotalhautfibroblastenproben von gesunden Kontrollpersonen und von Patienten mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung mittels relativer Quantifizierung durch Real-Time-RT-PCR erstellt und diese miteinander verglichen. Die mRNA-Expression aller Gene konnte in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden, nur das Transkript der 17 $\beta$ -HSD 2 war in den Blut-RNA-Proben nicht detektierbar. Ein Vergleich der ermittelten Transkriptionsprofile zwischen den Blutproben, den Vorhaut- und den Skrotalhautfibroblastenproben von gesunden Normalkontrollen ergab eine sehr lokalisationspezifische mRNA-Expression der Gene. Interindividuell wurden jedoch große Unterschiede in den Transkriptionsmustern der Gene in allen Proben deutlich. Eine geschlechtsspezifische mRNA-Expression der Gene in den Blutproben von gesunden Männern und Frauen konnte nicht aufgezeigt werden, jedoch fanden sich signifikante alterspezifische Transkriptionsunterschiede für die 5 $\alpha$ R2 in den hVHF-Proben und der 17 $\beta$ -HSD 5 in den Skrotalhautfibroblastenproben. Ein Vergleich der Transkriptionsprofile von Proben gesunder Normalkontrollen mit den Proben der unterschiedlichen Patientengruppen mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung zeigte Abweichungen in den Transkriptionsmustern einiger Gene. Die stärksten Schwankungen zeigten sich dabei in der Gruppe der Hypospadiepatienten für die Transkription der 17 $\beta$ -HSD 5 und dem Androgenrezeptor, was auf eine veränderte Androgenmetabolisierung hinweisen könnte. Mögliche Erklärungen für diese Veränderungen des Transkriptionsmusters können sowohl monogenische Störungen wie auch epigenetische Phänomene sein. Ein Kompensationsmechanismus, um die gestörte T-Synthese auszugleichen, wäre ebenfalls

denkbar. Die auffälligen Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der Gene zwischen den Proben gesunder Kontrollpersonen und den Patientenproben sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass diese Gene einen Einfluss auf eine normale Geschlechtsdifferenzierung haben könnten. Die zum Teil jedoch sehr geringe Probenanzahl der unterschiedlichen Patientengruppen mit einer bekannten Diagnose macht es schwer, die ermittelten Transkriptionsunterschiede bezüglich eines ursächlichen Zusammenhanges zu beurteilen. Hiefür wird es vielmehr notwendig sein, weitere Versuche mit einer weitaus größeren Probenanzahl durchzuführen, um die erzielten Ergebnisse verifizieren zu können. Zukünftige Untersuchungen sollten zum einen auf die Steroidmetabolisierung in den Geweben fokussieren und, wenn möglich, die Proteinexpression der untersuchten Gene mit einbeziehen.

## 2 Einleitung

Das Geschlecht eines Menschen wird mit der Entwicklung der Gonaden zu Hoden oder Ovarien determiniert. Der endgültige geschlechtliche Phänotyp jedes einzelnen Menschen unterliegt jedoch sehr unterschiedlichen Einflüssen. Dabei spielen die Sexualhormone (Androgene und Östrogene) eine entscheidende Rolle. Die genauen molekularbiologischen Zusammenhänge, hinsichtlich der Wirkungsvermittlung dieser Hormone, sind bisher jedoch nicht im Detail bekannt. Um die unterschiedlichen regulatorischen Einflüsse der Sexualhormone besser verstehen zu können, ist es notwendig, mehr über ihre katalytisch wirksamen Enzyme zu erfahren. In dieser Arbeit wurden neun dieser Schlüsselenzyme sowie der Androgenrezeptor auf Transkriptionsebene in der RNA von Patienten mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung sowie von Personen ohne Auffälligkeit in der Geschlechtsdifferenzierung untersucht. Hierzu wurde die RNA aus Blut und aus Genitalhautfibroblasten, die aus zwei unterschiedlichen Gewebelokalisationen entstammten, verwendet. Ein Vergleich der erstellten Transkriptionsprofile sollte neue Erkenntnisse über das katalytische Wirkungsspektrum der untersuchten Enzyme liefern.

### 2.1 Einführung in die Geschlechtsdeterminierung und Geschlechtsdifferenzierung

In der Geschlechtsdifferenzierung spielen unterschiedliche Faktoren eine Rolle. Bei der Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium kommt es zur Verschmelzung des jeweils haploiden weiblichen und männlichen Chromosomensatzes. Hierbei enthält die Eizelle als Gonosom (Geschlechtschromosom) ein X-Chromosom und das männliche Spermium entweder ein X- oder ein Y-Chromosom und dieses legt somit das chromosomale Geschlecht fest, wobei 46,XX für ein weibliches und 46,XY für ein männliches Kerngeschlecht steht.

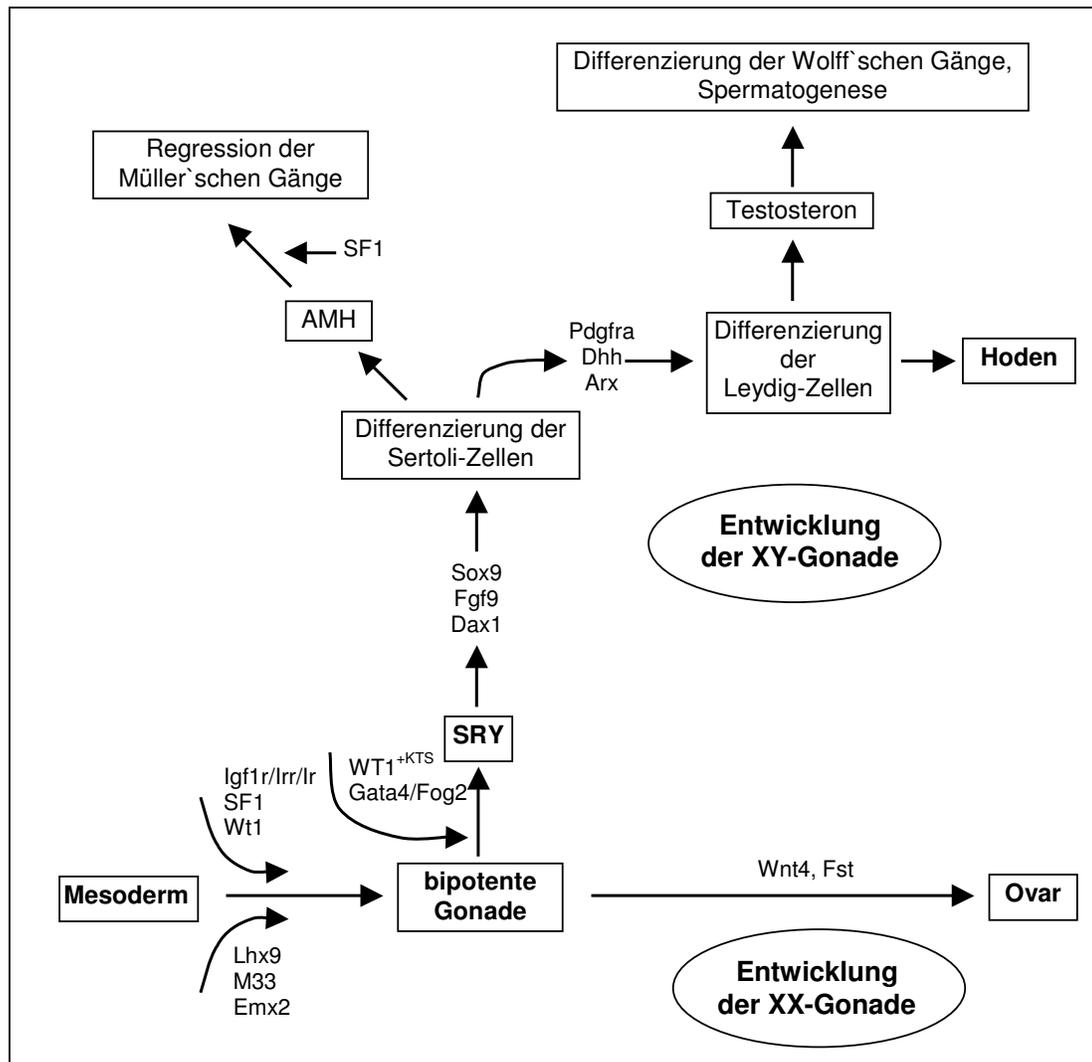
Unabhängig vom chromosomalen Geschlecht entsteht im Laufe der embryonalen Entwicklung bereits in den ersten Schwangerschaftswochen aus dem mittleren Teil des sich differenzierenden Mesoderms der Mesonephros (die Urniere). Auf der medialen Oberfläche des Mesonephrons entwickeln sich nach Einwanderung der Urkeimzellen aus dem Entoderm und durch Abschnürung der paarigen

Genitalleisten (oder Genitalfalten) die Gonadenanlagen (Fioroni, 1987). Für die Bildung dieser ersten noch bipotenten Gonaden sind unterschiedliche Gene notwendig (Abb. 1). Von den Genen *Wt1* (Wilms-Tumor), *Sf1* (steroidogenic factor 1), *Lhx9* (LIM Homeobox Protein 9), *M33* (Chromobox Homolog 2 (*Cbx2*)), *Emx2* (empty spiracles homologue 2) sowie den drei Insulinrezeptor-Genen *Igf1r* (insulin-like growth factor 1 receptor), *Ir* (Insulin Rezeptor) und *Irr* (insulin receptor-related receptor), weiß man, dass sie für die Zellproliferation erforderlich sind und die Apoptose inhibieren (Abb. 1) (Ahmed und Hughes, 2002; Brennan und Capel, 2004; Sinisi *et al.*, 2003).

Für die Entwicklung der Hoden ist zu diesem Zeitpunkt das Vorhandensein des Y-Chromosoms von maßgeblicher Bedeutung. Auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms liegt das *SRY*-Gen (Sex Determining Region of the Y-chromosome). Die Expression dieses Gens ist der erste entscheidende Unterschied in der Fortentwicklung der bislang bipotenten Gonaden und der Start für die Entstehung der Hoden. Bisher sind drei Transkriptionsfaktoren bzw. Kofaktoren: *WT1+KTS* (Wilms-Tumor Isoform), *GATA4* (GATA binding protein 4) und *FOG2* (zinc finger protein, multitype 2 (*Zfp2*)) bekannt, die einen transkriptionalen oder posttranskriptionalen Einfluss auf die Regulation des *SRY*-Gens haben (Abb. 1) (Brennan und Capel, 2004). *SRY* wiederum aktiviert die Expression von *Sox9* (*SRY*-like HMG-box protein 9), welches zusammen mit *Fgf9* (fibroblast growth factor 9) und *Dax1* (nuclear receptor subfamily 0, B1 (*Nr0b1*)) die Proliferation und Differenzierung der Sertoli-Zellen einleitet. Die Sertoli-Zellen unterstützen im Hoden nicht nur das Wachstum und die Reifung der Keimzellen, sondern sie produzieren etwa ab der 7. bis 8. Schwangerschaftswoche das AMH (Anti-Müller Hormon). Das AMH induziert die Rückbildung der Müller'schen Gänge und wird wahrscheinlich wiederum durch den *SF1* beeinflusst.

In den Leydig-Zellen der Hoden findet die Testosteron (T)-Synthese statt. Über die Differenzierung der Leydig-Zellen ist bisher nur bekannt, dass sie wahrscheinlich über unterschiedliche Signalwege aus multipotenten, undifferenzierten, mesenchymalen Vorläuferzellen im Interstitium des Hodens gebildet werden (Haider, 2004). Von den drei Faktoren *Pdgfr $\alpha$*  (platelet-derived growth factor receptor alpha), *Dhh* (desert hedgehog) und *Arx* (aristaless related homeobox) ist bekannt, dass sie einen Einfluss auf die frühe Leydig-Zell-Differenzierung und Ausbreitung haben (Brennan und Capel, 2004). Es wird davon ausgegangen, dass

die Proliferation der Leydig-Zellen im Menschen in drei Phasen unterteilt ist: die erste Phase liegt zwischen der 14. bis 19. Schwangerschaftswoche, die zweite zwischen dem zweiten bis dritten Monat post partum und die dritte beginnt in der Pubertät und überdauert das restliche Leben (Haider, 2004; Prince, 2001).



**Abb. 1: Die genetischen Einflüsse auf die Gonadendifferenzierung im Embryo.** Die Wirkung von unterschiedlichen Faktoren (SF1, WT1, Lhx9, M33, Emx2 und Igf1r/Irr/Ir) ist für die Bildung der bipotenten Gonade aus dem mittleren Mesoderm notwendig. Die Entwicklung zur XY-Gonade verläuft über das SRY-Gen, dessen Expression von den Faktoren WT1+KTS, Gata4 und Fog2 reguliert wird. SRY wiederum reguliert die Expression von Sox9, welches zusammen mit Dax1 und Fgf9 verantwortlich für die Proliferation und Differenzierung der Sertoli-Zellen ist, die das AMH synthetisieren. AMH leitet wahrscheinlich zusammen mit dem SF1 die Regression der Müller'schen Gänge ein. Die Differenzierung der Leydig-Zellen, welche für die Synthese von

Testosteron verantwortlich sind, wird unter anderem von den Faktoren *Pdgfr $\alpha$* , *Dhh* und *Arx* beeinflusst. Über die Entwicklung der XX-Gonaden ist bislang wenig bekannt. Die Faktoren *Wnt4* und *Fst* scheinen jedoch einen Einfluss auf die Ovarienstehung zu haben. AMH: Anti-Müller Hormon; *Arx*: aristaless related homeobox; *Dax1*: nuclear receptor subfamily 0, B1 (*Nr0b1*); *Dhh*: desert hedgehog; *Emx2*: empty spiracles homologue 2; *Fgf9*: fibroblast growth factor 9; *Fog2*: zinc finger protein, multitype 2 (*Zfp2*); *Fst*: follistatin; *Gata4*: GATA binding protein 4; *Igf1r*: insulin-like growth factor 1 receptor; *Ir*: Insulin Rezeptor; *Irr*: insulin receptor-related receptor; *Lhx9*: LIM Homeobox Protein 9; *M33*: Chromobox Homolog 2 (*Cbx2*); *Pdgfr $\alpha$* : platelet-derived growth factor receptor alpha; *SF1*: steroidogenic factor 1; *Sox9*: SRY-like HMG-box protein 9; *SRY*: sex determining region of the Y-chromosome; *Wnt4*: wingless-related MMTV integration site 4; *WT1*: Wilms-Tumor; *WT1+KTS*: Wilms-Tumor Isoform.

(Die Abbildung wurde nach Brennan und Capel (2004) verändert)

Entsprechend der Hauptfunktion der Leydig-Zellen sind die drei Phasen immer mit einer gesteigerten Synthese des Hormons T verbunden, welche im Folgenden noch genauer beschrieben werden.

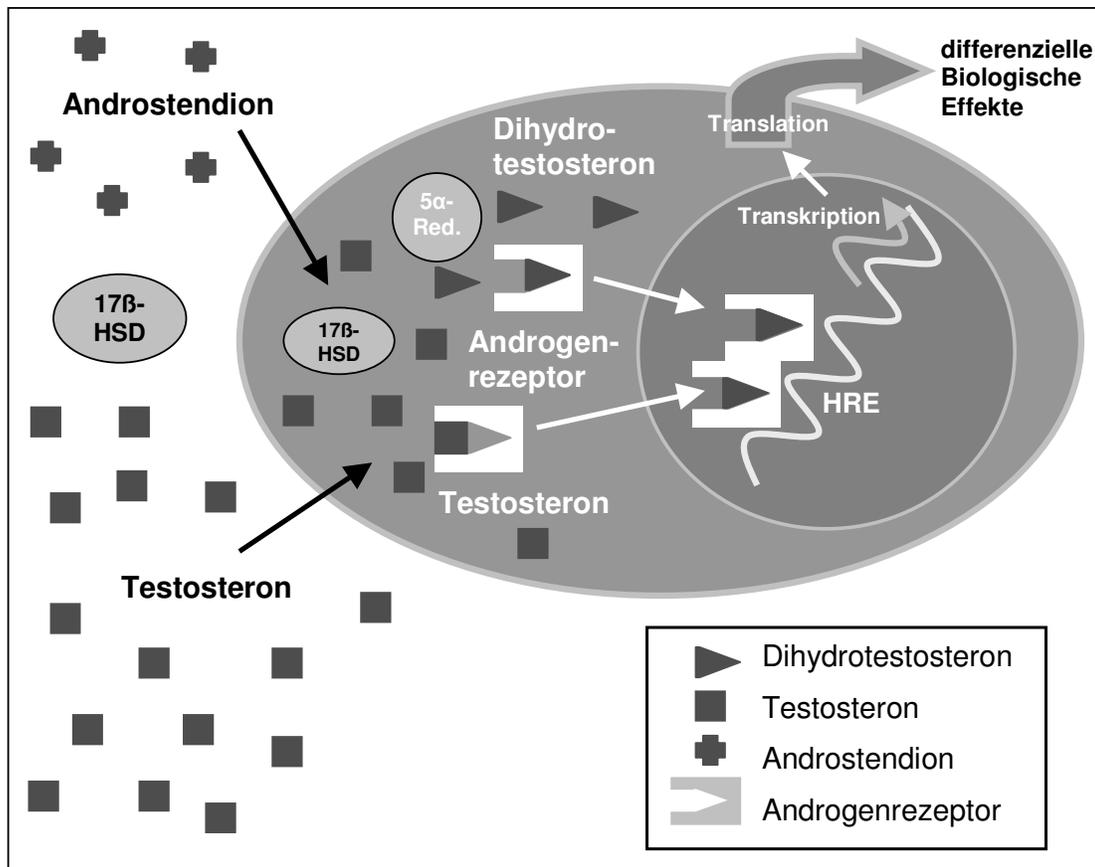
Über den genauen Ablauf der Entwicklung der Ovarien ist bisher erst sehr wenig bekannt. Man weiß, dass *SRY* zu einem genauen Zeitpunkt und in einer ausreichenden Menge in der embryonalen Entwicklung exprimiert werden muss, um die weibliche Gonadenentwicklung zu unterdrücken.

Die T-Synthese in den Leydig-Zellen des Hodens wird während der Embryonalzeit durch das plazentale Hormon hCG (humane Choriongonadotropin) stimuliert. Später wird diese Aufgabe durch das Luteinisierende Hormon (LH) vom Feten selbst übernommen (Warne *et al.*, 2002). Die Ausschüttung des LHs findet in den vorderen und mittleren Anteilen des Hypophysenvorderlappens statt und wird durch das LHRH (Luteinising Hormone Releasing Hormone) reguliert. Beide Hormone (hCG und LH) wirken über den LH-Rezeptor (Saez, 1994). Durch das vor allem im Hoden synthetisierte T werden nun weitere Virilisierungsvorgänge eingeleitet. So entstehen aus den Wolff'schen Gängen die Samenbläschen (*Vesicula seminalis*), die Samenleiter (*Ductus deferentes*) und die Nebenhoden (*Epididymis*). T ist ebenfalls verantwortlich für die Initiation und Aufrechterhaltung der Spermatogenese in den Hoden (Ahmed und Hughes, 2002; Hiort und Holterhus, 2000; Sinisi *et al.*, 2003).

Das gebildete T gelangt über das Blut zu seinen Zielorganen. Im Blut ist das T zu etwa 45% spezifisch an das Sexualhormon-bindende-Globulin (SHBG) gekoppelt

und zu ca. 55% unspezifisch an Albumin gebunden (siehe hierzu: <http://www.charite.de/ilp/routine/referenzdb/45804.htm>). Nur etwa 2% des T zirkulieren ungebunden im Plasma und sind biologisch aktiv. Die Dissoziation des T von den entsprechenden Transportproteinen erfolgt in den androgenabhängigen Organen. Dort gelangt das T autonom als lipophiles Molekül durch Diffusion in das Zytoplasma der Zielzellen. Im Zytoplasma kommt es dann zu einer Komplexbildung mit dem Androgenrezeptor (AR). Dieser weist eine für Androgene hochaffine Hormonbindungsdomäne auf. Des Weiteren sind unterschiedliche Hitzeschockproteine (HSP) wie das HSP 90, HSP 70 und HSP 56 (Rezeptor-assoziierte Proteine) am AR gebunden, welche wahrscheinlich die Ligandenaffinität erhöhen (Fang *et al.*, 1996; Gobinet *et al.*, 2002; Veldscholte *et al.*, 1992). Eine Androgenbindung an die Hormon-Bindungsdomäne führt zur Abspaltung der HSPs vom AR und zu einer sterischen Konformationsänderung des Rezeptors. Durch ebenfalls stattfindende Phosphorylierungsvorgänge wird der AR aktiviert und gelangt als Hormon-Rezeptor-Komplex in den Zellkern, wo es aufgrund einer antiparallelen Anlagerung von zwei aktivierten Hormon-Rezeptor-Komplexen zu einer Homodimerbildung kommt. Die Homodimere binden mit ihrer DNA-Bindungsdomäne an Hormon-responsive Elemente (HRE) der Promotorregionen von androgenregulierten Genen und aktivieren somit deren Transkription (Hiort und Holterhus, 2000) (Abb. 2).

In den peripheren Organen (wie dem *Sinus urogenitalis* und den Genitalfalten und -höcker) findet die Synthese des noch potenteren Hormons Dihydrotestosteron (DHT) aus T statt, welches im Embryo für die Entwicklung der (sekundären) externen männlichen Geschlechtsorganen wie Penis und Skrotum sowie für das Wachstum der Prostata verantwortlich ist. Die Reduktion von T zu DHT findet dort direkt am AR statt (Kaufman *et al.*, 1993), wobei der AR wahrscheinlich zuvor einen Komplex mit dem Enzym 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2 (5 $\alpha$ R2) bildet, welches die Konversion von T zu DHT katalysiert.

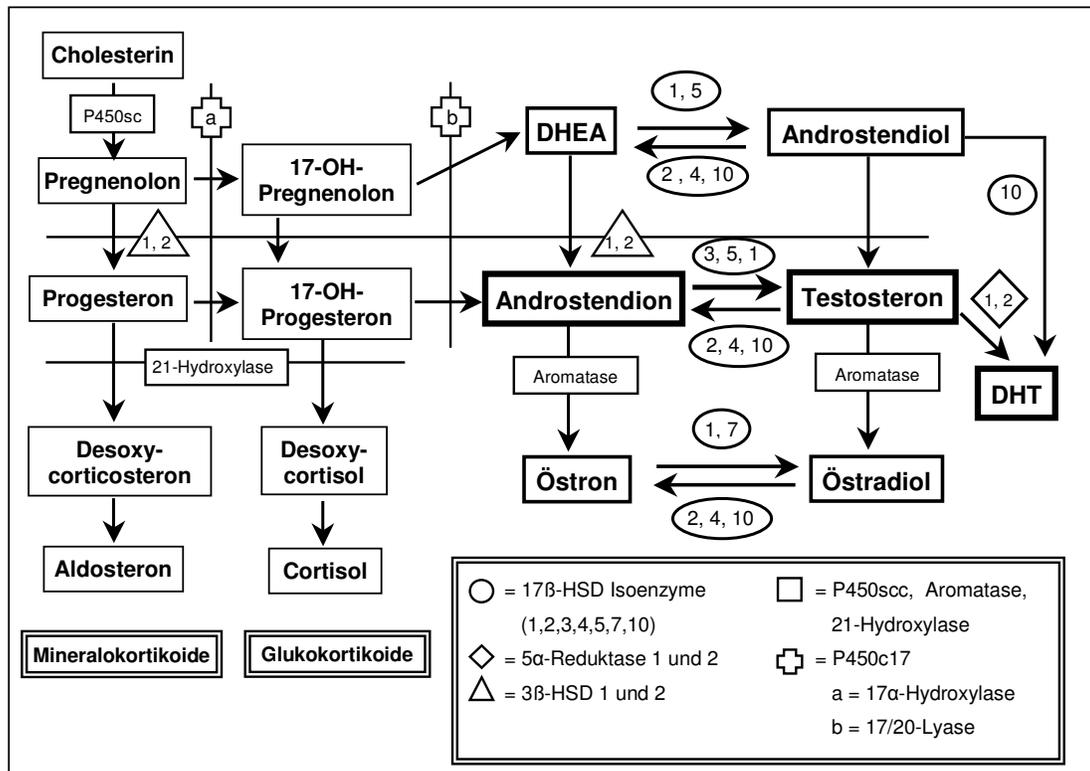


**Abb. 2: Schematische Darstellung des molekularen Wirkmechanismus der Androgene über den AR** (Erläuterung siehe Text). Die Androgene DHT und T, Androstendion und der Androgenrezeptor sind durch Symbole dargestellt.

## 2.2 Die Bedeutung der Geschlechtshormone und ihre Auswirkung auf mögliche Geschlechtsdifferenzierungsstörungen

T und DHT gehören zu den androgenen C19 Steroidhormonen. Ihre Synthese erfolgt im Inneren der Mitochondrien aus Cholesterin und ist eng mit der Mineralo- und Glukokortikoidsynthese gekoppelt (Abb. 3). Der Großteil des im Körper vorhandenen T wird in den Hoden aus Androstendion synthetisiert. Katalysiert wird diese Reaktion im Hoden durch ein Isoenzym der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD). Die Konversion des DHT erfolgt in den entsprechenden Organen durch ein Isoenzym der 5 $\alpha$ -Reduktase (5 $\alpha$ R) aus T (siehe Abschnitt 2.1). Alle androgenen Steroidhormone wirken über den gleichen Androgenrezeptor (AR).

Die Androgenmetabolisierung und -wirkungsweise sind von großer Bedeutung für die männliche Geschlechtsentwicklung. Liegt in dem Gen des AR eine Mutation vor oder kann eines der Hormone T oder DHT nicht ausreichend oder überhaupt nicht synthetisiert werden, da das entsprechende Enzym einen Defekt aufweist, so kommt es bei den betroffenen 46,XY Personen zu Geschlechtsdifferenzierungsstörungen.

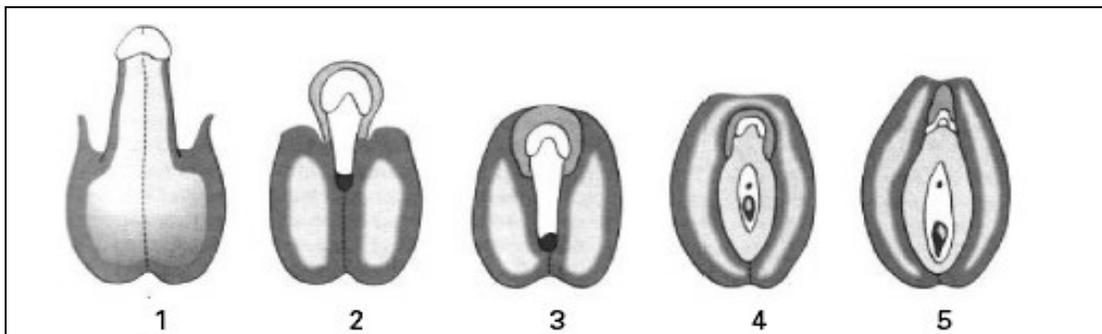


**Abb. 3: Die Sexualsteroidbiosynthese und ihre Enzyme.** Die bislang bekannten katalytischen Funktionen der untersuchten 17β-HSD und 5α-Reduktase Isoenzyme im Sexualsteroidmetabolismus sind dargestellt. Durch unterschiedliche Symbole und Nummern sind die einzelnen Enzyme und ihre Isoenzyme gekennzeichnet. Die für die Enzyme verwendeten Symbole werden in der Legende erklärt. DHEA: Dehydroepiandrosteron; DHT: Dihydrotestosteron; 3/17β-HSD: 3/17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase; P450scc: P450 side chain cleavage.

Die phänotypische Ausprägung solcher Defekte kann sehr unterschiedlich ausfallen. Durch eine Mutation im AR-Gen kann es zu einer verminderten bis fehlenden Wirkungsübertragung kommen, hierbei spricht man von einer Androgenresistenz oder einem Androgen-Insensitivitäts Syndrom (AIS) (Hiort und Zitzmann, 2004). Die Virilisierung sowohl der inneren als auch der äußeren

Geschlechtsorgane und Geschlechtsmerkmale kann dabei unterschiedlich stark beeinträchtigt sein (Sinnecker *et al.*, 1997) (Abb. 4). Der äußere Phänotyp kann zwischen eindeutig männlich (MAIS = minimales AIS) und eindeutig weiblich (CAIS = komplettes AIS) liegen. Es ist möglich, dass die gleiche Mutation innerhalb einer Familie sehr unterschiedliche phänotypische Ausprägungen zwischen MAIS und PAIS aufweisen (Holterhus *et al.* 2000).

Eine Mutation in der 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2 (5 $\alpha$ R2) führt zu einer verringerten bis ausbleibenden Synthese von DHT. Bei einem solchen Defekt entwickeln sich die Wolff'schen Strukturen normal, jedoch die Ausbildung der externen Geschlechtsmerkmale weist Störungen auf. Betroffene können dabei ebenfalls sehr unterschiedliche phänotypische Ausprägungen aufweisen (Sinnecker *et al.*, 1996; Sobel *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 1993).



**Abb. 4:** Klinische Einteilung des Geschlechtsphänotyps (von 1 einem phänotypisch männlichen Geschlecht bis 5 einem phänotypisch weiblichen Geschlecht) nach Sinnecker *et al.* (1997).

Für die Bildung von T in den Hoden ist das Isoenzym Typ 3 der 17 $\beta$ -HSD maßgeblich verantwortlich. Bei einem Defekt der 17 $\beta$ -HSD3 kommt es aufgrund des sehr niedrigen Testosteronspiegels ebenfalls zu ausgeprägten Virilisierungsstörungen. Betroffene 46,XY Personen weisen einen äußeren nahezu vollständig weiblichen Phänotyp auf. Das innere Genitale ist jedoch rein männlich (Andersson *et al.*, 1996; Boehmer *et al.*, 1999; Geissler *et al.*, 1994; Twosten *et al.*, 2000). Obwohl die Hoden keine ausreichenden Mengen an T synthetisieren können, sind die T abhängigen Wolff'schen Strukturen ausgebildet. Diese Androgenwirkung lässt auf eine mögliche extragonadale Androgensynthese schließen, die über ein anderes Enzym als die 17 $\beta$ -HSD3 katalysiert werden muss.

Die typisch weiblichen Müller'schen Strukturen sind bei allen der beschriebenen Defekte nicht ausgebildet, woraus man auf eine ungestörte Synthese des AMH durch die Sertoli-Zellen des Hodens schließen kann.

Bei Personen mit einem 5 $\alpha$ -Reduktase- oder 17 $\beta$ -HSD-Defekt kommt es in der Pubertät zu unterschiedlich stark ausgeprägten irreversiblen Virilisierungszeichen (z. B. Stimmbruch, Klitorishypertrophie). Die Virilisierung betrifft jedoch nur Personen, denen zum Zeitpunkt der Pubertät die Gonaden noch nicht entnommen worden sind und die Androgenwirkung somit auf eine gonadale Androgensynthese schließen lässt, die wiederum nicht durch die 17 $\beta$ -HSD3 reguliert sein kann. Eine weibliche Brustentwicklung tritt aufgrund der niedrigen Östrogenwerte meist nicht auf und das Einsetzen der Regelblutung bleibt bei den Betroffenen aus (primäre Amenorrhoe).

### 2.3 Schlüsselenzyme der Steroidbiosynthese

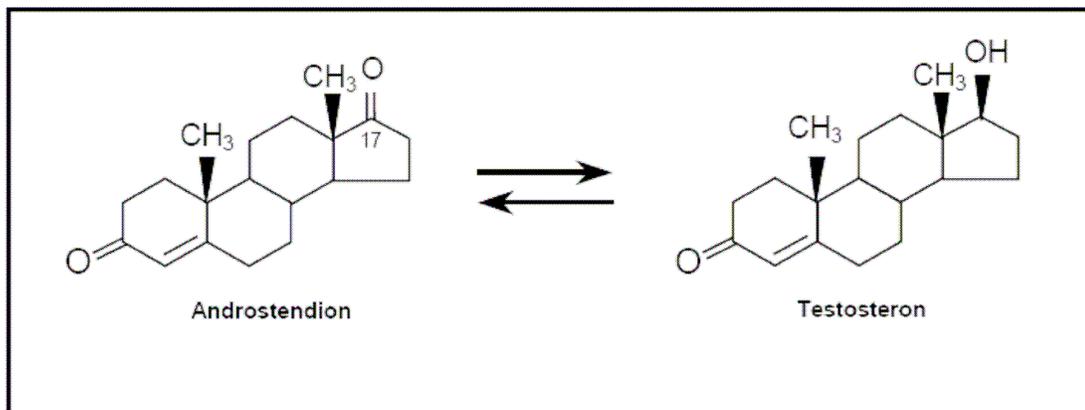
Unterschiedliche Enzyme sind in der Sexualsteroidbiosynthese für die Synthese und Deaktivierung der Steroide notwendig. Die Isoenzyme der 17 $\beta$ -HSD und der 5 $\alpha$ R übernehmen hierbei Schlüsselrollen.

Es sind bisher 13 Isoenzyme mit 17 $\beta$ -HSD Aktivität kloniert (Tab. 1) (Adamski und Jakob, 2001; Baker, 2001; Chai *et al.*, 2003; He *et al.*, 2001; Luu-The, 2001; Mindnich *et al.*, 2004; Napoli, 2001). Bis auf das Isoenzym Typ 5 werden alle anderen 17 $\beta$ -HSD Isoenzyme zu den Kurz-Ketten-Dehydrogenasen gezählt (Mindnich *et al.*, 2004; Penning, 1997). Bei der Familie der Kurz-Ketten-Dehydrogenasen handelt es sich um multimere Proteine, die Monomere mit einer Größe von 25 Kilo-Dalton (kD) beinhalten. Sie weisen eine Rossmann-Faltung ( $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ )<sub>2</sub> für die Kofaktorbindung auf (Oppermann *et al.*, 2003), die in einer *syn*-Konformation binden. Diese Proteine katalysieren einen 4-pro-S-Hydrid Transfer und besitzen alle das konservierte katalytische Motiv Tyr-X-X-X-Lys (Penning *et al.*, 2001). Die Benennung der Isoenzyme erfolgte in der Reihenfolge der Chronologie ihrer Klonierung. Es besteht zwischen den einzelnen Isoenzymen mit etwa 20% nur eine sehr geringe Sequenz-Homologie (Dufort *et al.*, 1999; Mindnich *et al.*, 2004), so dass man nicht von einem gemeinsamen Ursprung ausgehen

kann. Sie weisen jedoch alle eine ähnliche katalytische Aktivität auf (Luu-The *et al.*, 2001).

Die 17 $\beta$ -HSD-Isoenzyme katalysieren Redox-Reaktionen. Hierzu werden als Kofaktoren NADP(H) und NAD<sup>+</sup> benötigt. Isoenzyme, die NADP(H) als Kofaktor benötigen, begünstigen Reduktionen und spielen bei der Synthese von Androgenen und Östrogenen eine Rolle (z. B. Typ 1, 3, 5, 7). Die Isoenzyme Typ 2, 4, 6, 9 und 10 hingegen katalysieren Oxidationen, wofür sie NAD<sup>+</sup> benötigen (Abb. 3 und Tab. 1 a-c) (Mindnich *et al.*, 2004).

Für die männliche Geschlechtsentwicklung von besonderer Bedeutung ist das Isoenzym Typ 3 der 17 $\beta$ -HSD, da es bei einer Mutation im korrespondierenden Gen HSD17B3 dieses Isoenzym zum 17 $\beta$ -HSD-Mangel kommt und damit zu einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung bei einem 46,XY-Karyotyp (Geissler *et al.*, 1994) (siehe Abschnitt 2.2). Vornehmlich wird die 17 $\beta$ -HSD Typ 3 in den Leydig-Zellen des Hodens exprimiert, wo sie für die Synthese des Testosterons aus Androstendion verantwortlich ist (Andersson und Moghrabe, 1997; Labrie *et al.*, 1997; Luu-The *et al.*, 1995) (Abb. 5). Das Isoenzym konnte jedoch auch schon in anderen Geweben, wie dem Gehirn (Steckelbrock *et al.*, 1999; Stoffel-Wagner *et al.*, 1999), dem Fettgewebe (Corbould *et al.*, 2002) und im Prostatakarzinom (Koh *et al.*, 2002) nachgewiesen werden.



**Abb. 5:** Strukturformeln von Androstendion und Testosteron

Die 17 $\beta$ -HSD Typ 5 gehört als einziges Isoenzym der 17 $\beta$ -HSDs zu der Superfamilie der Aldo-Ketoreduktasen (AKR) und wird formell als AKR1C3 bezeichnet. Sie ist identisch mit der 3 $\alpha$ -HSD Typ 2 (Penning *et al.*, 2000; Penning *et al.*, 2001).

Proteine der AKR sind Monomere mit einer Größe von 37 kD. Sie weisen alle eine TIM-barrel Struktur ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> mit einer ausgedehnten *anti*-Konformation Kofaktorbinding auf. AKRs katalysieren einen 4-pro-*R*-Hydrid Transfer und besitzen alle eine konservierte katalytische Tetrade mit dem Motiv Tyr55, Lys84, Asp50, His117 (Penning *et al.*, 2001).

Bei den humanen AKRs: 20 $\alpha$ -HSD (AKR1C1), 3 $\alpha$ -HSD Typ 3 (AKR1C2), 17 $\beta$ -HSD Typ 5 oder 3 $\alpha$ -HSD Typ 2 (AKR1C3) und 3 $\alpha$ -HSD Typ 1 (AKR1C4) liegt mit etwa 86% eine sehr große Sequenzübereinstimmung vor (Dufort *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004), wobei sie jedoch sehr unterschiedliche Reaktionen katalysieren (Luu-The *et al.*, 2001).

Da das Isoenzym Typ 5 der 17 $\beta$ -HSD ebenfalls die Synthese von T aus Androstendion katalysiert, gewinnt es im Zusammenhang mit Untersuchungen auf eine mögliche extragonadale, gewebe- und/oder geschlechtsspezifische T-Metabolisierung an Bedeutung. Es wird davon ausgegangen, dass das Isoenzym Typ 5 der 17 $\beta$ -HSD in den unterschiedlichsten Geweben für die gewebespezifische T-Synthese verantwortlich ist, wie in der Prostata, dem weiblichen Fettgewebe, der Niere, den Ovarien und der Brust (Blouin *et al.*, 2003; Dufort *et al.*, 1999; El-Alfy *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004; Luu-The *et al.*, 2001; Quinkler *et al.*, 2003; Quinkler *et al.*, 2004). In den Ovarien wird der 17 $\beta$ -HSD Typ 5 eine doppelte katalytische Aktivität zugeschrieben, so dient sie dort nicht nur der Androgenmetabolisierung, sondern kontrolliert auch den Progesteronspiegel. Da dieses Isoenzym ebenfalls eine starke 20 $\alpha$ -HSD Oxidase Aktivität aufweist, inaktiviert es somit Progesteron zu 20 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron, wodurch das Gewebe vor einer zu exzessiven Hormonaktivität geschützt wird (Dufort *et al.*, 1999; Luu-The *et al.*, 2001; Peltoketo *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Studie wurden die Isoenzyme Typ 1, 2, 3, 4, 5, 7 und 10 untersucht, welche bereits alle schon beim Menschen nachgewiesen worden sind und deren Sequenz bekannt ist. Dabei wurden die Isoenzyme ausgewählt, über deren Bedeutung auf die Sexualsteroidbiosynthese (siehe auch Abb. 3) und ihre

katalytische Aktivität im Vergleich zu den erst kürzlich klonierten am meisten bekannt war.

Von den Isoenzymen Typ 6, 8, 9, 11, 12 und 13 lagen zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht genügend Informationen vor oder sie waren noch nicht im Menschen nachgewiesen worden.

Genauere Angaben über die 13 Isoenzyme der 17 $\beta$ -HSD sind der Tabelle 1 a-c zu entnehmen.

**Tab. 1a-c:** Angaben zu den 13 Isoenzymen der 17 $\beta$ -HSD. A: Androstendion; AS: Aminosäure; DHEA: Dehydroepiandrosteron; E<sub>1</sub>: Östron; E<sub>2</sub>: Östradiol; NAD<sup>+</sup>: Nicotinamid-adeninucleotid; NADP(H): Nicotinamid-adeninucleotidphosphat; T: Testosteron; 5diol: Androstendiol.

**Tab.1a:** Angaben zu den Isoenzymen Typ 1 bis 4.

Isoenzym	17 $\beta$ -HSD1	17 $\beta$ -HSD2	17 $\beta$ -HSD3	17 $\beta$ -HSD4
<b>Transkript Länge</b>	4982 bp	1427 bp	1135 bp	2616 bp
<b>Größe</b>	328 AS	387 AS	319 AS	736 AS
<b>Chromosomale Lokalisation</b>	17q11-q21	16q24.1-q24.2	9q22	5q21
<b>genetische Struktur</b>	6 Exons	5 Exons	11 Exons	24 Exons
<b>Gewebe</b>	Plazenta, Ovar, Brustdrüse, Hoden, Uterus, Prostata	Leber, Plazenta, Endometrium, Prostata, Darm Niere, Pankreas	Hoden, Gehirn, Prostata-Ca	annähernd ubiquitär
<b>katalysierte Reaktion</b>	Reduktion E <sub>1</sub> →E <sub>2</sub>	Oxidation T→A, E <sub>2</sub> → E <sub>1</sub>	Reduktion A→T	Oxidation E <sub>2</sub> → E <sub>1</sub> , 5diol→DHEA
<b>Kofaktor</b>	NADP(H)	NAD <sup>+</sup>	NADP(H)	NAD <sup>+</sup>
<b>Funktionen</b>	Synthese von Östrogenen und Androgenen	Inaktivierung von Androgenen und Östrogenen	Synthese von Testosteron	Inaktivierung von Androgenen und Östrogenen
<b>Chem. Familie</b>	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen

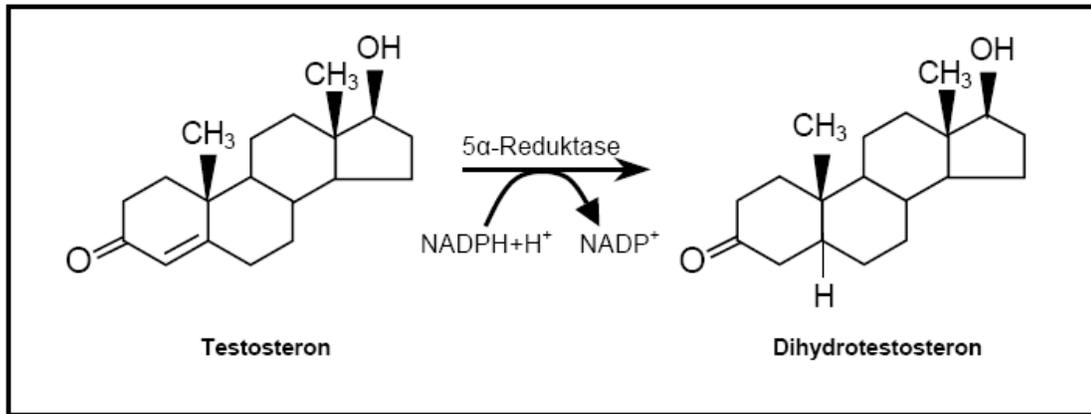
Tab. 1b: Angaben zu den Isoenzymen Typ 5 bis 8.

Isoenzym	17 $\beta$ -HSD5	17 $\beta$ -HSD6	17 $\beta$ -HSD7	17 $\beta$ -HSD8
<b>Transkript Länge</b>	1807 bp	1512 bp	1190 bp	989 bp
<b>Größe</b>	323 AS	317 AS	341 AS	261 AS
<b>Chromosomale Lokalisation</b>	10p15-p14	12q13	1q23	6p21.3
<b>genetische Struktur</b>	9 Exons	5 Exons	9 Exons	9 Exons
<b>Gewebe</b>	Prostata, Leber, Skelettmuskel, Gehirn, Ovar, Lunge, Brustdrüse, Fettgewebe	Prostata, Leber, Gehirn, Ovar	Ovar, Plazenta, Prostata, Hoden, neuronales Gewebe, fetale Leber, Uterus (Schwangerschaft)	Leber, Pankreas, Ovar, Hoden, Niere
<b>katalysierte Reaktion</b>	Reduktion A $\rightarrow$ T, E <sub>1</sub> $\rightarrow$ E <sub>2</sub> auch Oxidation möglich	Oxidation	Reduktion E <sub>1</sub> $\rightarrow$ E <sub>2</sub>	Oxidation T $\rightarrow$ A, E <sub>2</sub> $\rightarrow$ E <sub>1</sub> , auch Reduktion
<b>Kofaktor</b>	NADP(H)	NAD <sup>+</sup>	NADP(H)	NADP(H)
<b>Funktionen</b>	Synthese von Androgenen und Östrogenen (Inaktivierung auch möglich)	Inaktivierende Rolle, nicht genau bekannt beim Menschen	Synthese von Östrogenen, tragende Rolle in der Entwicklung der weiblichen Organe	Inaktivierung von Androgenen und Östrogenen, geringe aktivierende Wirkung möglich
<b>Chem. Familie</b>	(AKR1C3) Aldo-Ketoreduktase	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen

Tab. 1c: Angaben zu den Isoenzymen Typ 9 bis 13.

Isoenzym	17 $\beta$ -HSD9	17 $\beta$ -HSD10	17 $\beta$ -HSD11	17 $\beta$ -HSD12	17 $\beta$ -HSD13
<b>Transkript Länge</b>	<i>Mus musculus</i> : 951 bp	960 bp	1688 bp	2420 bp	2377 bp
<b>Größe</b>	<i>Mus musculus</i> : 316 AS	261 AS	300 AS	312 AS	300 AS
<b>Chromosomale Lokalisation</b>	<i>Mus musculus</i> : 10D3; <i>Rattus norvegicus</i> : 7q11	Xp11.2	4q22.1	11p11.2	4q22.1
<b>genetische Struktur</b>	<i>Mus musculus</i> : 5 Exons	6 Exons	7 Exons	11 Exons	7 Exons
<b>Gewebe</b>	<i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> : Prostata, Leber	Leber, Gehirn, Niere, Gonaden, Skelett-muskulatur	Lunge, Leber, Niere, Plazenta	Niere, Prostata, Darm	
<b>katalysierte Reaktion</b>	Oxidation	Oxidation E <sub>2</sub> $\rightarrow$ E <sub>1</sub> , auch Reduktion	∅	∅	∅
<b>Kofaktor</b>	NAD <sup>+</sup>	NAD <sup>+</sup>	NADP(H)	∅	∅
<b>Funktionen</b>	∅	Inaktivierung und auch Synthese von Androgenen und Östrogenen	∅	∅	∅
<b>Chem. Familie</b>	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen	Kurz-Ketten-Dehydrogenasen

Die 5 $\alpha$ R katalysiert, wie bereits unter Abschnitt 2.2 beschrieben, die Reduktion von T zu DHT (Abb. 6) in den peripheren Geweben und ist somit maßgeblich an der Differenzierung der äußeren männlichen Geschlechtsorgane beteiligt.



**Abb. 6:** Strukturformeln von Testosteron und Dihydrotestosteron. Es kommt zur Aufspaltung der Doppelbindung an der Kohlenstoffposition 4,5.

Von der 5 $\alpha$ R sind zwei Isoenzyme (Typ 1 und Typ 2) bekannt (Tab. 2). Die zwei Isoenzyme wurden aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Eigenschaften (pH-Optimum, unterschiedliche Inhibition durch das Antiandrogen Finasteride) entdeckt, wobei sie daraufhin nach der Reihenfolge ihrer Klonierung benannt worden sind (Russel und Wilson, 1994). Die Gene beider Isoenzyme weisen eine einheitliche Grundstruktur von 5 Exons und 4 Introns auf. Die fast identische Positionen der Introns lassen auf eine gemeinsame Abstammung durch eine sehr lang zurückliegende Genduplikation schließen. Diese Grundstruktur scheint auch Spezies übergreifend konserviert zu sein (Maus und Ratte) (Russel und Wilson, 1994). Die chromosomale Lokalisation der beiden humanen Isoenzyme ist jedoch unterschiedlich. Das Gen des Isoenzym Typ 1 (SRD5A1) liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 5 und das der 5 $\alpha$ R Typ 2 (SRD5A2) ist auf dem Chromosom 2 lokalisiert (Tab. 2).

Die 5 $\alpha$ R Typ 1 weist ein Aktivitätsoptimum bei einem eher alkalischen pH-Wert von etwa 7-9 auf, wohingegen das pH-Optimum des Isoenzym Typ 2 mit 5,5 sauer ist (Moore und Wilson, 1976; Russel und Wilson, 1994; Thigpen *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1993).

**Tab. 2:** Die Isoenzyme der 5 $\alpha$ R und der Androgenrezeptor

Enzyme	5 $\alpha$ -Reduktase Typ 1	5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2	Androgenrezeptor
<b>Transkript Länge</b>	2199 bp		
<b>Gen</b>	SRD5A1	SRD5A2	AR
<b>Größe</b>	259 AS	254 AS	910-919 AS
<b>Chromosomale Lokalisation</b>	5p15	2p23	Xq11.2 bis Xq12
<b>genetische Struktur</b>	5 Exons	5 Exons	8 Exons
<b>pH-Optimum</b>	neutral bis basisch (7-9)	sauer (5-5,5)	
<b>Gewebe</b>	Haut, Kopfhaut, Leber	Prostata, Leber,	wahrscheinlich ubiquitär
<b>katalysierte Reaktion</b>	Reduktion T→DHT, auch katabole Funktionen	Reduktion T→DHT, auch katabole Funktionen	
<b>Kofaktor</b>	NADP(H)	NADP(H)	
<b>Funktionen</b>	Synthese von DHT, bei Frauen auch Inaktivierung von Steroiden	Synthese von DHT	

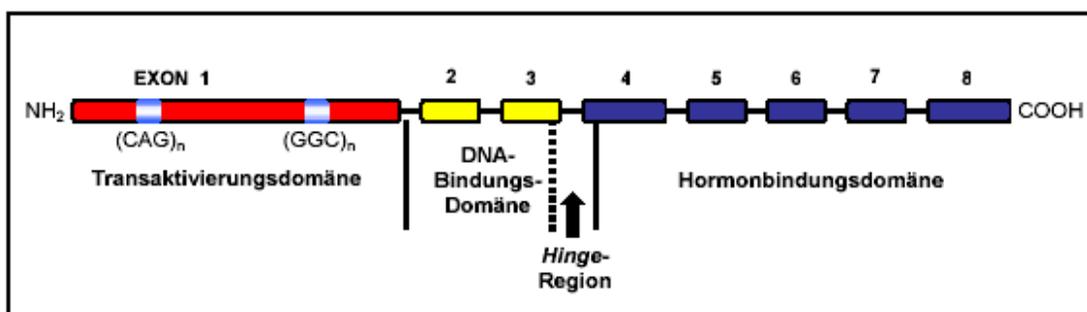
Von der 5 $\alpha$ R Typ 1 weiß man, dass sie in der Leber und vor allem in nicht genitaler Haut und Kopfhaut vorkommt, wo sie kurz vor der Geburt bis zum Ende des 2.-3. Lebensjahres nachweisbar ist und dann wieder ab der Pubertät durchgehend (Thigpen *et al.*, 1993). Sie wurde bereits in Haarfollikeln nachgewiesen, wo sie wahrscheinlich einen Einfluss auf den typisch männlichen Haarausfall haben soll (Gerst *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003). Im weiblichen Organismus spielt das meist katabol wirkende Isoenzym Typ 1 eine Rolle im Zusammenhang mit der Hormonhomöostase (Inaktivierung von Geschlechtshormonen) (Thigpen *et al.*, 1993). Über den genauen Einfluss der 5 $\alpha$ R Typ 1 auf die männliche Geschlechtsentwicklung durch DHT Synthese ist bisher nichts genaues bekannt, aber man geht davon aus, dass ihr ab der Pubertät eine mögliche Bedeutung zuzuschreiben ist. So könnte sie maßgeblich für die in der Pubertät auftretenden Virilisierungserscheinungen von Patienten mit einem 5 $\alpha$ R2-Defekt verantwortlich sein (Forti *et al.*, 1996; Thiele *et al.*, 2005; Thigpen *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1993). Bisläng sind jedoch keine Auswirkungen auf den Geschlechtsphänotyp bekannt, die aus einer genetischen Veränderung im korrespondierenden Gen SRD5A1 resultieren (Thiele *et al.*, 2005; Tria *et al.*, 2004). Die 5 $\alpha$ R2 ist in der embryonalen Entwicklung für die Synthese von DHT aus T verantwortlich und damit für die Entwicklung des äußeren männlichen

Genitales. Eine Dysfunktion dieses Enzymes führt zum 5 $\alpha$ R2-Mangel (siehe Abschnitt 2.2).

Der Androgenrezeptor (AR) dient als Wirkungsvermittler aller Androgene und auch der androgenen Vorstufen wie Androstendion, Androstendiol und DHEA (Abb. 3). Die Anwesenheit des AR-Transkripts in den Zellen ist somit eine Grundvoraussetzung, damit eine Androgenmetabolisierung überhaupt Wirkung zeigen kann (Jänne *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 2005).

Das AR Gen ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms in der Nähe des Centromers lokalisiert und hat eine Größe von über 180 kb. Die AR cDNA kodiert für ein zwischen 910 bis 919 AS langes Protein mit einem Molekulargewicht von 110 kD (Tab. 2) (Hiort *et al.*, 1999(a); Klocker *et al.*, 2004; Tilley *et al.*, 1989; Trapman *et al.*, 1988). Aufgrund von zwei sehr polymorphen Trinukleotid-Wiederholungen im Exon 1 (CAG- und GGC-Wiederholungen), kann die Länge des AR-Transkripts im Menschen stark variieren (Klocker *et al.*, 2004).

Der AR gehört zur Superfamilien der Steroidhormonrezeptoren, zu denen unter anderem ebenfalls der Aldosteron-, Östrogen-, Glucocorticoid-, Progesteron-, Retinoid- und Vitamin D-Rezeptor zählen (Hager *et al.*, 2000; Owen und Zelent, 2000; Ozawa, 2005)). Alle Mitglieder dieser Superfamilie weisen eine einheitliche molekulare Grundstruktur auf, die sie in drei Funktionsabschnitte unterteilt (Abb. 7):



**Abb. 7:** Das Androgenrezeptorgen: Das Exon 1 kodiert die Transaktivierungsdomäne. Es besitzt ein CAG- und ein GGC-Repeat, wodurch es hoch variabel ist. Die darauffolgende DNA-Bindungsdomäne wird von Exon 2 und 3 kodiert. Die sogenannte Hinge-Region liegt auf dem Ende von Exon 3 und dem Anfang von Exon 4. Die Exone 4 bis 8 kodieren die Hormonbindungsdomäne.

1. Die NH<sub>2</sub>-terminale Transaktivierungsdomäne wird von dem langen Exon 1 kodiert und weist eine hohe Variabilität auf (Jänne *et al.*, 1993). Sie übt wahrscheinlich einen kontrollierenden Einfluss auf die Promotorregion des Zielgens aus (Gobinet *et al.*, 2002; Jenster *et al.*, 1991).

2. Hierauf folgt die DNA-Bindungsdomäne, die direkt an die DNA der Promotorregionen der Zielgene bindet. Dieser Bereich ist unter den Steroidrezeptoren ein hoch konservierter Abschnitt. Die DNA-Bindungsdomäne des AR wird von Exon 2 und 3 kodiert und weist zwei Zinkfingerdomänen auf, wobei die erste Zinkfingerdomäne wahrscheinlich am Androgen-responsiven Element (ARE) bindet und die zweite an der Dimerisierung des Rezeptors mitwirkt (Hellwinkel, 1999; Jänne *et al.*, 1993). Am Ende von Exon 3 und einem kurzen Abschnitt von Exon 4 liegt die sogenannte *Hinge*-Region. Hierbei handelt es sich um einen Abschnitt des AR, der mit unterschiedlichen Proteinen interagiert, welche die Transkriptionsaktivität des Rezeptors modulieren (Klocker *et al.*, 2004).

3. Die Hormonbindungsdomäne der Steroidrezeptoren ist am carboxyterminalen Ende lokalisiert und wird mit ca. 250 AS von Exon 4 bis 8 kodiert. Beim inaktiven AR binden an diesem Bereich Hitzeschockproteine (HSP 90, HSP 70 und HSP 56) (Gobinet *et al.*, 2002; Veldscholte *et al.*, 1992). Von HSP 90 weiß man, dass es die Ligandenaffinität des AR erhöht (Fang *et al.*, 1996). Kommt es zu einer Bindung von Androgenen (T und DHT) an diesem Bereich, so werden die HSP vom AR abgespalten und der Rezeptor geht in seine aktive Form über und wird im weiteren Verlauf in den Zellkern exportiert (Jenster *et al.*, 1993; Hiort, 1999(b)).

## **2.4 Untersuchungen der Enzyme und des AR in unterschiedlichen Geweben und Zellkulturen**

Die gewebespezifische Transkription und Expression dieser Schlüsselenzyme und des AR ist bereits vielfach in unterschiedlichen Geweben gesunder Menschen untersucht worden, wie in der Haut (Ando *et al.*, 1999; Fritsch *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 1999), im Fettgewebe (Blouin *et al.*, 2003; Corbould *et al.*, 2002; Quinkler *et al.*, 2004), in Haarfollikeln (Oliveira *et al.*, 2003), im Gehirn (Steckelbroeck *et al.*, 1999; Steckelbroeck *et al.*, 2003; Stoffel-Wagner, 2003), im Gewebe aus dem Bereich des männlichen Genitale wie der Vorhaut und des Penis (Kim *et al.*, 2002;

Thiele *et al.*, 2005), im Blut (Hammer *et al.*, 2005), in der Schleimhaut des Magens (Oduwole *et al.*, 2003), im Colon (English *et al.*, 2000), im Lungengewebe (Kimura *et al.*, 2003; Provost *et al.*, 2002) und in der Niere (Quinkler *et al.*, 2003). Die Untersuchungen wurden zum Teil an den entsprechenden Geweben oder an Zellkulturen vorgenommen (Blouin *et al.*, 2003; Kimura *et al.*, 2003; Quinkler *et al.*, 2004). Durch zusätzliche Expressionsuntersuchungen (wie zum Beispiel Enzym-Aktivitäts-Bestimmungen, Westernblot-Analysen oder Metabolitenbestimmungen) konnte ein Zusammenhang zwischen der ermittelten Transkription sowie der Expression der untersuchten Enzyme und des AR gezeigt werden (Blouin *et al.*, 2003; Hammer *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2003; Quinkler *et al.*, 2003; Quinkler *et al.*, 2004; Steckelbroeck *et al.*, 2003).

Durch den Transkriptions- bzw. Expressionsnachweis der Enzyme können Rückschlüsse auf den möglichen Einfluss der Sexualsteroiden in den Geweben gemacht werden. Dabei geht man davon aus, dass die Enzyme hauptsächlich für die androgene Homöostase in den Geweben verantwortlich sind und somit die präzise Konzentration von Sexualsteroiden kontrollieren und eine intrakrinologische Funktion haben (Labrie *et al.*, 2000(b) und 2003).

Veränderungen im Transkriptions- oder Expressionsmuster dieser Enzyme führen zu Störungen der Steroidbiosynthese, welche sehr unterschiedliche Auswirkungen haben können. So existieren bereits viele Studien, die sich mit dem regulatorischen Einfluss einer pathologischen Steroidmetabolisierung im Zusammenhang mit unterschiedlichen androgenabhängigen Erkrankungen beschäftigt haben. Dabei handelt es sich unter anderem um Untersuchungen von Geschlechtsdifferenzierungsstörungen, wie des 5 $\alpha$ -Reduktase- (Wilson *et al.*, 1993) und des 17 $\beta$ -HSD-Mangels (Andersson *et al.*, 1996; Boehmer *et al.*, 1999; Geissler *et al.*, 1994; Twesten *et al.*, 2000), unterschiedliche Karzinombildungen wie das Prostatakarzinom (Härkönen *et al.*, 2003; Koh *et al.*, 2002; Margiotti *et al.*, 2002), das Mammakarzinom (Gunnarsson *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2004; Sasano *et al.*, 2000; Vihko *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003), das Endometriumkarzinom (Ito *et al.*, 2002; Sasano *et al.*, 2000) und das Colonkarzinom (English *et al.*, 2000; Vihko *et al.*, 2003) oder das Polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) (Fassnacht *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2001).

Trotz dieser großen Anzahl von Studien weiß man bisher noch sehr wenig über die gewebespezifische interindividuelle Androgenbereitstellung. Um die

Zusammenhänge der unterschiedlichen Steroidmetabolisierung und Wirkungsweise besser zu verstehen, ist es notwendig, genaue Kenntnisse über die katalytisch aktiven Enzyme zu erhalten. Bisher ist über die Bedeutungen der verschiedenen 17 $\beta$ -HSD Isoenzyme und der 5 $\alpha$ R Typ 1 und 2 auf die Sexualsteroidbiosynthese im Zusammenhang mit einer normalen oder aber pathologisch veränderten Geschlechtsentwicklung nur wenig bekannt. Durch Untersuchungen an gonadalem Gewebe können immer genauere Aussagen über die regulatorische Wirkung der einzelnen Isoenzyme der 17 $\beta$ -HSD und der 5 $\alpha$ R gemacht werden (Brown *et al.*, 2004; Labrie *et al.*, 2000(a); Whitehead und Lacey, 2003; Zhang *et al.*, 1996). So konnte durch entsprechende Studien gezeigt werden, dass die 17 $\beta$ -HSD Typ 5 sehr zell-spezifisch exprimiert wird (Pelletier *et al.*, 1999) und eine sehr wichtige Rolle in der Testosteronsynthese des menschlichen Ovars einnimmt (Luu-The *et al.*, 2001; Qin und Rosenfield, 2000). Aber auch die Bedeutung einer extragonadalen, individuellen und gewebespezifischen Androgenmetabolisierung wird erkannt.

## 2.5 Fragestellung

Die individuelle und gewebespezifische Metabolisierung von Steroidhormonen könnte in erheblichem Maße die lokale Androgenwirkung des gesunden und intersexuellen Menschen beeinflussen. Erste Untersuchungen weisen bereits auf eine hohe Bedeutsamkeit der einzelnen Schlüsselenzyme hin (Quinkler *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit sollen die Transkriptionsprofile der Isoenzyme der 17 $\beta$ -HSD Typ 1, 2, 3, 4, 5, 7 und 10, der 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 1 und 2 und des AR ermittelt werden, um neue Erkenntnisse über deren möglichen Einfluss auf die Androgenmetabolisierung zu erhalten. Hierzu wird die entsprechende mRNA aus peripheren Blutzellen sowie aus Fibroblastenzellkulturen von zwei unterschiedlichen Lokalisationen aus dem Genitalbereich männlichen Ursprungs (Vorhaut und Skrotalhaut) von gesunden Kontrollpersonen und von Patienten mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung bekannter und unbekannter Ursache mittels Real-time RT-PCR relativ quantifiziert.

Blut wurde hierbei gewählt, da über eine Transkription bzw. Expression der Enzyme in diesem Gewebe bisher kaum etwas bekannt ist und erst wenige

Untersuchungen an Blutzellen existieren (Hammer *et al.*, 2005; Li *et al.*, 1993; Samy *et al.*, 2000). Zudem ist es mit Blut ebenfalls möglich eine geschlechtsspezifische Transkription der Enzyme und des AR zu untersuchen. Die relativ einfache Generierung des Probenmaterials von sowohl gesunden Normalkontrollpersonen wie auch von Patienten ist zudem von großen Vorteil.

Genitalhautfibroblasten sind androgen-abhängige mesenchymale Zellen die bereits häufig als Zellmodell für Untersuchungen von geschlechtsspezifischen Genen verwendet wurden (Avila *et al.*, 2002; Boehmer *et al.*, 2001; Habib *et al.*, 1998; Hellwinkel *et al.*, 2000; Holterhus *et al.*, 2003; Issa *et al.*, 2002; Pelletier *et al.*, 1998; Thiele *et al.*, 2005). Überdies ist es möglich durch Verwendung dieses Zellmodells bereits veröffentlichte Ergebnisse mit denen in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zu vergleichen und zu diskutieren.

Bei den zu untersuchenden Patientenproben handelt es sich um Proben von Patienten mit einer Hypospadie, einem AIS, einem 5 $\alpha$ R2-Mangel, einem 17 $\beta$ -HSD-Mangel, einer Leydig-Zell-Hypoplasie und einem Adrenogenitales Syndrom (AGS).

Die erstellten Transkriptionsprofile der einzelnen Enzyme und des AR sollen dann miteinander verglichen werden. In diesem Zusammenhang kommt es zu folgenden Fragestellungen:

1. Können die Transkripte der Isoenzyme der 17 $\beta$ -HSD Typ 1, 2, 3, 4, 5, 7 und 10, der 5 $\alpha$ Reduktase Typ 1 und 2 und des AR in den Blutzellen, Skrotalhaut- und Vorhautfibroblasten von gesunden Normalkontrollen nachgewiesen werden?
2. Weisen die Blutproben, die Skrotalhaut- und die Vorhautfibroblasten spezifische Transkriptionsprofile auf?
3. Zeigen die untersuchten Patientenproben im Vergleich zu den Normalkontrollen in ihren Transkriptionsprofilen charakteristische Auffälligkeiten?
4. Welche neuen Erkenntnisse lassen sich aus den ermittelten Ergebnissen im Zusammenhang mit einem möglichen Einfluss der untersuchten Enzyme auf eine extragonadale, gewebe- und/oder geschlechtsspezifische Androgen-metabolisierung ziehen?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte und Zubehör

Brutschrank Typ BB6220	Heraeus Instruments, Hanau
Gelkammer und –schlitten	Whatman Biometra, Göttingen
LighCycler 1.5 Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler Capping Tool	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler Centrifuge Adapters	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikrowelle	Bosch GmbH, Karlsruhe
PH-Meter (Model 520A)	ORION, Münstermann + Scheel GmbH, Lübeck
Polaroid-Kamera, GelCam	Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA
PTC-200 (Peltier Thermal Cycler)	MJ Research, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Olendorf
RNA/DNA Calculator	Pharmacia, LKB Biochrom, England
Spannungsgerät für Agarosegele GPS 200/400	Pharmacia, LKB Biochrom, England
Thermoblock (UNITEK HB-130)	SEL Laboratory Products, England

---

UV-Leuchttisch MacroVue, UV-25	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortexer RS2, Typ VM2	IDL GmbH & Co. KG, Nidderau
Wasserbad, GFL	Münstermann + Scheel GmbH, Lübeck
Zellkulturbank, NUAIRE Biological Safety Cabinets Class II	NUAIRE, Zapf Instruments, Sarstedt, Germany
Zentrifuge, Typ Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, Hamburg
Zentrifuge, ROTANTA 96 RC	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge, UNIVERSAL 16 A	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

### 3.1.2 Kommerzielle Gebrauchslösungen und Chemikalien

Agarose NEEO Ultra-Qualität ROTI®GAROSE	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Antibiotic/Antimycotic Solution (stabilised)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chang-Medium D, mit L-Glutamin	Trinova Biochem GmbH, Gießen
Dimethylsulfoxide (DMSO) 500ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM/F-12 Zellkulturmedium (Pulver)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA mit Na <sup>+</sup>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

---

	Steinheim
Ethanol absolut 100%	MERCK, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung 1% (10mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
FCS (fetales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Formaldehydlösung 37%, zur Analyse mit 10% Methanol	MERCK, Darmstadt
Formamide (CH <sub>3</sub> NO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol, 99% GC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropylalkohol (70%, 100%)	UK-SH Campus Lübeck, Apotheke
PBS Puffer steril (pH 7,4)	UK-SH Campus Lübeck, Apotheke
Penicillin-Strepomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNase Away	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
TRISMA Base, minimum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin (100 ml)	Linaris, Wertheim
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30%	MERCK, Darmstadt

**3.1.3 Kits**

High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PAXgene Blood RNA Kit (50)	PreAnalytix, Qiagen GmbH, Hilden
PAXgene Blood RNA Tube (100)	PreAnalytix, Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden
Sequenzierungskit (Big Dye und 2,5 x Puffer)	Applied Biosystems, CA, USA

**3.1.4 Einmalartikel**

Clear View <sup>®</sup> Snap-Cap Microtubes (0,6 & 1,5 ml), siliconized	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LightCycler Capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Polaroid-Filme Typ 667 Dapa	Foto Bal, Lübeck
QIAshredder (50)	Qiagen GmbH, Hilden
Vacutainer	Becton Dickinson, USA
Zellkulturflaschen Cellstar mit Schraubdeckel (25, 75 und 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Labortechnik, Bio-One GmbH, Frickenhausen

### 3.1.5 Molekularbiologische Reagenzien

dATP, 2`-Deoxyadenosine 5`-Triphosphate, (100mM)	Amersham Biosciences, USA
dCTP, 2`-Deoxycytidine 5`-Triphosphate, (100mM)	Amersham Biosciences, USA
dGTP, 2`-Deoxyguanosine 5`-Triphosphate, (100mM)	Amersham Biosciences, USA
DNA Ladder Ready-Load, Track it (50bp)	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
DNA Ladder für Agarosegele (100 bp)	New England Biolabs, England
dTTP, 2`-Deoxythymidine 5`-Triphosphate, (100mM)	Amersham Biosciences, USA
Primer	TIB MOLBIOL, Berlin
Protector RNase Inhibitor (2000 U)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Random Primers	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
SuperScript™ II, RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe

### 3.1.6 Reagenzien für die Zellkultur

DMEM/F12-Stammlösung: 1 x DMEM/ F12-Pulver (für 5 Liter); 6,0 g NaHCO<sub>3</sub> (MG 84,01); in 5 l H<sub>2</sub>O bidest gelöst; pH 7,3; sterilfiltriert; Lagerung bei 4°C

DMEM/F12-Füttermedium: 500 ml DMEM/F12 + NaHCO<sub>3</sub> (pH 7,3); 50 ml FCS (fetales Kälberserum); 5 ml Penicillin/Streptomycin; Zugabe unter sterilen Bedingungen; Lagerung bei 4 °C; Verwendung bei 37 °C

Chang-Medium: 100 ml Chang-D; 2 ml Antibiotica/Antimycotica; Zugabe unter sterilen Bedingungen; Lagerung bei -20 °C; Verwendung bei 37 °C

Einfriermedium (4 °C): 45 ml DMEM/F12-Füttermedium; 5 ml DMSO; unter sterilen Bedingungen

### 3.1.7 Lösungen für die Arbeit mit PCR-Produkten

Ethidiumbromid-Färbelösung (2 µg/ml): 50 µl Stammlösung (10 mg/ml) auf 250 ml H<sub>2</sub>O bidest

3 M Natriumacetat (pH 5,0): 24,6 g Na-acetat auf 100 ml H<sub>2</sub>O bidest

10 x TBE-Puffer (pH 8,3): 0,90 M TRISMA Base 1090 g/10 l, 0,90 M Borsäure 566,5 g/10 l, 0,025 M EDTA mit Na<sup>+</sup> 93,0 g/ 10 l

### 3.1.8 Lösungen für RNA-Arbeiten

DEPC-H<sub>2</sub>O: 1 l H<sub>2</sub>O bidest; 200 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>); über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen; autoklavieren

0,01% SDS: 250 µl 10% SDS auf 250 ml mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 50 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 500 ml mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen

10 x MOPS (3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure)-Puffer: 200 mM MOPS (41,86 g/l); 80 mM NaAC (10,88 g/l) 10 mM Na-EDTA (3,722 g/l) in DEPC-H<sub>2</sub>O ansetzen; pH 7,0

1 x MOPS: 900 ml DEPC-H<sub>2</sub>O; 100 ml 10 x MOPS

1% Bromphenolblau für RNA: 0,005 g Bromphenolblau auf 500 µl DEPC-H<sub>2</sub>O; Lagerung bei -20 °C

RNA-Sample-Puffer: 750 µl deionisiertes Formamid; 150 µl 10 x MOPS-Puffer; 240 µl deionisiertes 37% Formaldehyd; 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O; 100 µl Glycerol; 80 µl 1% Bromphenolblau für RNA; Lagerung bei –20°C

d-NTP`s für die cDNA-Erststrangsynthese: 100 µl d-GTP (100mM); 100 µl d-CTP (100mM); 100 µl d-ATP (100mM); 100 µl d-TTP (100mM); 600 µl DEPC-H<sub>2</sub>O; Lagerung bei –20°C

### 3.1.9 Gewebe- und Zellkulturproben

Für die Arbeit wurde die RNA von Frauen und Männern aus peripheren Blutzellen und die RNA aus Fibroblastenzellkulturen des männlichen Genitalbereiches von zwei unterschiedlichen Lokalisationen (Vorhaut und Skrotalhaut) analysiert. Die Blut- und Fibroblastenproben entstammten gesunden Frauen und Männern unterschiedlichen Alters und Personen mit Geschlechtsdifferenzierungsstörungen verschiedener Ursachen.

Alle Personen von denen Material untersucht wurde, wurden von dem behandelnden Arzt über die Untersuchungen aufgeklärt und haben eine Einverständniserklärung unterschrieben. Kinder wurden ebenfalls soweit wie möglich aufgeklärt und die Einverständniserklärung von den Eltern unterzeichnet. Die Ethikkommission des UK-SH, Campus Lübeck hat in Zusammenhang mit der Genehmigung der DFG-Sachbeihilfen Hi 497/6-1/2 die Untersuchungen geprüft und bewilligt.

#### Blut

Es wurden insgesamt 59 RNA-Proben aus peripheren Blutzellen von gesunden Kontrollpersonen ohne eine Geschlechtsdifferenzierungsstörung untersucht. Die Blutproben von Kindern wurden zum Teil von Patienten entnommen, bei denen jedoch darauf geachtet wurde, dass keine Störungen vorlagen, die mit den in dieser Arbeit untersuchten Geschlechtsdifferenzierungsstörungen im Zusammenhang stehen. Die RNA von allen Proben wurde mit dem unter Abschnitt 3.2.2 beschriebenen PAXgene Kit isoliert. Es lagen dabei 30 Proben von gesunden Frauen im Alter zwischen 2 bis 63 Jahren und 29 Proben von gesunden Männern zwischen 9 und 61 Jahren vor (Tab. 3 a+b). Von Patienten mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung wurden 19 RNA-Proben untersucht. Hierbei konnten vier Proben mit einem 46,XX Karyotyp und der Diagnose AGS (Adrenogenitales Syndrom) und 15 Patienten-Proben mit einem 46,XY Karyotyp mit den Diagnosen: 17 $\beta$ -HSD3- (n = 7), 5 $\alpha$ R2-Defekt (n = 1), CAIS (n = 2) und Leydigzell-Hypoplasie (n = 5) (Tab. 4) in die Untersuchungen einbezogen werden. Bei den sieben bearbeiteten Proben von Patienten mit einem 17 $\beta$ -HSD-Defekt handelte es sich de facto um fünf verschiedene Patienten, da von zwei Patienten

jeweils zwei Blutproben vorlagen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen worden sind.

Um tageszeitliche Schwankungen der Transkription zu berücksichtigen, wurden alle Blutproben zwischen 10:00 bis 15:00 Uhr abgenommen.

**Tab. 3:** Die untersuchten Normalkontrollen aus der RNA von peripheren Blutzellen. Die 29 untersuchten Proben von gesunden Männern sind mit NM und die 30 untersuchten Proben gesunder Frauen mit NW abgekürzt.

**Tab. 3a: Männer**

Nummer	Proben-Name	Alter
1	NM1	40 J
2	NM2	40 J
3	NM3	37 J
4	NM4	34 J
5	NM5	36 J
6	NM6	24 J
7	NM7	23 J
8	NM8	23 J
9	NM9	15 J 11M
10	NM10	8 J 6 M
11	NM11	23 J
12	NM12	12 J 1M
13	NM13	17 J 3M
14	NM14	15 J 8M
15	NM15	15 J 2M
16	NM16	15 J 8M
17	NM17	40 J
18	NM18	13 J 11M
19	NM19	13 J
20	NM20	28 J
21	NM21	61 J
22	NM22	53 J
23	NM23	53 J
24	NM24	34 J
25	NM25	61 J
26	NM26	56 J
27	NM 29	8 J 8 M
28	NM 39	9 J 1 M
29	NM 45	10 J 8 M

**Tab. 3b: Frauen**

Nummer	Proben-Name	Alter
1	NW1	51 J
2	NW3	33 J
3	NW4	33 J
4	NW5	33 J
5	NW6	31 J
6	NW7	30 J
7	NW8	24 J
8	NW9	26 J
9	NW10	23 J
10	NW11	14J
11	NW12	11 J
12	NW13	6 J
13	NW14	28 J
14	NW15	23 J
15	NW16	29 J
16	NW17	8 J
17	NW18	3 J
18	NW19	17 J
19	NW20	10 J
20	NW21	13 J
21	NW22	63 J
22	NW23	31 J
23	NW24	30 J
24	NW25	33 J
25	NW28	44 J
26	NW29	25 J
27	NW31	29 J
28	NW 37	5 J 3 M
29	NW 41	1 J 6 M
30	NW 42	4 J 4 M

**Tab. 4:** Patienten Blut-RNA Proben: Es wurden Proben von Patienten mit fünf unterschiedlichen vordiagnostizierten Geschlechtsdifferenzierungsstörungen untersucht. Dabei konnten sowohl Proben von Patienten mit einem 46,XX als auch einem 46,XY Karyotyp bearbeitet werden. AGS: Adrenogenitales Syndrom; cAIS: komplettes Androgen-Insensitivitäts Syndrom; 5 $\alpha$ -Red.: 5 $\alpha$ R2-Defekt.

Proben-Nummer	Alter	Karyotyp und Geschlechtszuordnung	Diagnose
1	4 M	46,XY weiblich	17 $\beta$ -HSD3-Defekt
2	5 J 2 M	46,XY weiblich	17 $\beta$ -HSD3-Defekt
3	13 J 3 M	46,XY weiblich	17 $\beta$ -HSD3-Defekt
4	14 J	46,XY weiblich	17 $\beta$ -HSD3-Defekt
5	18 J	46,XY weiblich	17 $\beta$ -HSD3-Defekt
6	19 J 8 M	46,XY weiblich	17 $\beta$ -HSD3-Defekt
7	41 J	46,XY weiblich	17 $\beta$ -HSD3-Defekt
8	4 J 10 M	46,XY weiblich	cAIS
9	8 J 11 M	46,XY weiblich	cAIS
10	8 J 1 M	46,XY weiblich (?)	5 $\alpha$ -Red.
11	1 J 4 M	46,XY weiblich	Leydig-Zell-Hypoplasie
12	2 J 6 M	46,XY männlich	Leydig-Zell-Hypoplasie
13	9 J 9 M	46,XY weiblich	Leydig-Zell-Hypoplasie
14	11 J 9 M	46,XY weiblich	Leydig-Zell-Hypoplasie
15	39 J 4 M	46,XY weiblich	Leydig-Zell-Hypoplasie
16	9 J 3 M	46,XX weiblich	AGS
17	10 J 2 M	46,XX weiblich	AGS
18	18 J 1 M	46,XX weiblich	AGS
19	24 J 4 M	46,XX weiblich	AGS

### Zellkulturen

Als Normalkontrollen wurden Fibroblastenzellkulturen aus der Genitalregion von normal entwickelten männlichen Probanden verwendet. Dabei wurden Fibroblasten aus zwei unterschiedlichen Lokalisationen des Genitalbereichs (Vorhaut und Skrotalhaut) bearbeitet. Die häufigsten Op-Indikationen waren vor allem bei den jüngeren Patientenproben: eine Zirkumzision aus religiösen Gründen oder aufgrund einer Phimose. Insgesamt wurden 33 Proben aus dem Bereich der Vorhaut (hVHF) von Patienten mit einer Altersspanne von 4 Tagen bis zu 83 Jahren (Tab. 5) und 11 Proben aus dem Bereich der Skrotalhaut von Patienten im Alter zwischen 1 Monat und 58 Jahren (Tab. 6) untersucht.

**Tab. 5:** Die 33 untersuchten RNA-Proben aus dem Bereich der männlichen Vorhaut mit der jeweiligen Altersangabe der Patienten zum Zeitpunkt der Operation und der Passagenhöhe bei der RNA-Extraktion. hVHF: humane Vorhaut Fibroblasten.

Proben-Nummer	Proben-Name und Passagenhöhe	Alter
1	D 80-2	4 Tage
2	hVHF 50-4	1 M
3	hVHF 52-2	1 M
4	hVHF 4-2	4 M
5	hVHF 59-3	8 M
6	hVHF 1-2	8 M
7	hVHF 2-2	11 M
8	hVHF 48-2	1 J
9	hVHF 62-5	2 J
10	hVHF 35-2	2 J 10 M
11	hVHF 41-2	3 J
12	hVHF 17-2	3 J 6 M
13	hVHF 74-2	4 J
14	hVHF 18-2	4 J 8 M
15	hVHF 60-3	5 J
16	hVHF 58-3	6 J
17	hVHF 3-2	6 J
18	hVHF 12-2	7 J
19	hVHF 40-3	8 J
20	hVHF 10-2	9 J
21	hVHF 19-2	10 J
22	hVHF 57-3	11 J
23	hVHF 51-2	12 J
24	hVHF 28-2	12 J
25	hVHF 88-1	35 J
26	hVHF 84-1	37 J 5 M
27	hVHF 56-3	43 J
28	hVHF 82-2	47 J
29	hVHF 61-3	48 J
30	hVHF 63-4	51 J
31	hVHF 33-5	52 J
32	hVHF 6-2	77 J
33	hVHF 81-3	83 J

**Tab. 6:** Die 11 untersuchten RNA-Proben aus der männlichen Skrotalhaut mit der jeweiligen Altersangabe der Patienten zum Zeitpunkt der Operation und der Passagenhöhe bei der RNA-Extraktion.

Proben-Nummer	Proben-Name und Passagenhöhe	Alter
1	Skrotum 1-3	1 M
2	Skrotum 4-2	1 J
3	Skrotum 5-2	2 J
4	Skrotum 15-1	5 J
5	Skrotum 12-1	9 J
6	Skrotum 3-2	13 J
7	Skrotum 2-4	30 J
8	Skrotum 8-2	31 J
9	Skrotum 11-2	32 J
10	Skrotum 9-2	34 J
11	Skrotum 13-1	58 J

Von Personen mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung bekannter bzw. unbekannter Ursache wurden insgesamt 42 RNA-Proben aus den zwei unterschiedlichen Lokalisationen bearbeitet.

An der DNA der 30 untersuchten Patientenproben mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung unbekannter Ursache wurde vorher routinemäßig ein *Mutationscreening* durchgeführt, wobei nach möglichen Veränderungen im HSD17B3-, SRD5A2- und AR-Gen gesucht wurde. Bei den Proben handelte es sich um Fibroblastenzellkulturen von Patienten mit einer Hypospadie unterschiedlichen Schweregrades unbekannter Ursache. Die Hypospadiegrad-Klassifizierung wurde aus Barcat *et al.*, (1973) übernommen. Davon entstammten 22 aus der Vorhaut (hVHF) und 8 aus der Skrotalhaut (Tab. 7 a-b). In den Tabellen 7 a-b ist unter den drei Proben mit der Numer 3, 4 und 6 der gleiche Patient beschrieben, von dem Fibroblastenproben aus beiden Lokalisationen untersucht werden konnten.

Es wurden zwölf Proben von Patienten mit einer bekannten Diagnose ihrer Geschlechtsdifferenzierungsstörung untersucht. Dabei konnten zwei Proben mit einem 17 $\beta$ -HSD3- und drei mit einem 5 $\alpha$ R2-Defekt bearbeitet werden. Bei sieben Patientenproben lag eine Mutation im AR-Gen vor, wobei drei davon der Lokalisation Vorhaut und vier der Skrotalhaut entstammten (Tab. 8 a-b). Es wurden nur Proben mit den Gewebe-Lokalisationen Vorhaut und Skrotalhaut

untersucht, um diese mit den untersuchten Normalkontrollen vergleichen zu können.

**Tab. 7a:** Die 22 untersuchten hVHF-RNA-Proben von Hypospadiepatienten. Es handelte sich dabei jeweils um Patienten mit einem 46,XY Karyotyp, aber einer zum Teil unterschiedlichen Geschlechtszuweisung. Weiterhin wurde das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation angegeben und die Passagenhöhe der Zellkultur bei der RNA-Extraktion. Soweit bekannt, wurden ebenfalls vorhandene assoziierte Fehlbildungen und der Hypospadieschweregrad angegeben, der der Klassifizierung aus Barcat *et al.*, (1973) entstammte. Die Fett gedruckten und unterstrichenen Proben-Nr. stehen für Proben mit veränderten Transkriptionsprofilen (siehe Tab. 14).

Proben-Nr.	Alter	zugewiesenes Geschlecht	Hypospadiegrad	assoziierte Fehlbildungen	Passagenhöhe
<u>1</u>	2 M	männlich	III	nicht deszendierter rechter Hoden, Mikropenis	4
2	10 M	männlich	IV	Skrotum bipartitum, mediane Gaumenspalte	2
<u>3</u>	1 J 1 M	männlich	III		1
<u>4</u>	1 J 4 M	weiblich	V	Mikrophallus, Müller'sche Strukturen nachweisbar	3
<u>5</u>	1 J 7 M	weiblich	III	dysgenetischer Hoden rechts, Ovotestis links, Verdacht auf Gonadendysgenese	2
<u>6</u>	1 J 10 M	männlich	III	Skrotum bipartitum	1
<u>7</u>	1 J 11 M	männlich	III		2
8	2 J	männlich	II		3
<u>9</u>	2 J	männlich	II	Mikropenis, Skrotum bipartitum, nicht deszendierter Hoden	4
10	2 J	männlich			3
11	2 J 3 M	männlich	II-III	nicht deszendierte bilaterale Hoden	2
12	2 J 5 M	männlich	III	Frühgeburt	2
13	2 J 7 M	männlich	IV	Mikropenis	2
14	2 J 9 M	männlich	II		2
15	2 J 10 M	männlich	III		4
16	4 J 6 M	männlich			3
17	4 J 8 M	männlich	II		2
18	6 J 5 M	männlich	III		2
<u>19</u>	6 J 6 M	männlich	III	Skrotum bipartitum	2
<u>20</u>	8 J	weiblich		Mikrophallus Verdacht auf Gonadendysgenese	5
21	8 J 7 M	männlich	IV		2
<u>22</u>	12 J 4 M	männlich			1

**Tab. 7b:** Die acht untersuchten Skrotalhaut-RNA-Proben von Hypospadiepatienten. Es handelte sich dabei jeweils um Patienten mit einem 46,XY Karyotyp, aber einer zum Teil unterschiedlichen Geschlechtszuweisung. Weiterhin wurde das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation angegeben und die Passagenhöhe der Zellkultur bei der RNA-Extraktion. Soweit bekannt wurden ebenfalls vorhandene assoziierte Fehlbildungen und der Hypospadieschweregrad angegeben, der der Klassifizierung aus Barcat *et al.*, (1973) entstammte.

Proben-Nummer	Alter	zugewiesenes Geschlecht	Hypospadie-grad	assoziierte Fehlbildungen	Passagenhöhe
1	7 M	männlich		Frühgeburt, Skrotum bipartitum, kleiner Phallus	2
2	1 J 2 M	männlich	IV		3
3	1 J 1 M	männlich	III		2
4	1 J 4 M	weiblich	V	Mikrophallus, Müller'sche Strukturen nachweisbar	3
5	1 J 6 M	männlich			2
6	1 J 10 M	männlich	III	Skrotum bipartitum	1
7	2 J 2 M	männlich		Skrotum bipartitum	3
8	2 J 5 M	männlich		mediane Gaumenspalte, Kleinwuchs	5

**Tab. 8a:** Die acht untersuchten Patienten-RNA-Proben aus hVHFs mit einer bekannten Diagnose für ihre Geschlechtsdifferenzierungsstörung. (C)AIS = (komplettes) Androgen-Insensitivitäts Syndrom.

Proben-Nummer	Alter	zugewiesenes Geschlecht	Diagnose	Passagenhöhe
1	12 J 5 M	weiblich	17 $\beta$ HSD3-Defekt	4
2	10 J	weiblich	17 $\beta$ HSD3-Defekt	3
3	2 J	männlich	5 $\alpha$ R2-Defekt	2
4	10 M	?	5 $\alpha$ R2-Defekt	2
5	6 M	weiblich	5 $\alpha$ R2-Defekt	2
6	12 M	weiblich	CAIS	8
7	1 J 6 M	männlich	AIS	2
8	14 J 10 M	weiblich	CAIS	5

**Tab. 8b:** Angaben über die vier untersuchten Patientenproben aus dem Bereich der Skrotalhaut. Bei allen Patienten lag die Diagnose AIS vor. AIS = Androgen-Insensitivitäts Syndrom

Proben-Nummer	Alter	zugewiesenes Geschlecht	Diagnose	Passagenhöhe
1	8 M	männlich	AIS	5
2	1 J 1 M	weiblich	AIS	3
3	2 J	männlich	AIS	2
4	7 J 8 M	männlich	AIS	3

### 3.1.10 Primer

Die Verwendung der richtigen Primer ist für die PCR von entscheidender Bedeutung. Es mussten daher erst die richtigen mRNA-Sequenzen der zu untersuchenden Gene ermittelt werden. Hierzu wurde auf eine Nukleotid-datenbank aus dem Internet zurückgegriffen ([www.pubmed.de](http://www.pubmed.de)).

Die Primer-Paare wurden so gewählt, dass sie Exon-Intron-Grenzen überspannend liegen. Somit konnten mögliche DNA-Kontaminationen nach der PCR erkannt werden. Auch die Länge der zu amplifizierenden Fragmente musste bei der Wahl der Primer beachtet werden. Bei einer Amplifikation mittels Real-Time PCR (siehe Abschnitt 3.2.6.2) ist es wichtig, dass das zu amplifizierende Fragment möglichst kurz ist. Des Weiteren sollte die Sequenz der beiden Primer nicht komplementär zueinander sein, damit sich keine Primerdimere bilden können und sie sollten weder Sekundärstrukturen, repetitive Sequenzen noch Palindrome enthalten.

Die Primer für das Haushaltsgen PBGD (siehe Abschnitt 3.2.6.5) wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) empfohlen, bei der alle verwendeten Primer synthetisiert worden sind. Nur die Primer L17bHSD5S (Koh *et al.*, 2002) und SRD5A2-S3 (Wiebe und Lewis, 2003; Kimura *et al.*, 2003) wurden aus der Literatur übernommen. Die restlichen verwendeten Primersequenzen (Tab. 9) wurden selbst ermittelt.

**Tab. 9:** Verwendete Primer-Paare, wobei der obere immer der „sense“- und der untere immer der „antisense“-Primer für jedes untersuchte Gen darstellt. Alle Primer-Paare überspannen mehrere Exon-Intron-Übergänge, und die einzelnen Primer liegen zum Teil direkt auf den Exon-Exon-Grenzen. Ihre Lage und Länge der Fragmente sind angegeben. Es sind ebenfalls die jeweils verwendeten Primerkonzentrationen sowie die optimale  $MgCl_2$ -Konzentration angeführt.

Primer	Primersequenz	Fragmentlänge	Primer Konz. ( $\mu g/\mu l$ )	$MgCl_2$ -Konz. (mM)
PBGD se*	5'- AGAGTGATTTCGCGTGGGTACC -3'	282 bp	20	4
PBGD 3.1R	5'- GGCTCCGATGGTGAAGCC -3'			
17 $\beta$ HSD1-S4	5'- GAGGATTGATGGGGCTGCCT -3'	111 bp	20	4
17 $\beta$ HSD1-A4	5'- TCGATCAGGCTCAAGTGGAC -3'			
17 $\beta$ HSD2-S	5'- GTCCTGGTGACAGGTGGTGA -3'	330 bp	20	4
17 $\beta$ HSD2-A	5'- CAAAGAAGTTCACGGCCATGC -3'			
17 $\beta$ HSD3-S2	5'- GTCATCATCCAGGTGCTGACC -3'	258 bp	5	4
17 $\beta$ HSD3-A2	5'- GTTGAGCTTCAGGTATGCCAC -3'			
17 $\beta$ HSD4-S	5'- GCCCACCTTCGGAGTTATCAT -3'	292 bp	20	4
17 $\beta$ HSD4-A	5'- TCCACCAAAGCCTCCAGAGC -3'			
L17 $\beta$ HSD5S	5'- CCGCCATATAGATTCTGCTCA -3'	328 bp	10	3
L17 $\beta$ HSD5A	5'- CTTACACTTCTCCATGGCCTC -3'			
17 $\beta$ HSD7-S	5'- TGCTGATGGACTTCAGGAGGT -3'	343 bp	20	4
17 $\beta$ HSD7-A	5'- CGGCATCAACAGCGTCCATAT -3'			
17 $\beta$ HSD10-S	5'- CCCAGCCGACGTGACCTCT -3'	317 bp	20	4
17 $\beta$ HSD10-A	5'- CAGCTTGTCCAACCTGACCC -3'			
5R1Forward	5'- GGTTTTGGCTTGTGGTTAACA -3'	279 bp	20	4
5R1Antisen	5'- CTCTTCAAATTTCCGGAGGTAC -3'			
SRD5A2-S3	5'- CATACGGTTTAGCTTGGGTGT -3'	324 bp	20	4
SRD5A2-A3	5'- GGAATAAGGGCTTCCGAGAT -3'			
hARE 1S	5'- TGGATGGATAGCTACTCCGG -3'	275 bp	10	4
hARE 3-A	5'- CGAAGACGACAAGATGGACAA -3'			
h-HPRT-F	5'- GAAAAGGACCCCCACGAAGTGT -3'	226 bp	20	4
h-HPRT-R	5'- TGGCGATGTCAATAGGACTCC -3'			

## **3.2 Labormethoden**

### **3.2.1 Zellen**

Aus Biopsaten der in Teil 2.1.2.2 beschriebenen Lokalisationen von normalen männlichen und weiblichen Probanden sowie von Personen mit unterschiedlichen Geschlechtsdifferenzierungsstörungen wurden Primärkulturen angelegt. Die Fibroblastenzellkulturen wurden in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen angezüchtet und bei einer Konfluenz von etwa 100% in der zweiten Passage (dies bedeutet eine zweimalige Trypsinierung siehe Abschnitt 3.2.1.3) in flüssigen Stickstoff weggefroren oder aber für eine entsprechende DNA- oder RNA-Extraktion sofort weiterverwertet. Die entsprechende Passagenanzahl wurde jeweils für jede Zellkultur vermerkt, indem sie als Zahl an die jeweilige Zellkulturnummer angehängt worden ist (z.B. hVHF 58-2, Skrotum 4-2). Es wurden immer Zellkulturen mit einer niedrigen Passagenanzahl verwendet (2. bis max. 5. Passage), da bekannt ist, dass eine erhöhte Passagenanzahl zu einer veränderten Transkription führen kann (Deplewski et al., 1997; Mowszowicz *et al.*, 1980; Theintz *et al.*, 1989). Die Arbeit an den Zellkulturen erfolgte immer unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank.

#### **3.2.1.1 Anzüchtung der Primärkulturen**

Das zu bearbeitende Gewebe wurde mit PBS (37°C) gewaschen. In einer sterilen Petrischale wurde das Biopsat mit sterilem Besteck sehr fein geschnitten. Das zerkleinerte Gewebe wurde danach in Chang-D-Füttermedium (37°C) aufgenommen und je nach Menge auf mehrere 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verteilt. Die Flaschen wurden vorsichtig in den Brutschrank gestellt und dort 5-7 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Zufuhr unbewegt stehen gelassen. Nach dem Anwachsen der ersten Fibroblasten wurde das Chang-D-Füttermedium aspiriert und durch DMEM F12-Füttermedium ersetzt. Bei einer etwa 100% Konfluenz der Primärkulturen wurden die Zellen trypsinisiert und auf größere Zellkulturflaschen (75 oder 175 cm<sup>2</sup>) verteilt.

### **3.2.1.2 Bebrütung und Fütterung der Zellen**

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und einer 21% O<sub>2</sub>- und 5% CO<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre kultiviert. Die Fütterung der Zellkulturen erfolgte mit Chang-D-Füttermedium (Primärkulturen) und DMEM F12-Füttermedium. Das Medium wurde zweimal wöchentlich aspiriert und ersetzt.

### **3.2.1.3 Trypsinierung (Passagierung) der Fibroblasten**

Da Fibroblasten adhärent in den Zellkulturflaschen wachsen, mussten die Zellen zur Weiterverarbeitung trypsiniert werden. Hierzu wurde das Füttermedium aspiriert und die Zellen wurden mit auf 37°C erwärmtem PBS-Puffer gespült. Nach Absaugen des Puffers wurden etwa 1-3 ml erwärmte (37°C) Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop beobachtet und konnte mittels mechanischer Erschütterung und/oder Erwärmung im Brutschrank unterstützt werden. Die Zellen wurden nun in ca. 10 ml auf 37°C erwärmtem DMEM F12-Füttermedium aufgenommen, in ein Harre-Röhrchen pipettiert und ca. 10 min bei 1000-1500 U/min zentrifugiert.

### **3.2.1.4 Einfrieren und Lagerung von Zellkulturen**

Die Zellen wurden bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür mussten die Zellen bei einer etwa 100% Konfluenz durch die bereits beschriebene Trypsinierung vom Boden der Kulturflaschen gelöst werden. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in je 1,5 ml kalten (4°C) Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Nach einer einstündigen Vorgefrierzeit auf Eis wurden die Röhrchen für ca. 12-24 h bei -80°C (z.B. in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs) eingefroren, bevor sie dann endgültig in den flüssigen Stickstoff überführt wurden.

### **3.2.1.5 Auftauen von Zellkulturen**

Die Kryo-Röhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff genommen und möglichst schnell in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Unter der Sterilbank wurde der

Inhalt der Röhrchen in ca. 10 ml DMEM F12-Füttermedium aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen transferiert. Nach einer ca. 10 min Zentrifugation bei 1000-1500 U/min wurde der Überstand aspiriert und das Zellpellet in 10 ml DMEM F12-Füttermedium resuspendiert. Nun konnten die Zellen in neue, vorbereitete Kulturflaschen ausgebracht und angezüchtet werden.

### **3.2.2 RNA Extraktion aus Zellen**

Die RNA-Isolierung aus Zellen wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen in den Kulturflaschen zu 100% konfluent waren. Danach erfolgte ein letzter Mediumwechsel, bevor die RNA vier Tage später extrahiert wurde. Dieser Schritt erfolgte, damit die Zellen sich zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion in einem möglichst Stoffwechsel-reduzierten Zustand befanden (Hunger-Zustand).

Die RNA-Extraktion aus Fibroblasten erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen). Hierfür musste das Füttermedium aspiriert werden. Die Zellen wurden anschließend mit auf 37°C erwärmten PBS-Puffer gespült, welcher dann ebenfalls aspiriert wurde. Danach wurden 600 µl eines Lysis-Puffers (RLT-Puffer mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) auf die Zellen appliziert und verteilt. Der Puffer enthält denaturierendes Guanidin-Isothiocyanat, welches vorhandene RNasen inaktiviert. Die Zellen wurden nun mit einem Zellschaber von dem Kulturflaschenboden gelöst und 700 µl des Lysats zum Homogenisieren der Zellen und Scheren von genomischer DNA auf eine QIAshredder Säule (Qiagen) pipettiert. Die Säulen wurden 2 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Danach wurden jeweils 600 µl 70% Ethanol zum Lysat gegeben, um geeignete Bindungskonditionen zu erhalten. 700 µl der Probe wurden auf eine RNeasy Säule gegeben. Durch Zentrifugation wurde die RNA dabei selektiv an eine auf Silika-Gel basierende Membran gebunden. Nach drei folgenden Waschschritten mit unterschiedlichen Puffern (RW1 und RPE) wurde die RNA in 60 µl auf 80°C erwärmten RNase freien Wasser eluiert. Die extrahierte RNA konnte sofort weiterverwendet werden oder bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung verwahrt werden.

### 3.2.3 Extraktion der Blut-RNA

Die Blutabnahme erfolgte mit PAXgene-Röhrchen (Qiagen). Diese enthalten einen RNA-Stabilisator, durch den die RNA bis zu fünf Tage bei Raumtemperatur haltbar ist. Die Isolierung der RNA wurde mit dem PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen) durchgeführt. Bei der Bearbeitung der Proben wurden die Angaben des Herstellers weitgehend eingehalten. Nach Abnahme der Blutprobe wurden alle Röhrchen immer mindestens eine Nacht bei Raumtemperatur verwahrt. Anschließend wurde das Röhrchen bis zur weiteren Verarbeitung kühl gelagert. Zuerst erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 20 min bei 3000-5000 x g. Der Überstand wurde dekantiert oder abpipettiert und zu dem Pellet wurden 5 ml RNase freies Wasser gegeben. Das Röhrchen wurde mit einem neuen Deckel verschlossen und das Pellet durch Vortexen resuspendiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 20 min bei 3000-5000 x g. Danach wurde der Überstand möglichst vollständig verworfen. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Der Proteinase K Verdau wurde jedoch auf mind. 15 min verlängert und die Proben währenddessen sehr gut geschüttelt, damit der Überstand nach der darauffolgenden Zentrifugation gut zur weiteren Verarbeitung abpipettieren werden konnte. Nach weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritten wurde die RNA in 80 µl Elutionspuffer aus der verwendeten Säule herausgewaschen, fünf min. auf 65°C erwärmt und danach bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung verwahrt.

### 3.2.4 Prüfung von Qualität und Quantität der isolierten RNA

Alle RNA-Proben wurden vor der weiteren Verwendung zunächst photometrisch quantifiziert. Dafür wurden 5 µl der Gesamt-RNA in 95 µl DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt (20-fache Verdünnung). Die RNA musste währenddessen kühl gelagert werden. Das Photometer wurde mit reinem DEPC-H<sub>2</sub>O geeicht und danach erfolgte die Messung der OD (optischen Dichte) der RNA bei 260 nm Wellenlänge.

Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{OD} \times \text{K} \times \text{VF} = \text{X } \mu\text{g RNA/ml Ausgangslösung}$$

(K = spezifische Konstante zur RNA-Quantifizierung (=40),

VF = Verdünnungsfaktor (hier 20))

Um Angaben über die Reinheit der RNA zu erlangen, wurde die 260/280 nm Ratio der gemessenen OD-Werte verwendet. Die Ratio musste zwischen 1,4 und 1,8 liegen.

Die RNA-Qualität wurde mittels eines RNA-Gels geprüft. Hierfür wurde zur Vorbereitung die Gelkammer und der abgeklebte Gelschlitten mit 0,01% SDS gespült und dann ca. 1 h in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, um mögliche RNasen zu zerstören. Danach wurde das RNA-Gel hergestellt, welches 10 x MOPS-Puffer und Formaldehyd enthielt.

Für jede RNA-Probe wurden 12 µl RNA-Sample-Puffer mit 0,5 µl (1µg/µl) Ethidiumbromidlösung versetzt, bevor jeweils 1-4 µg gesamt-RNA hinzugegeben wurde. Die RNA-Probenansätze wurden daraufhin für 15 min bei 65°C denaturiert. Danach konnten das Gel mit den Proben beladen werden und es folgte eine elektrophoretische Auftrennung der RNA-Proben in 1 x MOPS-Puffer für 1 bis 2 h bei 80 V. Die Ergebnisse der RNA-Gele wurden nach der Elektrophorese unter UV-Licht geprüft und fotografisch dokumentiert.

### **3.2.5 cDNA-Erststrangsynthese (RT-PCR)**

Da für die relative Quantifizierung nicht direkt die RNA eingesetzt wurde, sondern die entsprechende cDNA (copy DNA), musste die extrahierte RNA erst mittels RT (Reverse Transkriptase)-PCR in cDNA umgeschrieben werden. Alle Reaktionsschritte erfolgten auf Eis. Es wurde jeweils, soweit vorhanden, 1 µg RNA eingesetzt und der Ansatz gegebenenfalls mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Daraufhin wurde 1 µl (3µg/µl) Random Primer hinzugegeben. Nach einer anschließenden Denaturierung für 5 min bei 70°C mussten die Proben sofort gekühlt werden. Danach wurde zu jedem Ansatz 4 µl 5 x RT-Puffer, 2 µl 10 mM dNTPs, 2 µl 100 mM DTT und 0,25 µl RNase Inhibitor (40 U/µl) hinzupipettiert. Die Proben wurden kurz gevortext und herunterzentrifugiert, bevor sie dann in einem

handelsüblichen Thermocycler (PTC-200) für 2 min auf 37°C erhitzt wurden. Während der 2 min wurde die RT mit DEPC-H<sub>2</sub>O 1:5 (40 U/μl) verdünnt. Dann wurde jeweils 1 μl verdünnte RT zu jedem cDNA-Syntheseansatz gegeben, hierbei mussten die Proben weiterhin auf 37°C erwärmt bleiben. Die Ansätze wurden für 1 h bei einer Temperatur von 37°C belassen und danach entweder zur Weiterverarbeitung bei 4°C gekühlt oder bei –20°C eingefroren.

### 3.2.6 Relative Quantifizierung

#### 3.2.6.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

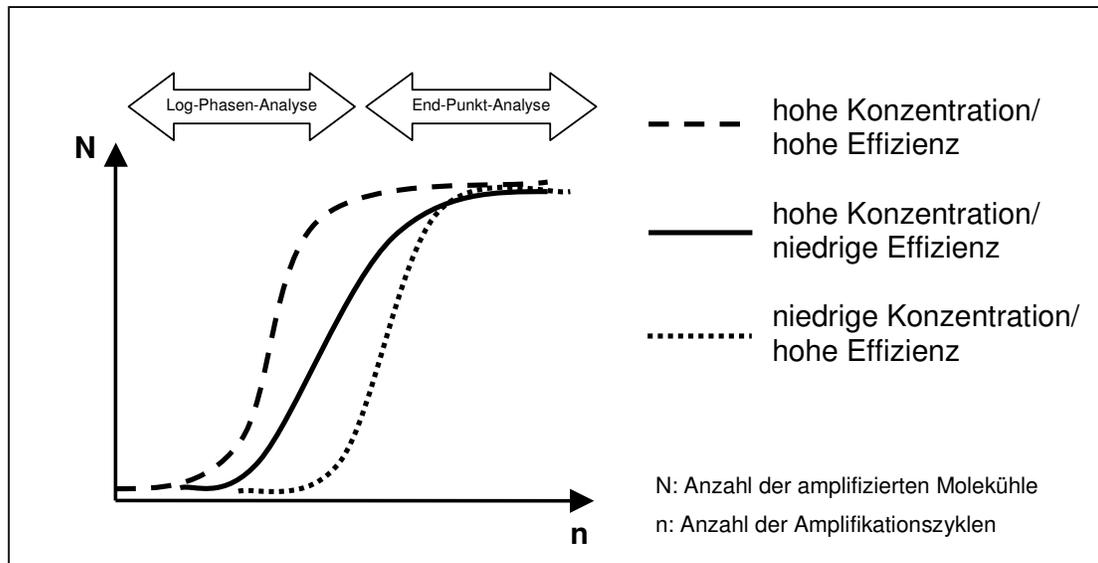
Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase-chain-reaction) ist die Methode der Wahl, um auf einfache und schnelle Weise DNA bzw. cDNA zu amplifizieren. Hierbei handelt es sich um eine *in vitro* Reaktion, bei der in zyklisch ablaufenden Schritten ein bestimmter DNA- bzw. cDNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt wird (Mullis *et al.*, 1986; Mullis und Faloona, 1987). Zur Durchführung einer PCR benötigt man eine hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase), durch die die PCR automatisiert werden konnte (Saiki *et al.*, 1988).

Die PCR wird heutzutage häufig als Quantifizierungsmethode von mRNA-Transkripten eingesetzt (Bustin, 2002; Ginzinger, 2002).

#### 3.2.6.2 Real-Time PCR

Bei der Quantifizierung durch eine konventionelle PCR (z.B. Kompetitor-PCR) wird eine End-Punkt-Analyse durchgeführt, bei der die PCR-Produktmenge erst nach Beendigung eines Laufes aus der Plateau-Phase bestimmt wird.

Wie aus Abb.7 zu erkennen ist, wird die Amplifikation eines PCR-Produktes zwar stark von der Ausgangskonzentration des zu untersuchenden Zielgen-Transkripts beeinflusst, jedoch spielt ebenfalls die PCR-Effizienz eine entscheidende Rolle. So kann es trotz einer hohen Ausgangskonzentration des Zielgens, aber einer geringen Effizienz zu den gleichen Ergebnissen kommen wie bei einem PCR-Lauf mit niedriger Ausgangskonzentration, aber einer sehr hohen Effizienz (Abb. 8).



**Abb. 8:** Durch die Messung in der „Log-Linear-Phase“ ist es möglich Rückschlüsse auf die Ausgangskonzentration zu machen. Hierbei wird im Vergleich zu konventionellen PCR die Amplifikationseffizienz mit einbezogen.

Die konventionellen PCR-Methoden haben demzufolge ihre Grenzen und Nachteile, wenn es um eine exakte Quantifizierung geht. Mit der Real-Time PCR werden die Daten während der sogenannten „Log-Linear-Phase“ gemessen, in der man von einer konstanten Amplifikationseffizienz in jeder Probe ausgehen kann. Nur in dieser exponentialen Phase („Log-Linear-Phase“) der PCR ist es möglich, durch Extrapolation Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge des Zielgen-Transkripts zu ziehen (Ginzinger, 2002). Die Real-Time PCR zeichnet sich durch ihre praktische und schnelle Anwendbarkeit, ihre hohe Reproduzierbarkeit und Genauigkeit aus. Diese Vorteile haben die Real-Time PCR zu einer der am häufigsten verwendeten Quantifizierungsmethode gemacht (Bustin, 2002; Ginzinger, 2002).

### 3.2.6.3 LightCycler-RT-PCR

Bei dem LightCycler Instrument von Roche handelt es sich um ein Real-Time PCR Gerät. Die Fluoreszenz der amplifizierten Produkte wird nach jedem einzelnen Zyklus gemessen und auf einem Bildschirm mittels eines Säulen- und Liniendiagramms angezeigt.

Nach jedem Lauf wird von dem Gerät eine Schmelzkurve erstellt. Hierbei wird die spezifische Schmelztemperatur eines jeden PCR-Produktes, die sich durch die Länge und den GC-Anteil des PCR-Produktes bedingt, gemessen und in Form einer Schmelzkurve dargestellt. Die spezifische Schmelztemperatur ist definiert als die Temperatur, bei der 50% der DNA einzelsträngig und 50% doppelsträngig vorliegt. Sie ist für jedes PCR-Produkt spezifisch und erlaubt es nach eindeutiger Identifikation (z.B. einer Sequenzierung) als Produktüberprüfung verwendet zu werden. Somit muss nicht jede einzelne Probe mittels Agarosegel, Sequenzierung oder Restriktionsverdau überprüft werden.

Aufgrund der Erhitzung von Luft und der Oberflächen-zu-Volumen-Ratio der verwendeten Glaskapillaren ist ein PCR-Lauf im LightCycler bedeutend schneller als in einem gewöhnlichen Thermocycler. In das Proben-Karussell können maximal 32 Glaskapillaren eingesetzt werden.

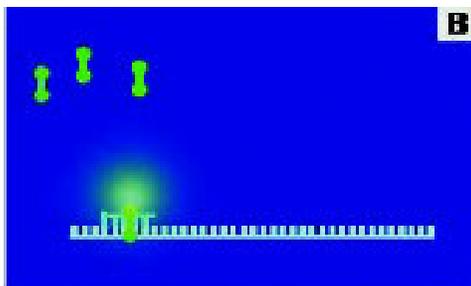
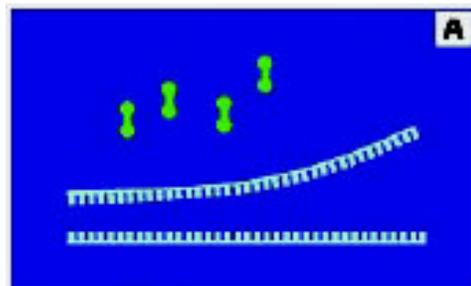
Abhängig von der Ausgangskonzentration der Ziel-mRNA tritt die gemessene Fluoreszenz in einem PCR-Lauf zu einem bestimmten Zeitpunkt aus dem Hintergrund hervor und wird als deutliches Signal messbar auf dem Bildschirm als Balkendiagramm für jede Probe dargestellt. Dieser Zeitpunkt wird beim LightCycler als Crossing Point (CP) bezeichnet. Der CP-Wert ist somit ein Anhaltspunkt für die Ausgangskonzentration des zu untersuchenden Transkripts. Unter optimalen PCR-Bedingungen müssten zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten einer 1:10 verdünnten Probe 3,3 CP-Unterschied liegen. Zur Ermittlung der CP-Werte gibt es zwei unterschiedliche Methoden, die verwendet werden können. Bei der „Fit-Point“-Methode kann der Anwender manuell selbst festlegen, ab wann alle Proben aus dem Hintergrund herausgetreten sind. Die „Second Derivate Maximum“-Methode ist weitgehend automatisiert und für die spätere Kalkulation der Daten werden ausschließlich die von der Geräte-Software automatisch ermittelten CP-Werte einbezogen, die damit die Basis für die Quantifizierung liefern. In dieser Arbeit wurde die „Second Derivate Maximum“-Methode verwendet.

Der LightCycler besitzt drei unterschiedliche Fluoreszenzkanäle, so dass bei 530, 640 und 710 nm die Fluoreszenz gemessen und *online* sichtbar gemacht werden kann. Es werden hauptsächlich zwei unterschiedliche Fluoreszenzformate verwendet: das SYBR Green I (530 nm) und Hybridisierungssonden (640 und 710 nm).

### 3.2.6.4 Das Fluoreszenzformat: SYBR Green I

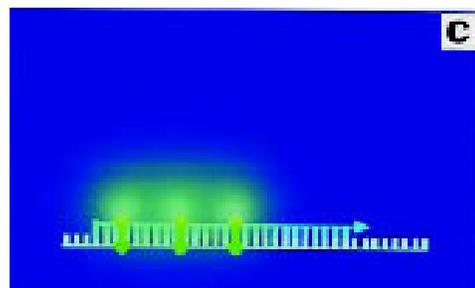
Bei dem in dieser Arbeit verwendeten SYBR Green I handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der unspezifisch in jede Art von doppelsträngiger DNA interkaliert (Abb. 9 A-D). Dabei bindet er an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA. Die Fluoreszenz ist am Ende der „Elongationsphase“ am stärksten und wird dann von dem Gerät nach jedem Zyklus detektiert und zeitgleich auf dem Bildschirm dargestellt.

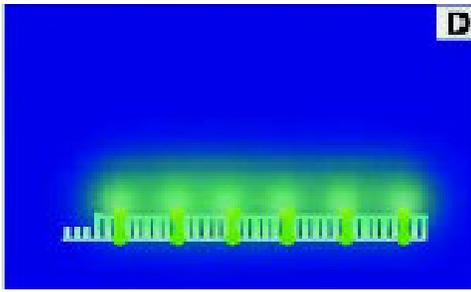
**A:** Nach der Denaturierung liegt die DNA einzelsträngig vor. Zu diesem Zeitpunkt liegt SYBR Green I ungebunden in der Lösung vor und die Fluoreszenz ist nur sehr schwach.



**B:** Während der „Annealing-Phase“ binden die spezifischen PCR-Primer an die Ziel-Sequenz und SYBR Green I wird eingebaut.

**C:** In der „Elongations-Phase“ werden die Primer mit Hilfe der Polymerase und der dNTP's verlängert. SYBR Green I bindet an der gebildeten doppelsträngigen DNA.





**D:** Am Ende der „Elongations-Phase“ ist die gesamte DNA doppelsträngig. Die maximale Menge an SYBR Green I ist eingebaut und fluoresziert. Zu diesem Zeitpunkt misst das Gerät die Fluoreszenz nach jedem Zyklus und stellt sie auf dem Bildschirm dar.

**Abb. 9 A-D:** PCR mit dem SYBR Green I Format  
(Roche Applied Science; Technical Note No. LC 18/2004)

### 3.2.6.5 Das Haushaltsgen (*Housekeeping-Gen*, Referenzgen)

Ein Haushaltsgen zeichnet sich dadurch aus, dass es in allen Geweben und bzw. Zellen gleichmäßig exprimiert wird und es in seiner Expression nicht durch äußere Einflüsse reguliert wird. Bei der relativen Quantifizierung dient das Haushaltsgen zur Normalisierung und als endogene Kontrolle, gegen das alle Zielgene semi-quantifiziert werden. Es sollte dabei möglichst ein ähnliches Expressionsniveau wie die zu untersuchenden Zielgene aufweisen.

In dieser Arbeit wurden zwei Haushaltsgene an 25 Blutproben, 30 hVHF-Proben und 10 Skrotahautfibroblastenproben von Normalkontrollen und Patienten ausgetestet. Dabei handelte es sich um die Porphobilinogen Deaminase (PBGD), die auch als Hydroxymethylbilane Synthase (HMBS) bezeichnet wird sowie die Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase (HPRT).

Die HPRT katalysiert im Purinstoffwechsel die Umwandlung von Hypoxanthin und Guanin zu ihren 5' Mononukleotiden (Murray *et al.* 1970; Murray, 1971). Sie wird ebenfalls in fast allen Geweben relativ niedrig exprimiert (Foss *et al.*, 1998). Vom Gen der HPRT sind bisher vier Pseudogene nachgewiesen worden (Patel *et al.*, 1984).

Für die Untersuchungen wurde die PBGD verwendet. Die PBGD ist ein cytosolisches Enzym, welches als drittes Enzym in der Hämbiosynthese wirkt (Chretien *et al.*, 1988; Kappas *et al.*, 1995; Schneider-Yin *et al.*, 2000). Es handelt sich um ein relativ niedrig exprimiertes Gen, von dem bisher keine Pseudogene bekannt sind. Es existieren jedoch zwei unterschiedliche mRNA-Transkriptvarianten, von denen die eine nur in Blutzellen exprimiert wird und die andere ubiquitär vorkommt (Gubin und Miller, 2001; Puy *et al.*, 1998). Durch

entsprechend spezifische Primer wurde in dieser Arbeit jedoch nur die ubiquitär vorkommende PBGD-mRNA detektiert.

### 3.2.6.6 Der cDNA-Standard und -Kalibrator

Bei der Kalibrator-normalisierten relativen Quantifizierung müssen Standardkurven erstellt werden. Diese sollen den Konzentrationsbereich abdecken, der für die zu untersuchenden Zielgene zu erwarten ist. Bei jeder größeren Veränderung der PCR-Bedingungen müssen diese Standardkurven erneuert werden. Hierfür wurde eine ausreichende Menge eines cDNA-Standards erstellt, auf den immer wieder zurückgegriffen werden konnte. Des Weiteren musste in jedem PCR-Lauf ein Kalibrator mitlaufen, der zur Normalisierung aller Proben innerhalb eines Laufs und als konstanter Kalibrierungspunkt zwischen unterschiedlichen LightCycler-Läufen dient. Bei dem Kalibrator handelt es sich um eine positive Vergleichsprobe, die eine stabile Target (=Zielgen) zu Referenz (Haushalts-Gen)-Ratio aufweisen muss. Vom Kalibrator musste ebenfalls eine große Menge hergestellt werden, um alle zukünftigen Läufe miteinander vergleichen zu können. Für nachfolgende Arbeiten sollte ein „Master-Kalibrator“ aufbewahrt werden, mit dem dann zukünftig neue Kalibratoren durch die LightCycler-Software abgeglichen werden können. Ein Vergleich alter und neuer PCR-Läufe ist dadurch möglich.

In dieser Arbeit wurde der erstellte Standard auch als Kalibrator eingesetzt, so dass nur von einer RNA eine ausreichende Menge an cDNA synthetisiert werden musste. Hierfür wurde eine kommerziell erhältliche „Universal Reference RNA“ (Stratagene, La Jolla, CA) verwendet. Diese RNA besteht aus der gepoolten gesamt RNA von zehn unterschiedlichen menschlichen Zelllinien (siehe Tab. 10) und wird auch als Referenz-RNA für Mikroarray Analysen verwendet (Novoradovskaya *et al.*, 2004).

Zur Synthese des cDNA-Standards wurde ein Röhrchen mit 200 µg universale humane Referenz-RNA für 15 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 70% RNase freiem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 13000 U/min und 4°C wurde der Überstand sehr vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Danach wurde das Pellet in 200 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst, um die gewünschte Konzentration von 1 µg/µl RNA zu

erhalten. Die cDNA-Erststrangsynthese erfolgte daraufhin für die gesamten 200 µl der RNA wie unter Abschnitt 3.2.4 beschrieben. Die ca. 4 ml cDNA wurden vor der weiteren Verwendung in einem sterilen Gefäß gepoolt und auf 20 µl aliquotiert. Die Standard-cDNA konnte nun bei -20°C aufbewahrt werden. Es wurden 4 ml einer 1:10 Verdünnung der cDNA erstellt und aliquotiert, diese wurde als Kalibrator in jedem Lauf mitgeführt.

**Tab. 10:** Auflistung der 10 unterschiedlichen Zelllinien der Referenz-RNA

Zelllinien-Abstammung
Adenokarzinomzellen der Brustdrüse
Hepatoblastomzellen (Leber)
Adenokarzinomzellen (Cervix)
Embryonale Karzinomzellen des Hodens
Glioblastomzellen des Gehirns
Melanomzellen
Liposarkomzellen (Fettgewebe)
Histiozytische Sarkomzellen (Makrophagen; Histozyten)
Lymphblastische Leukämiezellen (T-Lymphoblast)
Plasmozytomzellen/ B Lymphozyten

### 3.2.6.7 Erstellung der Standardkurven

Für jedes untersuchte Gen war es notwendig eine Standardkurve zu erstellen, die den Konzentrationsbereich abdecken musste, der für die zu analysierenden Proben erwartet wurde. Hierfür wurde eine ausreichende Menge einer Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:10000 aus der Standard-cDNA hergestellt. Es wurde ein PCR-Lauf durchgeführt, in dem von jeder Verdünnung ein 3-fach Ansatz mitgeführt wurde. Die ermittelten CP-Werte wurden dann von der LightCycler Software auf einer logarithmischen Skala als eine Kurve dargestellt. Mit diesen Standardkurven wurden alle detektierten Ergebnisse abgeglichen, wodurch die PCR-Effizienz durch die verwendete Software (siehe 2.2.6.9) in die Auswertung mit einbezogen wurde.

### 3.2.6.8 Relative Quantifizierung mittels Real-Time PCR

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierung handelte es sich um eine *two-step* RT-PCR. Dabei erfolgt die cDNA-Erststrangsynthese (siehe Abschnitt 3.2.4) getrennt von dem Quantifizierungslauf. Alle Gene (Ziel- wie auch Referenzgen) wurden in getrennten Läufen gemessen, da die PCR-Bedingungen für jedes einzelne Gen unterschiedlich waren (Tab. 11). Die cDNA wurde für die meisten PCR-Läufe in einer 1:10 Verdünnung verwendet, damit die detektierten CP-Werte von den Standardkurven abgedeckt wurde. Für die 17 $\beta$ HSD Typ 3 und die 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2 mussten jedoch unverdünnte cDNA-Proben verwendet werden, da die Transkripte dieser Enzyme in 1:10 verdünnten Proben nicht genau ermittelt werden konnten. Es wurde für jede Probe pro PCR-Lauf eine Doppelbestimmung angesetzt und jeder Lauf wurde zweimal wiederholt. Um der Bildung von Primerdimeren vorzubeugen, wurde eine sogenannte „*Hot Start*“ PCR durchgeführt, bei der die FastStart Taq DNA Polymerase erst nach einer anfänglichen Denaturierung aktiv wird, so dass zu Beginn der PCR alle DNA-Stränge einzeln vorliegen. Deshalb starteten alle PCR-Läufe mit einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 10 Minuten bei 95°C, der zur Aktivierung der FastStart Taq DNA Polymerase diente. Erst danach konnte die Amplifikationsreaktion beginnen (Tab. 11).

#### Probenansatz für die PCR-Läufe:

2  $\mu$ l cDNA

je 1,6  $\mu$ l (3 mM) oder 2,4  $\mu$ l (4 mM) von der 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Stocklösung

je 1  $\mu$ l Sense-Primer (5, 10 oder 20 pmol/ $\mu$ l)

je 1  $\mu$ l Antisense-Primer (5, 10 oder 20 pmol/ $\mu$ l)

je 2  $\mu$ l FastStart DNA Master SYBR Green I Mix

mit RNase freiem H<sub>2</sub>O auf 20  $\mu$ l auffüllen

**Tab. 11:** PCR-Bedingungen für die untersuchten Enzyme und das verwendeten Haushaltsgens (PBGD).

	PBGD		17βHSD Typ 1		17βHSD Typ 2		17βHSD Typ 3		17βHSD Typ 4		17βHSD Typ 5		17βHSD Typ 7		17βHSD Typ 10		5R1		5R2		AR	
	°C	sec	°C	sec	°C	sec	°C	sec	°C	sec	°C	sec	°C	sec	°C	sec	°C	sec	°C	sec	°C	sec
<b>Denaturierung</b>	95	15	95	10	95	10	95	10	95	10	95	10	95	10	95	10	95	15	95	10	95	10
<b>Annealing</b>	65	12	69	5	64	10	69	10	66	8	64	6	66	8	66	8	65	10	69	10	63	10
<b>Elongation</b>	72	28	72	5	72	17	72	16	72	20	72	14	72	20	72	20	72	30	72	13	72	16
<b>Fluoreszenz-messung</b>	84	4	86	3	85	2	86	4	72	0	83	2	83	2	86	2	79	5	84	2	85	3
<b>Schmelztemp. (°C)</b>	86		87		87		88		81		83		85		87		86		86		86	

Nach der Amplifikationsreaktion wurde vom LightCycler eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, durch die es möglich war, direkt nach jedem Lauf die Spezifität des amplifizierten Produktes zu überprüfen und unspezifische Produkte wie Primerdimere zu identifizieren. Hierbei wurden die Kapillaren auf 95 °C erhitzt, so dass die gesamte DNA einzelsträngig vorlag. Dann wurde die Temperatur wieder auf 68 °C bis 79 °C gesenkt, wodurch die zu schmelzenden Produkte wieder doppelsträngig vorlagen. Nun erfolgte eine stetige Erhöhung der Temperatur (0,1 °C/sec) und kontinuierliche Messung der Fluoreszenz. Die Schmelztemperatur war zu dem Zeitpunkt erreicht, an dem 50% des amplifizierten Produktes geschmolzen vorlag, gekennzeichnet durch einen charakteristischen Abfall der Fluoreszenzkurve. Anhand dieser Kurve konnten dann die spezifischen PCR-Produkte und mögliche Primerdimere identifiziert werden. Beim Auftreten einer Primerdimer-Schmelzkurve mussten die PCR-Konditionen verändert werden, da diese sonst falsch-positive Ergebnisse geliefert hätten. Dafür wurde die Fluoreszenz nicht direkt nach der Elongations-Phase gemessen, sondern erst oberhalb des Schmelzpunktes der Primerdimere, der aus den Schmelzkurven abzulesen war (Ball *et al.*, 2003). Es wurde vorher durch eine Sequenzierung der Produkte geprüft, ob es sich wirklich um Primerdimere handelte.

### 3.2.6.9 Auswertung mit der Relativen Quantifizierungs Software

Mit der *LightCycler Relative Quantification Software* (Version 1.01) ist es möglich, die unterschiedlichen Standardkurven der Zielgene mit der Standardkurve des Haushaltsgens zu vergleichen. Es wurde für jede Zielgen-Standardkurve und für

die Haushaltsgen-Standardkurve ein sogenannter Koeffizient File erstellt, der dann bei jeder Analyse für das entsprechende Gen aufgerufen und in die Berechnung mit einbezogen wurde. Die Quantifizierungsergebnisse wurden dann mit Hilfe des Programms direkt errechnet. Der Kalibrator musste in jedem Lauf mitgeführt werden, da dieser als interne Kontrolle und zur Normalisierung der Proben und der verschiedenen Läufe untereinander dient. Wichtig war eine konstante Effizienz der einzelnen PCR-Läufe. Von der *LightCycler Relative Quantification Software* wurden die ermittelten CP-Werte hinsichtlich ihrer Effizienzunterschiede mittels der Standardkurven über einen breiten Konzentrationbereich hin korrigiert. Die Kalibrator-normalisierte Ratio mit Effizienzkorrektur wird von der Software errechnet und als Verhältnis Probe zu Kalibrator ausgedrückt (siehe Formel):

$$\frac{\frac{\text{Ziel - Gen}_{\text{Probe}}}{\text{Referenzgen}_{\text{Probe}}}}{\frac{\text{Ziel - Gen}_{\text{Kalibrator}}}{\text{Referenzgen}_{\text{Kalibrator}}}}$$

### 3.2.7 Sequenzierung der PCR-Produkte

Bevor mit der relativen Quantifizierung begonnen werden konnte, wurden die PCR-Produkte zur Überprüfung sequenziert, um sicherzustellen, dass es sich bei den Produkten auch um die richtigen Amplifikate handelte. Es wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Dabei wurde in der Cycle Sequenzierung, einer in einem Thermocycler zyklisch ablaufenden und polmerasekatalysierten Reaktion, ein Strang der DNA amplifiziert. Es wurde jeweils nur ein Primer (Sense oder Antisense) für jeden Ansatz benötigt. Zusätzlich zu den dNTP`s mussten auch „Stopnukleotide“ (ddNTP`s = Didesoxynukleotide) hinzugefügt werden. Den ddNTP`s fehlt die 3´-Hydroxylgruppe, die zur Strangverlängerung notwendig ist. So kommt es beim Einbau eines ddNTP`s zu einem Kettenabbruch und der DNA-Strang kann nicht verlängert werden. Die ddNTP`s sind je nach Base (A, T, G oder C) mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, wodurch der Reaktionsansatz in nur einem Gefäß angesetzt werden kann (Smith *et al.*, 1986). Die DNA-Stränge

konnten somit auf ein Basenpaar genau aufgetrennt werden. Die DNA-Fragmente wurden dann mit Hilfe der Fluoreszenz-Markierung mittels eines ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Kapillar-Sequenzier) detektiert. Die Fluoreszenz wurde dann von der zugehörigen Software den Basen zugeordnet und in der entsprechenden Reihenfolge in Form eines Elektropherogramms angezeigt. Die Sequenzen konnten dann mit dem Sequenz-Programm CHROMAS geöffnet und gelesen werden.

#### Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte mussten, bevor sie für die Sequenzierung weiter verwendet werden konnten, von den überflüssigen Primer-, dNTP- und Chemikalienresten gereinigt werden. Hierzu wurde das High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des chaotropen Salzes Guanidine Thiocyanat, welches in gepressten Glasfibrasern eingelagert ist, die sich in den High Pure Filter-Säulen befinden. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei die PCR-Produkte zuerst mit einem Bindungspuffer vermischt wurden. Die DNA wurde dann nach einem Zentrifugationsschritt an die Glasfibrasern der Filter-Säulen gebunden und in mehreren Wasch-Schritten mit einem entsprechenden Waschpuffer von den noch vorhandenen Nukleotiden, Primern, Salzen und der thermostabilen Polymerase gereinigt. Zum Schluss wurde die aufgereinigte DNA dann durch einen Elutions-Puffer aus den Filter-Säulen zurückgewonnen. Die Qualität der aufgereinigten PCR-Produkte wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel überprüft und fotografisch dokumentiert.

#### Cycle Sequenzierung

Es wurde für jeden Primer (Sense- oder Antisensestrang) ein Reaktionsansatz vorbereitet. Bei einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden für jeden Ansatz je nach Qualität des aufgereinigten PCR-Produktes zwischen 3 und 5 µl cDNA-Probe, 6 µl 2,5 x Puffer, 0,75 µl (entspricht 15 pmol/µl bei einer 20 pmol/µl Primerverdünnung) eines Primers (Sense- oder Antisensestrang) und 2 µl Big Dye eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden dann, je nach eingesetzter Menge an aufgereinigten PCR-Produkt, mit H<sub>2</sub>O bidest auf 20 µl aufgefüllt.

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler (PTC-200) durchgeführt (Protokoll siehe Tab. 12). Der Amplifikationszyklus wurde 25 mal wiederholt.

**Tab. 12:** Reaktionsprofil des Cycle Sequenzing

Reaktionsschritte	Temperatur (in °C)	Zeit (in min)
Denaturierung	96	03:00
<u>Amplifikationszyklus</u>		
Denaturierung	96	00:30
Annealing	50	00:15
Elongation	60	04:00
Reaktionsende	4	∞

### Ethanol-fällung

Vor der automatischen Sequenzierung mussten die Cycle Sequenzing Produkte mit Hilfe von Ethanol ausgefällt werden. Hierzu wurden die Sequenzierungsansätze in 1,5 ml Tubes überführt und mit H<sub>2</sub>O bidest auf 100 µl aufgefüllt. Nun wurden zu jedem Ansatz 10 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl (2,5 Volumen) 100% Ethanol gegeben. Die Proben wurden nun für 20 min in einer Tischzentrifuge bei 1300 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun mit 200-300 µl 70% Ethanol gewaschen, bevor es dann für 10 min nochmals zentrifugiert wurde. Daraufhin musste der Überstand sehr vorsichtig abpipettiert werden. Die Pellets wurden dann durch Trocknung im Wärmeschrank oder an der Luft vollständig vom Ethanol befreit. Danach konnten die Proben bei Raumtemperatur aufbewahrt oder weiterverarbeitet werden.

### 3.2.8 Statistische Auswertung und Darstellung der Daten

Wie bereits unter Abschnitt 3.2.6.9 beschrieben, erhält man von der *LightCycler Relative Quantification Software* (Version 1.01) die Kalibrator-normalisierten Ratios mit Effizienzkorrektur. Da von jeder Probe jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführte PBGD-PCR-Läufe vorlagen, konnten diese jeweils mit den drei ebenfalls unabhängig voneinander durchgeführten Zielgen-Läufen verglichen und die normalisierten Ratio-Werte ermittelt werden. Für die weitere Bearbeitung wurde der Median der normalisierten Ratio verwendet. Bei dem Median handelt es sich um den Wert, der die in eine Rangfolge gebrachten Messwerte in zwei gleich große Hälften teilt (Lange und Bender, 2001). Extremwerte beeinflussen den Median kaum, wodurch er sich gerade z.B. bei der Auswertung von Laborwerten besser interpretiert lässt. Der Median wird wie folgt berechnet:

$$\text{für eine ungerade Wertemenge} \quad Md = x\left(\frac{n+1}{2}\right)$$

$$\text{für eine gerade Wertemenge} \quad Md = \frac{1}{2}\left(x\left(\frac{n}{2}\right) + x\left(\frac{n}{2}+1\right)\right)$$

Zur Auswertung der Daten wurde das Programmpaket SPSS für Windows Version 13.0 verwendet. Es wurden zwei nichtparametrische Tests durchgeführt, da es sich bei den auszuwertenden Daten um ein Ordinalskalenniveau handelt. Hierzu wurde der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben gewählt. Der U-Test prüft die Nullhypothese, die besagt, dass zwei zu vergleichende Stichproben aus formgleich verteilten Populationen mit identischem Medianwert stammen. Des Weiteren wurde für k unabhängige Stichproben der Kruskal-Wallis-H-Test durchgeführt. Bei diesem Test können Gruppeneinteilungen vorgenommen werden und miteinander hinsichtlich ihrer Tendenz verglichen werden (wie z.B. eine Altersgruppeneinteilung). Das Signifikanzniveau wurde für beide Tests auf 0,05 festgelegt, wobei ein p-Wert von  $> 0,05$  als nicht signifikant, ein p-Wert von  $\leq 0,05$  signifikant und ein p-Wert von  $\leq 0,01$  als hochsignifikant beurteilt wurde.

Um eine große Menge an Daten darstellen zu können, wurde eine Clusterdarstellung (Abb. 14) verwendet (Abschnitt 4.3.3). Diese wurde mit dem Programm Gene Cluster Version 2.11. erstellt und mit Hilfe des Programms TreeView Version 1.60. dargestellt. Beide Programme sind im Internet frei erhältlich. Die weitere Bearbeitung der Cluster erfolgte mit dem Programm Adobe Illustrator 9.0.2.

Nicht gemessene Werte wurden dabei dunkelgrau dargestellt. Für gemessene Werte wurde eine Farbabstufung von rot für hohe Werte bis hellgrau für sehr niedrige Werte gewählt. Dabei sollten nicht die untersuchten Gene miteinander verglichen werden, sondern es erfolgte eine Einteilung der bearbeiteten Proben.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Das Haushaltsgen: die Porphobilinogen Deaminase**

Um ein geeignetes Haushaltsgen zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit zwei Gene getestet. Es handelte sich, wie im Abschnitt 3.2.6.5 beschrieben, um die Gene der Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und der Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase (HPRT).

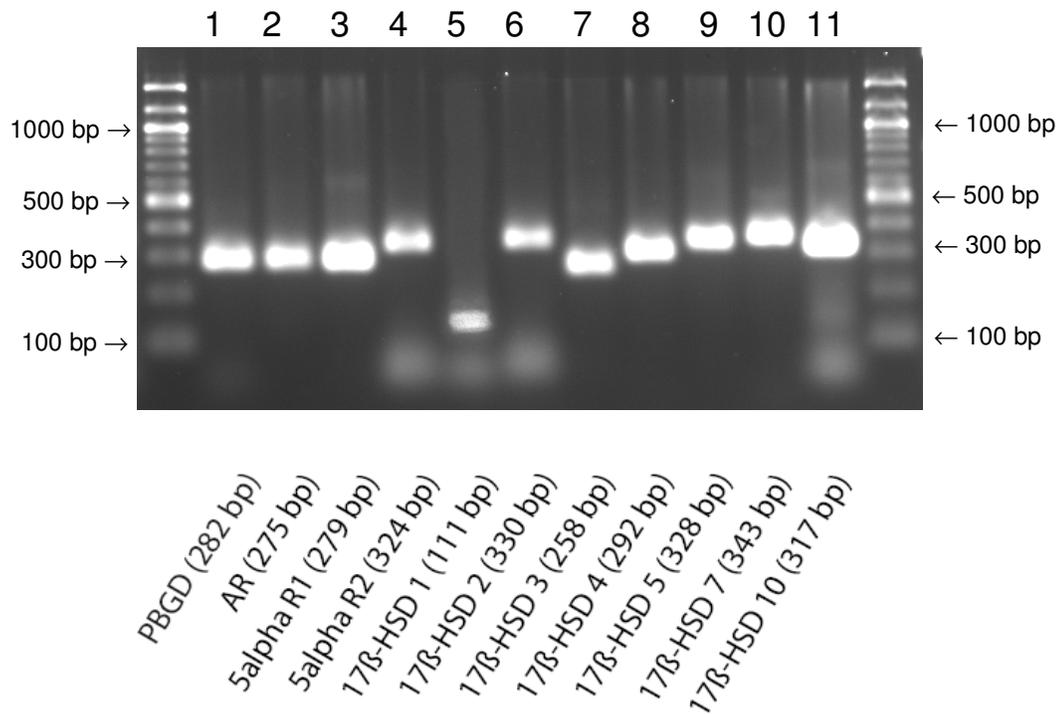
Ein Vergleich der CP-Werte der untersuchten RNA-Proben (25 Blutproben, 30 hVHF-Proben und 10 Skrotahautfibroblastenproben von Normalkontrollen und Patienten) zeigte bei der Fibroblasten-RNA für beide Haushaltsgene vergleichbare Werte. Dabei lagen die gemessenen CP-Werte der PBGD immer um etwa 1 bis 1,5 CP höher als die der HPRT, was auf eine niedrigere PBGD-Transkriptkonzentration in den Geweben hinweist. Die CP-Werte schwankten bei beiden Genen zwischen 28 bis 31 CP für die PBGD und zwischen 27 bis 30 CP für die HPRT. Da diese Schwankungen jedoch gleichmässig bei beiden Genen auftraten und der Unterschied zwischen den CP-Werten immer in diesem Bereich blieb, wurde dies nicht als eine mögliche Regulation der mRNA-Expression der Haushaltsgene in diesen Proben gedeutet. Diese Unterschiede wurden vielmehr auf eine methodische Ursache in Zusammenhang mit der RNA zurückgeführt, da es vorwiegend die gleichen Proben betraf.

Ein Vergleich der CP-Werte der beiden Gene in der Blut-RNA zeigte jedoch sehr unterschiedliche Werte. Hierbei lagen die ermittelten Werte der HPRT meist höher als die von der PBGD und es konnte kein vergleichbarer gemeinsamer Trend zwischen den ermittelten CP- Werten gefunden werden. Es wurden für die PBGD CP-Werte zwischen 29 und 31 und für die HPRT zwischen 29 und 32 gemessen. Aufgrund der größeren Schwankungsbreite der CP-Werte der HPRT verglichen mit den Werten der PBGD wurde für die relative Quantifizierung in dieser Arbeit die PBGD als Haushaltsgen verwendet.

### **4.2 Amplifikation der untersuchten Gene und des Haushaltsgens**

Nach Ermittlung der geeigneten spezifischen Amplifikationsprimer für jedes der zehn untersuchten Gene und des Haushaltsgens (PBGD) mussten die optimalen

PCR-Bedingungen getestet werden. Dazu wurde die in Abschnitt 3.2.6.6 beschriebene Standard-cDNA in einer Verdünnung von 1:10 verwendet. Bevor die PCR-Bedingungen festgelegt wurden, mussten die PCR-Produkte erst mittels eines Längenstandards auf einem Agarosegel überprüft werden (Abb. 10).



**Abb. 10:** Alle zehn untersuchten Gene und das Haushaltsgen PBGD konnten amplifiziert werden. Die PCR-Produkte sind auf einem RNA-Gel aufgetragen. An beiden Seiten ist ein Längenstandard aufgetragen (100 bp Standard). Die Längen der amplifizierten Fragmente sind ebenfalls der Tab. 9 zu entnehmen. 1 = PBGD (282 bp); 2 = AR (275 bp); 3 = 5 $\alpha$ R1 (279 bp); 4 = 5 $\alpha$ R2 (324 bp); 5 = 17 $\beta$ -HSD 1 (111 bp); 6 = 17 $\beta$ -HSD 2 (330 bp); 7 = 17 $\beta$ -HSD 3 (258 bp); 8 = 17 $\beta$ -HSD 4 (292 bp); 9 = 17 $\beta$ -HSD 5 (328 bp); 10 = 17 $\beta$ -HSD 7 (343 bp); 11 = 17 $\beta$ -HSD 10 (317 bp).

Sobald die Produkte die zu erwarteten Längen hatten, wurden sie sequenziert, um zu verifizieren, dass es sich um die richtigen Fragmente handelte. Die verwendeten PCR-Konditionen sind in Tab. 11 dargestellt. Diese Überprüfung wurde zu Beginn der Untersuchungen ebenfalls für jeweils ausgewählte Proben aus den unterschiedlichen Geweben wiederholt. Im Folgenden dienen vor allem die spezifischen Schmelzkurven dazu, die PCR-Produkte zu überprüfen. Auffällige Produkte wurden ebenfalls sequenziert.

Für den Großteil der untersuchten Gene konnten 1:10 verdünnte cDNA-Proben verwendet werden. Nur für die 17 $\beta$ -HSD Typ 3 und das Gen SRD5A2 der 5 $\alpha$ R2 mussten unverdünnte Proben verwendet werden. Die 17 $\beta$ -HSD Typ 3 zeigte eine sehr niedrige Transkriptmenge in den hVHF-RNA-Proben und das SRD5A2-Transkript lag in den Blut-RNA-Proben in sehr geringer Konzentration vor. Um die Transkriptionsprofile der Gene in den Blutproben und Fibroblastenproben miteinander vergleichen zu können, war es jedoch notwendig, für jedes Zielgen dieselbe Verdünnung für alle Proben zu verwenden.

### **4.3 Vergleich der Transkriptionsprofile der Normalkontrollen**

#### **4.3.1 Transkriptionsnachweis der Gene in der RNA aus Blutzellen**

Da die meisten der untersuchten Enzyme bisher noch nicht in Blut untersucht worden sind, war es nicht klar, ob diese auf Transkriptionsebene nachweisbar sein würden. Insgesamt wurden 59 RNA-Proben aus peripheren Blutzellen relativ quantifiziert. Da die RNA aus nur 2,5 ml Blut extrahiert wurde, lag zum Teil eine sehr niedrige und unterschiedliche RNA-Konzentration in den einzelnen Proben vor (zwischen 0,01 bis 0,15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Diese Diskrepanzen wurden vor allem auf die unterschiedlichen Abnahmebedingungen zurückgeführt. Das Abnahmesystem der PAXgene-Röhrchen entspricht nicht dem deutschen Standardsystem. Um unter optimalen Bedingungen die 2,5 ml Blut zu erhalten, mussten bestimmte Abnahmeregeln eingehalten werden, diese wurde durch eine Gebrauchsanleitung immer an die Ärzte mitversandt oder lagen in den Behandlungsräumen bei den Röhrchen. Da die Blutabnahme von unterschiedlichen Ärzten durchgeführt wurde und eine Kontrolle der Abnahme nicht immer möglich war, können mögliche Unterschiede bei der Abnahme nicht ausgeschlossen werden. Zudem ist die Blutabnahme bei Kindern und Kleinkindern erschwert, so dass nicht immer eine Blutmenge von 2,5 ml entnommen werden konnte.

Nach der in Abschnitt 2.2.4 beschriebenen Qualitätsprüfung wurde für die cDNA-Erststrangsynthese von Proben mit einer Konzentration unter 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  immer 10  $\mu\text{l}$  Probenmaterial eingesetzt. Da eine relative Quantifizierung durchgeführt wurde und immer ein Normalisierungsabgleich mit dem Haushaltsgen PBGD stattfand, ist

damit ein Einfluss auf die gemessenen Ratios unwahrscheinlich, die in jeder gemessenen Konzentration gleich sein sollten.

Bis auf das Isoenzym Typ 2 der 17 $\beta$ -HSD konnten von allen untersuchten Enzymen die Transkripte in Blut-RNA nachgewiesen werden. Für die Enzyme 17 $\beta$ -HSD Typ 1 (n gesamt = 42, davon Frauen = 22 und Männer = 20), der 5 $\alpha$ R2 (n gesamt = 29, davon Frauen = 15 und Männer = 14) sowie dem AR (Frauen: n = 29) konnte nicht in allen untersuchten Proben ein Transkript nachgewiesen werden. Das Transkript der 17 $\beta$ -HSD Typ 2 konnte weder in 1:10 verdünnten Proben noch in unverdünnter cDNA-Proben nachgewiesen werden, so dass davon auszugehen ist, dass ein Transkript dieses Isoenzym nur in einer sehr geringen Kopiezahl oder gar nicht in peripheren Blutzellen gebildet wird.

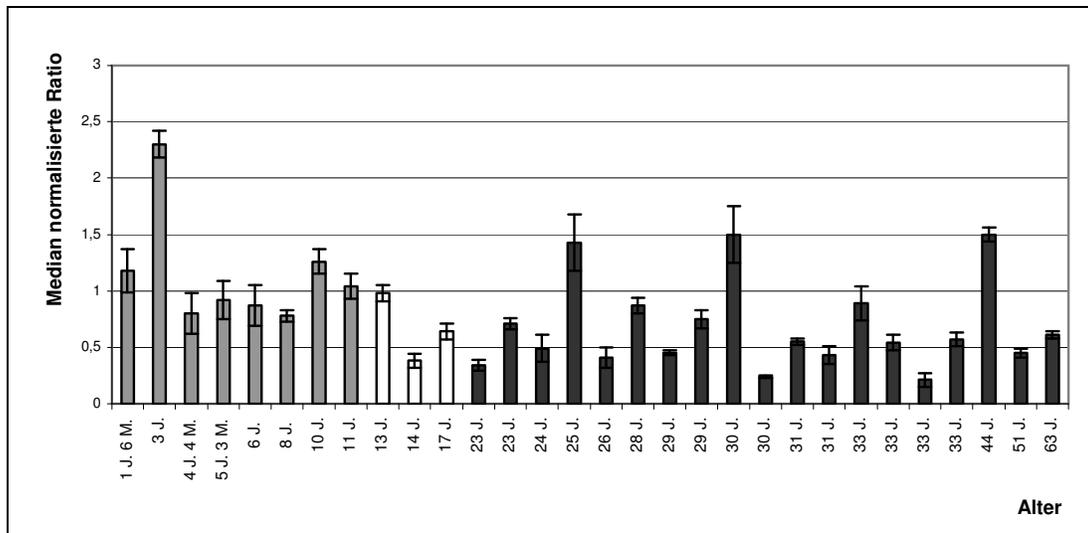
#### **4.3.1.1 Keine geschlechts- jedoch eine altersabhängige Veränderung im Transkriptionsprofil**

Die Blutproben wurden sowohl auf eine geschlechts- wie auch auf eine altersabhängige Veränderung im Transkriptionsprofil untersucht. Um eine geschlechtsspezifische Transkription in der Blut-RNA für jedes der untersuchten Gene zu beurteilen, wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse, die auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied in den Transkriptionsprofilen hinwiesen.

Um die Ratio Werte auf eine mögliche Altersabhängigkeit hin untersuchen zu können, mussten die Proben in Altersabschnitte unterteilt werden. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Einteilungen vorgenommen: zum einen wurden alle Proben (sowohl Männer als auch Frauen) in präpubertär ( $\leq 12$  Jahre) mit n = 13, in pubertär ( $> 12$  bis  $\leq 20$  Jahre) mit n = 10 und postpubertär ( $> 20$  Jahre) mit n = 36 unterteilt. Diese drei Altersgruppen wurden durch den Kruskal-Wallis-Test auf mögliche signifikante Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der Enzyme hin miteinander verglichen. Dabei zeigte sich ein hochsignifikantes Ergebnis für das Transkriptionsprofil der 5 $\alpha$ R1 (p = 0,005) bezogen auf die Alterseinteilung.

Der Kruskal-Wallis-Test wurde nochmals für die gleiche Altersunterteilung durchgeführt, jedoch dieses Mal unter Berücksichtigung des Geschlechts. Hierbei ergab dies eine Altersgruppeneinteilung bei den Frauen mit n = 8 für präpubertär,

$n = 3$  für pubertär und  $n = 19$  für postpubertär. Für die Männer lag eine Einteilung von 5 präpubertären, 7 pubertären und 17 postpubertären Proben vor. Auch in diesem Fall zeigte sich ebenfalls für die 5 $\alpha$ R1 ( $p = 0,026$ ) ein signifikanter altersabhängiger Transkriptionsunterschied, jedoch dieses Mal nur für die weiblichen Proben mit  $p = 0,026$  (Abb. 11). Die stärkste Transkription wies dabei die präpubertäre Altersgruppe auf.



**Abb. 11:** Signifikant erhöhtes Transkriptionsprofil der 5 $\alpha$ R1 in den acht präpubertären Proben der weiblichen Normalkontrollen (hellgraue Balken). Es erfolgte eine Alterseinteilung der weiblichen Proben in präpubertär ( $\leq 12$  Jahre) mit  $n = 8$ , in pubertär ( $> 12$  bis  $\leq 20$  Jahre) mit  $n = 3$  und postpubertär ( $> 20$  Jahre) mit  $n = 19$ . Hellgraue Balken = präpubertär; weiße Balken = pubertär; dunkelgraue Balken = postpubertär; Fehlerbalken = Standardabweichung.

Da mit  $n = 13$  für die präpubertäre und mit  $n = 10$  für die pubertäre Altersgruppe im Vergleich zu den 36 vorhandenen postpubertären Blut-RNA-Proben diese Gruppen relativ klein waren, wurde eine zweite Alterseinteilung durchgeführt. Diese unterteilte die Blutproben in die Bereiche  $\leq 20$  Jahre, welcher alle prä- und pubertären Proben beinhaltete, und in  $>20$  Jahre für alle postpubertären Proben. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für die gesamte Stichprobengröße (Frauen und Männer zusammengefasst) durchgeführt und die Alterseinteilungen miteinander verglichen. Es zeigten sich wiederum für die 5 $\alpha$ R1 ( $p = 0,001$ ), aber auch für die 17 $\beta$ -HSD Typ 10 ( $p = 0,031$ ) signifikante Unterschiede.

Der Mann-Whitney-U-Test wurde ebenfalls separat für die weiblichen und männlichen Proben durchgeführt. Dabei konnte für beide Geschlechter ein

signifikanter Wert für die 5 $\alpha$ R1 ermittelt werden (Frauen:  $p = 0,025$ ; Männer:  $p = 0,024$ ). Für die 17 $\beta$ -HSD Typ 10 ergab dieser Test nur für die männlichen Proben einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,039$ ). Für beide Enzyme zeigte sich eine erhöhte mRNA-Expression für den Altersbereich  $\leq 20$  Jahre.

#### **4.3.2 Nachweis aller untersuchten Gene in der RNA aus Genitalhautfibroblastenproben**

Wie in Abschnitt 3.1.9 beschrieben, wurden insgesamt 33 hVHF-Zellkultur-Proben mit einer Altersspanne zwischen vier Tagen und 83 Jahren und 11 Skrotalhautfibroblastenproben von Patienten zwischen einem Monat und 58 Jahren (Tab. 5 und 6) untersucht. Die Anzucht der Zellkulturen und Extraktion der RNA erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Da die RNA aus den Fibroblasten deutlich höher konzentriert war als die Proben der Blut-RNA, konnte für die cDNA-Erststrangsynthese jeweils 1  $\mu\text{g}$  RNA eingesetzt werden. Es wurden in beiden Gewebelokalisationen alle Transkripte der untersuchten Gene nachgewiesen. Nur in vereinzelt Proben konnten nicht für alle untersuchten Gene eine Transkription nachgewiesen werden. In den hVHF-RNA Zellkulturproben wurde in einer Proben kein 17 $\beta$ -HSD Typ 1- und in drei Proben kein 17 $\beta$ -HSD Typ 3 Transkript gemessen, des Weiteren konnte in jeweils zwei Proben keine Transkription der Gene der 5 $\alpha$ R2 , der 17 $\beta$ -HSDs Typ 2 und 4 detektiert werden. Bei den Skrotalhautfibroblasten wurde in einer Probe keine 17 $\beta$ -HSD Typ 1 Transkription und in zwei Proben keine 17 $\beta$ -HSD Typ 2 Transkription gemessen.

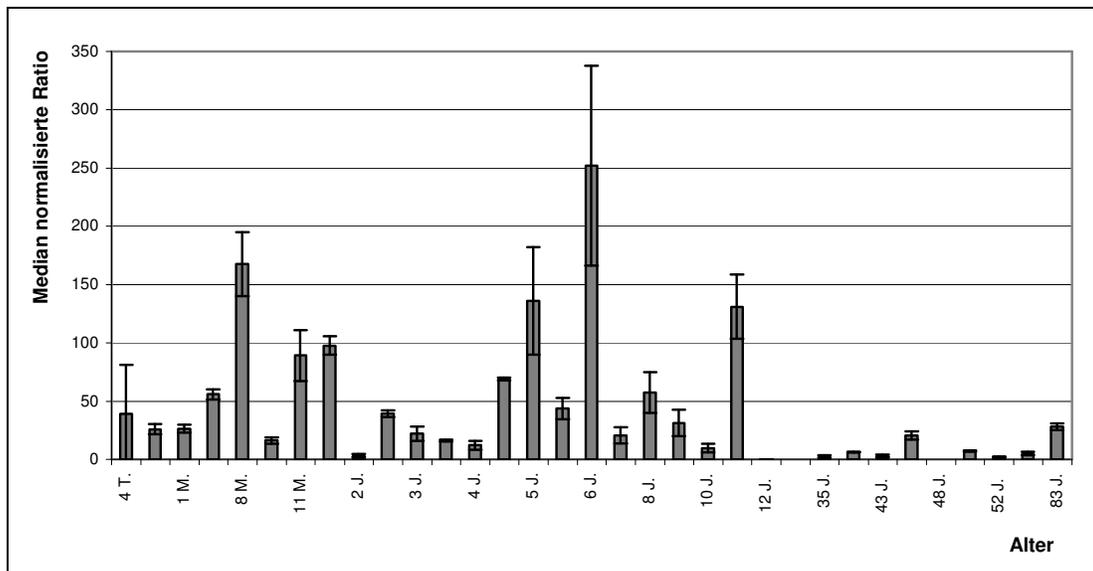
##### **4.3.2.1 Überprüfung der altersabhängigen Transkription in Genitalhautfibroblasten**

###### hVHF-Proben: Erhöhte Transkription der 5 $\alpha$ R2 in den Proben $< 20$ Jahre

Zur Überprüfung, ob das Probandenalter der 33 hVHF-Proben einen Einfluss auf die Transkription der untersuchten Gene hat, wurden die Proben ebenfalls in Altersgruppen eingeteilt. Hierzu wurden zwei Altersgruppen ausgewählt, wobei die eine Gruppe die Proben mit einem Alter von  $< 20$  Jahren ( $n = 24$ ) und die zweite

Gruppe die Proben ab > 20 Jahren (n = 9) umfasste. Wie aus Tab. 5 zu ersehen ist, lagen in dem Altersbereich zwischen > 12 und < 35 Jahren keine hVHF-Normalkontrollproben vor.

Der Mann-Whitney-U-Test wurde durchgeführt und die beiden Altersgruppen miteinander verglichen. Es zeigte sich für die 5αR2 (p = 0,002) ein hochsignifikantes Ergebnis, wobei eine deutlich höhere Transkription in der Altersgruppe < 20 Jahre vorlag. Die beiden ältesten Patientenproben dieser Altersgruppe (12 Jahre) wiesen dabei die niedrigste mRNA-Expression auf (Abb. 12). Für alle anderen untersuchten Gene konnte keine Altersabhängigkeit in Bezug auf die ermittelten Transkriptionsprofile gezeigt werden.



**Abb. 12:** Es zeigte sich eine deutlich höhere Transkription der 5αR2 in den Proben < 20 Jahre. Das Transkriptionsprofil der 5αR2 in den 22 untersuchten RNA-Proben aus hVHF von gesunden, normal virilisierten Männern. Die beiden Proben der 12 jährigen Patienten zeigten die niedrigsten Ratios dieser Altersgruppe, wobei in der einen Probe kein Transkript der 5αR2 nachgewiesen werden konnte. Fehlerbalken = Standardabweichung.

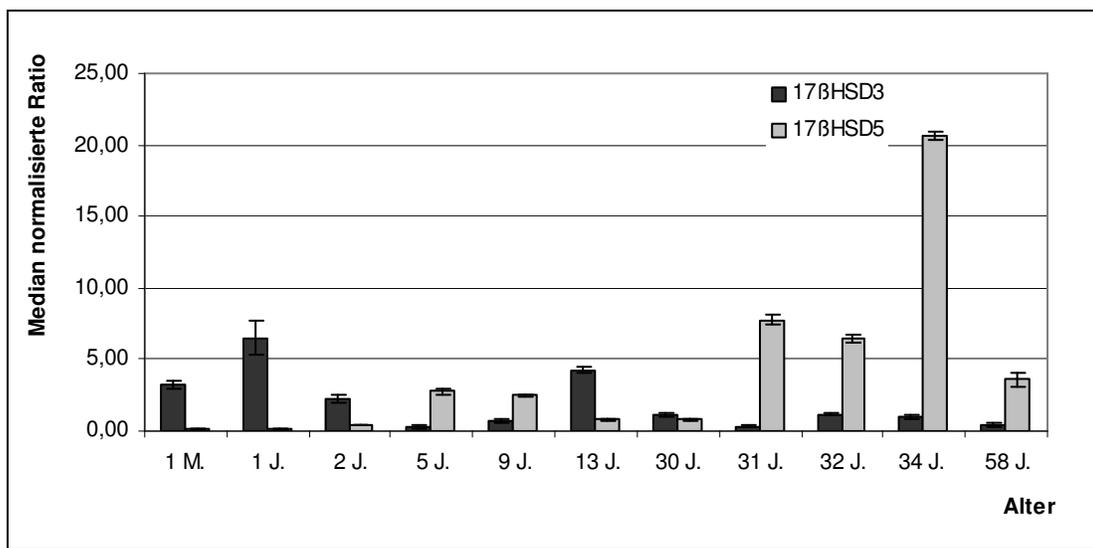
#### Skrotalhautproben: Verändertes Transkriptionsprofil der 17β-HSD Typ 3 und 5

Die 11 untersuchten Skrotalhautproben von gesunden, normal virilisierten Männern wurden ebenfalls in zwei Altersgruppen eingeteilt. Dabei umfasste die eine Altersgruppe alle Proben im Alter von < 20 Jahren (n = 6) und die zweite alle

Proben > 20 Jahre (n = 5). Für den Altersbereich zwischen 13 und 30 Jahre lagen keine Proben zur Untersuchung vor (Tab. 6).

Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurden die beiden Altersgruppen auf eine mögliche altersabhängige Transkription der Gene hin verglichen. Es zeigte sich für die 17 $\beta$ -HSD Typ 5 ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,018$ ) zwischen den beiden Altersgruppen, wobei die Proben > 20 Jahre eine eindeutig höhere mRNA-Expression des Isoenzym aufwiesen (Abb. 13).

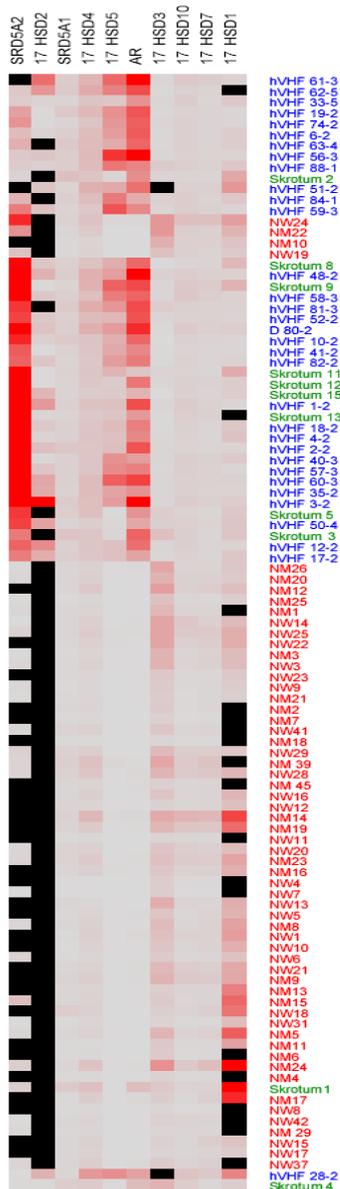
Bei den anderen Genen konnten keine signifikanten altersabhängigen Unterschiede ermittelt werden. Es zeigten sich jedoch für die 17 $\beta$ -HSD Typ 3 in dem Altersbereich < 20 Jahre höhere Ratio-Werte (max. Ratio von 6,5 ( $\pm 1,21$ )) als bei den Proben der > 20 Jährigen (max. Ratio von 1,17 ( $\pm 0,05$ )) (Abb. 13).



**Abb. 13:** Verändertes Transkriptionsprofile der 17 $\beta$ -HSD Typ 3 (schwarz) und Typ 5 (grau) in den 11 untersuchten Skrotalhautfibroblastenproben. Die 17 $\beta$ -HSD Typ 5 zeigte eine deutlich höhere mRNA-Expression in den Proben > 20 Jahre, wohingegen die 17 $\beta$ -HSD Typ 3 in den Proben < 20 Jahre eine höhere Transkription aufwies. Fehlerbalken = Standardabweichung.

### 4.3.3 Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der Blut- und Genitalhautfibroblasten-RNA

Die Transkriptionsprofile der untersuchten Gene in der Blut- und Genitalhautfibroblasten-RNA wurden miteinander verglichen. Um die Transkriptionsprofile der 10 untersuchten Enzyme von einer so großen Anzahl von Proben grafisch darzustellen, wurde eine Clusterabbildung gewählt (Abb. 14). Diese Art der Darstellung wird häufig bei Mikroarray-Experimenten gewählt, bei denen es notwendig ist, eine große Menge an Daten möglichst übersichtlich zu visualisieren. Die Clusterabbildung wurde mit den unter Abschnitt 3.4 aufgeführten



Programmen generiert. Zur Erstellung dieses Clusters wurden von dem verwendeten Programm von jeder Proben die ermittelten Mediane der  $\Delta$ -CP normalisierten Ratio-Werte für die einzelnen Gene miteinander verglichen und jeweils nach den größten Übereinstimmungen dargestellt. Dabei wurden die ermittelten Ratio-Werte je nach Höhe der gemessenen Transkriptmenge in jeder Probe und für jedes untersuchte Gen farblich angezeigt, wobei eine Abstufung von rot für hohe Ratio-Werte bis hellgrau für niedrige Werte verwendet worden ist. Bei den schwarzen Feldern konnte in der entsprechenden Probe kein Transkript des Gens

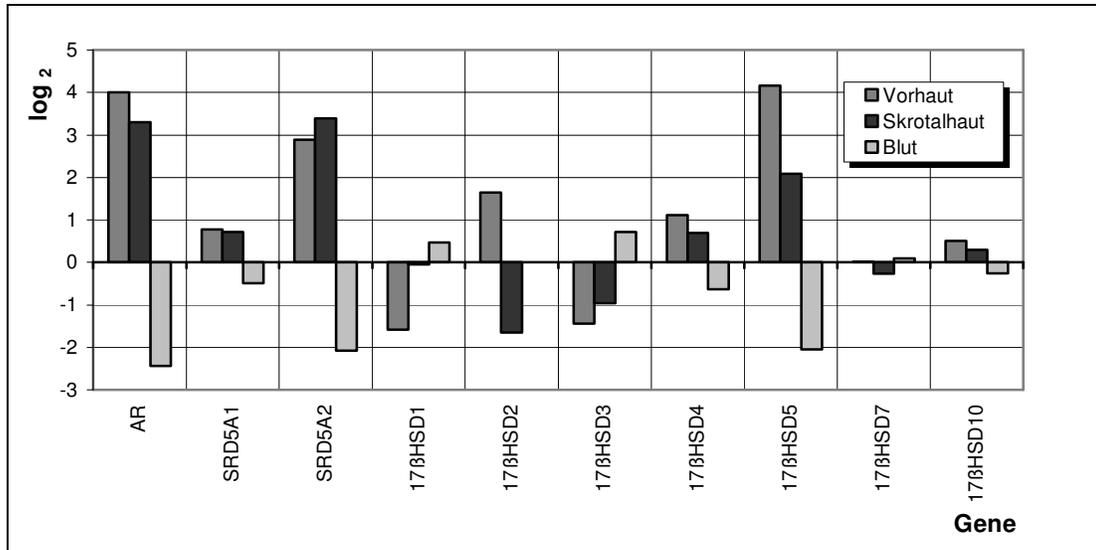
**Abb. 14:** Clusterdarstellung der 103 untersuchten Proben.

Die von rot bis hellgrau abgestuften Felder zeigen die Ergebnisse der ermittelten Mediane der normalisierten Ratios an, dabei stehen die roten Felder für hohe Ratio-Werte und die hellgrauen für niedrige Werte. Schwarze Felde zeigen Proben, in denen kein Transkript des Gens nachweisbar war. Auf der X-Achse sind die untersuchten Gene dargestellt und auf der Y-Achse die untersuchten Proben. Proben: Rot = Blutproben (NW = Frauen; NM = Männer); Blau = (hVHF) Vorhautfibroblasten; Grün = Skrotalhautproben.

nachgewiesen werden. Auf der X-Achse sind die Gene dargestellt und auf der Y-Achse die untersuchten Proben.

Die einzelnen Ratio-Werte der unterschiedlichen Gene konnten nicht direkt miteinander verglichen werden, da unterschiedliche Probenverdünnungen verwendet worden sind. Die Clusterabbildung ist jedoch sehr gut geeignet, die Verteilung der Proben, die sich klar in zwei Bereiche (Genitalhautfibroblasten- und Blutproben) auftrennen, darzustellen. Es finden sich nur vereinzelt Ausnahmen, deren veränderte Zuordnung im Cluster sich jedoch zumeist auf die Ergebnisse einzelner Gene zurückführen lässt. Bei den vier auffälligen Blutproben (NW24, NM22, NM10 und NW19), die in den Bereich der Genitalhautfibroblastenproben einsortiert wurden, sind die ermittelten Ratio-Werte der 5 $\alpha$ R2 in den jeweiligen Proben für die veränderte Zuordnung verantwortlich. Weitere Clusterabfragen (nicht dargestellt) haben gezeigt, dass diese Proben sich bei den Blutproben einordnen, wenn die Ergebnisse der 5 $\alpha$ R2 aus dem Cluster herausgenommen würden. Des Weiteren wurden zwei Skrotalhautproben von dem Programm zu den Blutproben sortiert. Davon zeigt die eine Probe (Skrotum 1) eine auffällig hohe Transkription der 17 $\beta$ -HSD 1 im Vergleich zu den anderen Skrotalhautfibroblastenproben.

In Abb. 15 wurden die Variationsunterschiede der erstellten Transkriptionsprofile für jedes untersuchte Gen in den Blutzellen, hVHF und Skrotalhautfibroblasten dargestellt. Dabei wurde der Mittelwert aller ermittelten Mediane der normalisierten Ratio-Werte für jedes Gen in den unterschiedlichen RNA-Lokalisationen (Blutzellen, hVHF und Skrotalhautfibroblasten) als Ratio-Wert in der Log<sub>2</sub>-Phase dargestellt. Im Weiteren wurde der Mittelwert der normalisierten Ratio-Werte von allen untersuchten Proben bestimmt und gleich Null gesetzt. Wiesen die Mittelwerte der einzelnen Gene in den unterschiedlichen RNA-Lokalisationen höhere Transkriptionslevel auf als der Gesamtmittelwert, so wurde ihnen ein positiver Wert zugeordnet. Bei einem niedrigeren Transkriptionlevel wurden ihnen ein negativer Wert zugeordnet. Mit dieser Kalkulation konnten die Unterschiede der Transkriptionsprofile zwischen den hVHF-, Skrotalhautfibroblasten- und Blutproben visualisiert werden.



**Abb. 15:** Darstellung der Variationsunterschiede der ermittelten Transkriptionsprofile für jedes untersuchte Gen in den Blutzellen, hVHF und Skrotalhautfibroblasten. Hierfür wurden die Mittelwerte der Mediane der normalisierten Ratio-Werte für jedes Gen in den unterschiedlichen RNA-Lokalisationen (Blutzellen, hVHF und Skrotalhautfibroblasten) ermittelt und diese in die Log<sub>2</sub>-Phase transformiert. Es wurde weiterhin der Mittelwert der normalisierten Ratio-Werte aller Proben bestimmt und automatisch gleich Null gesetzt. Alle Transkriptionslevel, die größer als dieser Mittelwert waren, wurden als positive Werte dargestellt und Transkripte, die kleiner als der Mittelwert waren, wurden als negative Werte dargestellt.

Aus der Abb. 15 ist zu erkennen, dass die beiden Genitalhautfibroblastenlokalisationen Vorhaut und Skrotalhaut für die Gene des AR, der SRD5A1 und 2, der 17β-HSD 4, 5 und 10 höhere Transkriptionslevel aufwiesen als die Blutproben. Die 17β-HSD 2 zeigte ein höheres Transkriptionslevel in den hVHF verglichen mit den Skrotalhautproben. Die 17β-HSDs 1 und 3 wiesen beide eine höhere mRNA-Expression in den Blutproben auf. Nur die 17β-HSD 7 zeigte eine relativ gleichmäßige mRNA-Expression in den drei RNA-Lokalisationen auf.

Die Transkriptionsprofile der untersuchten Gene in den drei unterschiedlichen Lokalisationen wurden zusätzlich mit dem Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Dabei zeigten fast alle Gene hochsignifikante Unterschiede ( $p = \leq 0,01$ ) in ihren Transkriptionsprofilen je nach RNA-Lokalisation. Nur die 17β-HSD 7 wies keine signifikant unterschiedliche mRNA-Expression auf, was bereits in Abb. 15 gezeigt werden konnte.

Die Transkriptionsprofile der beiden Fibroblastenlokalisationen (Vorhaut und Skrotalhaut) wurden jeweils getrennt voneinander mit den Profilen der Blutproben verglichen. Dabei zeigten sich folgende Ergebnisse:

#### Blut- und hVHF-Proben:

Ein Vergleich der Transkriptionsprofile dieser beiden RNA-Lokalisationen mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab für die Gene des AR, der 5 $\alpha$ -R1 und 2 und der 17 $\beta$ -HSD 1, 3, 4, 5 und 10 einen hochsignifikanten ( $p = \leq 0,01$ ) Unterschied. Nur für die 17 $\beta$ -HSD 7 zeigte sich auch für diese RNA-Lokalisationen kein signifikantes Ergebnis.

Diese hochsignifikanten Transkriptionsunterschiede der Gene zeigten sich auch bei Berücksichtigung von Alter oder Geschlecht. Dafür wurden die Proben in zwei Altersgruppen von  $\leq 20$  Jahren (hVHF:  $n = 24$ ; Blut:  $n = 23$ ) und  $> 20$  Jahre (hVHF:  $n = 9$ ; Blut:  $n = 36$ ) aufgeteilt und miteinander verglichen. Für die geschlechtsspezifische Abfrage wurden jeweils nur die Blutproben von Frauen ( $n = 30$ ) und die von Männern ( $n = 29$ ) mit den Ratio-Werten der hVHF-Proben verglichen. Der Vergleich der Transkriptionslevel ergab für die Blutproben von Frauen ( $\leq 20$  Jahre:  $n = 11$ ;  $> 20$  Jahre:  $n = 19$ ) die gleichen Ergebnisse. Bei dem Vergleich der Transkriptionsergebnisse der Blut-RNA-Proben von Männern ( $\leq 20$  Jahre:  $n = 12$ ;  $> 20$  Jahre:  $n = 17$ ) zeigte sich bei den Proben  $\leq 20$  Jahre ebenfalls für die 17 $\beta$ -HSD 10 ein nicht signifikantes Ergebnis.

#### Blut- und Skrotalhautfibroblastenproben:

Der Vergleich der Transkriptionsprofile oben genannter RNA-Lokalisationen mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab für die Isoenzyme Typ 1 und 7 der 17 $\beta$ -HSD keine signifikanten Unterschiede. Die 17 $\beta$ -HSD 10 wies mit  $p = 0,044$  ein signifikantes Ergebnis auf. Die Gene des AR, der 5 $\alpha$ -R1 und 2 und der 17 $\beta$ -HSD 3, 4 und 5 zeigten alle einen hochsignifikanten ( $p = \leq 0,01$ ) Transkriptionsunterschied.

Eine geschlechtsspezifische Abfrage, bei der jeweils nur die Blutproben von Frauen ( $n = 30$ ) und von Männern ( $n = 29$ ) mit den Ratio-Werten der Skrotalhautfibroblastenproben verglichen wurden, ergab keine Unterschiede zu den Ergebnissen ohne Berücksichtigung des Geschlechts.

Bei dem Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test auf einen altersabhängigen Transkriptionsunterschied hin, mit der Altersgruppeneinteilung  $\leq 20$  Jahren (Skrotum:  $n = 6$ ; Blut:  $n = 23$ ) und  $> 20$  Jahre (Skrotum:  $n = 5$ ; Blut:  $n = 36$ ), zeigten sich für den Altersbereich  $\leq 20$  Jahren signifikante Transkriptionsunterschiede ( $p = \leq 0,05$ ) bei der 17 $\beta$ -HSD 1 und 5 und hochsignifikante ( $p = \leq 0,01$ ) für den AR, die 5 $\alpha$ R1 und die 17 $\beta$ -HSD 4. Für die Altersgruppe  $> 20$  Jahre ergaben sich zwischen den Skrotalhautfibroblasten- und Blut-Proben hochsignifikante Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der 17 $\beta$ -HSD 3, 4 und 5, der 5 $\alpha$ R1 und 2 und des AR.

Eine Kombination von alters- und geschlechtsabhängiger Abfrage zeigte für den Altersbereich  $> 20$  Jahre sowohl für die Blut-Proben von Frauen ( $n = 19$ ) als auch von Männern ( $n = 17$ ) vergleichbare signifikante Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der 17 $\beta$ -HSDs Typ 3, 4 und 5, der 5 $\alpha$ R1 und 2 und des AR wie ohne Geschlechtsaufteilung.

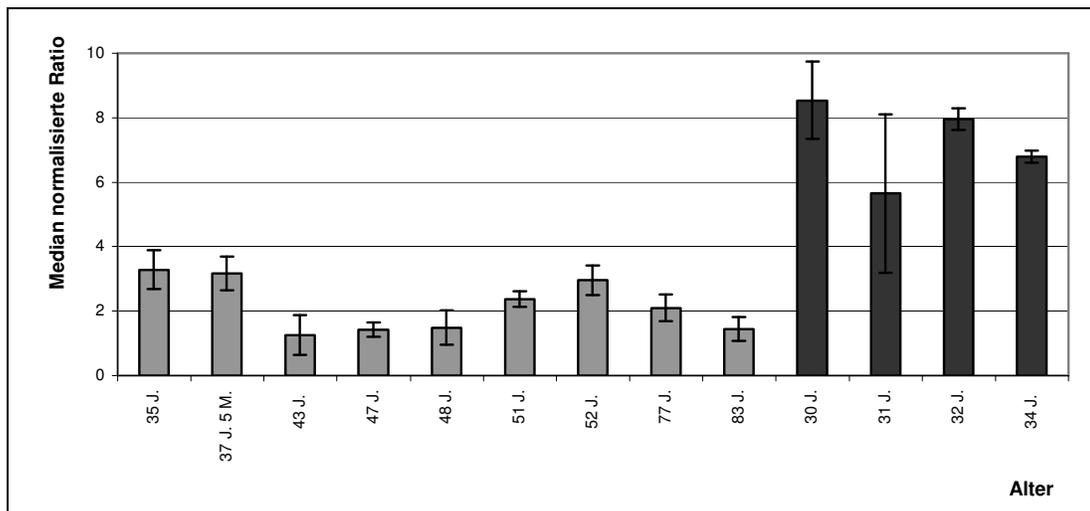
In dem Altersbereich  $\leq 20$  Jahren kam es jedoch zu veränderten Ergebnissen. Bei dem Vergleich der Transkriptionsprofile der Skrotalhautfibroblasten- und den Blutproben von Frauen  $\leq 20$  Jahren ergab sich nur noch für den AR, der 5 $\alpha$ R1 und der 17 $\beta$ -HSD Typ 4 ein hochsignifikanter ( $p = \leq 0,01$ ) und für die 17 $\beta$ -HSD Typ 5 ein signifikanter ( $p = \leq 0,05$ ) Transkriptionsunterschied, jedoch nicht mehr für die 17 $\beta$ -HSD Typ 1. Der Vergleich der männlichen Blutproben und der Skrotalhautfibroblastenproben ergab hochsignifikante Unterschiede der Transkriptionslevel des AR und der 5 $\alpha$ R1 sowie signifikante für die 17 $\beta$ -HSDs Typ 1 und 4.

#### **4.3.4 Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der hVHF- und Skrotalhautfibroblastenproben**

Zum Vergleich der Transkriptionsprofile der Fibroblasten-RNA aus den beiden unterschiedlichen Lokalisationen der Genitalhautregion von gesunden, normal virilisierten Männern wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Dabei ergaben sich für die 17 $\beta$ -HSDs Typ 1, 2 und 5 hochsignifikante ( $p = \leq 0,01$ ) und für die 17 $\beta$ -HSD 4 und den AR signifikante Unterschiede ( $p = \leq 0,05$ ) in ihren Transkriptionsprofilen. Bis auf die 17 $\beta$ -HSD 1 zeigten alle auffälligen Gene eine deutlich höhere Transkription in hVHF (siehe Medianangabe in Tab. 13). Der

signifikante Unterschied für die Transkriptionsprofile der 17 $\beta$ -HSD 1 erklärte sich aus einer Skrotalhautprobe, die mit einem Ratio-Wert von 70,49 um das 8-fache höher lag als die übrigen Skrotalhaut Normalkontrollen, die Ratio-Werte zwischen 2,13 und 8,54 aufwiesen. Diese Probe fiel bereits durch ihre erhöhte Transkription der 17 $\beta$ -HSD 1 in der Clusterabbildung (Abb. 14) im Abschnitt 4.3.3 auf.

Es wurde zusätzlich eine Altersgruppeneinteilung der Proben durchgeführt. Die hVHF- und Skrotalhaut-Proben wurden in die Altersgruppen < 20 Jahre und > 20 Jahre unterteilt. Die Alterseinteilung erklärt sich in dem Abschnitt 4.3.2.1. Die Ergebnisse der untersuchten Gene aus den beiden unterschiedlichen Lokalisationen wurden dann für jede Altersgruppe durch den Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen. Für die Proben < 20 Jahre zeigten sich signifikante Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der 17 $\beta$ -HSD 5 ( $p = < 0,001$ ), der 17 $\beta$ -HSD 7 ( $p = 0,04$ ) und des AR ( $p = 0,026$ ). Diese Gene zeigten alle eine höhere Transkription in der RNA aus den hVHF-Proben. Ein Vergleich der Proben > 20 Jahre lieferte für die 17 $\beta$ -HSD 1 einen hochsignifikanten Wert ( $p = 0,005$ ), wobei dieses Enzym verglichen mit den neun hVHF-Proben mit Ratio-Werten zwischen 1,26 und 3,29 die höheren Transkriptkonzentrationen in den vier Skrotalhautfibroblastenproben (Ratios zwischen 5,65 und 8,54) aufwies (Abb. 16).



**Abb. 16:** Höhere Transkription der 17 $\beta$ -HSD Typ 1 in den vier Skrotalhautfibroblastenproben > 20 Jahre im Vergleich mit den neun hVHF-Proben. Hellgraue Balken = hVHF-Proben; dunkelgraue Balken = Skrotalhautfibroblastenproben; Fehlerbalken = Standardabweichung.

### **4.3.5 Hohe interindividuelle Variationsschwankungen in der Transkription der Gene**

Trotz der Blut und Fibroblasten spezifische Transkriptionsprofile der untersuchten Gene, die sich im Vergleich signifikant unterschieden, zeigten die Gene in den unterschiedlichen RNA-Lokalisationen zum Teil sehr hohe interindividuelle Unterschiede in ihrer Transkription.

Es wurden die Mediane der normalisierten Ratio-Werte für alle untersuchten Gene in jeder Probe ermittelt. Dabei zeigten sich interindividuelle Variabilitätsschwankungen um das Vielfache. Die geringste Variationsspanne wies das Transkript der 17 $\beta$ -HSD 4 in der Skrotalhautfibroblasten-RNA auf. Für die 11 untersuchten Proben wurden Ratio-Werte zwischen 2,41 bis 6,91 ermittelt, hierbei lag der ermittelte Median dieser Variationsspanne bei 3,55. Dies ergab eine Variabilität um das 2,86-fache.

Die größte Schwankungsbreite in den gemessenen Ratio-Werten zeigte das Gen der 5 $\alpha$ R2 (SRD5A2) in den hVHF-RNA-Proben. Für die 31 Proben, in denen das Transkript nachgewiesen werden konnte, zeigte sich eine Schwankung der Ratio-Werte von 0,19 bis 252,01. Der Median dieser Variationsspanne lag bei 25,89 und die Proben zeigten für dieses Gen in den hVHF-Proben eine 1326-fache Variabilität. Die Variationsschwankungen sind in Tab. 13 für alle untersuchten Gene in den unterschiedlichen RNA-Lokalisationen dargestellt.

**Tab. 13:** Darstellung der Variationsspannen der ermittelten normalisierten Ratio-Werte für jedes untersuchte Gen in den unterschiedlichen RNA-Lokalisationen. Es handelt sich um den Median der ermittelten Variationsbreiten und um deren Variabilität zwischen den größten und kleinsten gemessenen Ratio-Wert.

Enzym		Genitalhautfibroblasten		Blut		
		Vorhaut	Skrotalhaut	Frauen	Männer	Gesamt
17β-HSD1	Proben (n)	32	10	23	20	42
	Variationsbreite der normalisierten Ratios	0,86-14,58	2,13-70,49	3,00-17,53	1,91-49,94	1,91-49,94
	Median	1,56	4,54	5,46	8,82	6,5
	<b>Variabilität</b>	<b>16,95 x</b>	<b>33,09 x</b>	<b>5,8 x</b>	<b>26,15 x</b>	<b>26,15 x</b>
17β-HSD2	Proben (n)	30	7	0	0	0
	Variationsbreite der normalisierten Ratios	0,19-53,02	0,25-6,28			
	Median	3,72	0,38			
	<b>Variabilität</b>	<b>279,1 x</b>	<b>25,12 x</b>			
17β-HSD3	Proben (n)	31	11	30	29	59
	Variationsbreite der normalisierten Ratios	0,27-2,82	0,28-6,50	0,90-11,29	0,86-12,61	0,86-12,61
	Median	0,79	1,10	3,35	4,41	3,54
	<b>Variabilität</b>	<b>10,4 x</b>	<b>23,2 x</b>	<b>12,5 x</b>	<b>14,66 x</b>	<b>14,66 x</b>
17β-HSD4	Proben (n)	33	11	30	29	59
	Variationsbreite der normalisierten Ratios	2,28-11,21	2,41-6,91	0,28-4,04	0,55-5,96	0,28-5,96
	Median	4,78	3,55	1,50	1,42	1,42
	<b>Variabilität</b>	<b>4,9 x</b>	<b>2,86 x</b>	<b>14,4 x</b>	<b>10,8 x</b>	<b>21,28 x</b>
17β-HSD5	Proben (n)	33	11	30	29	59
	Variationsbreite der normalisierten Ratios	0,65-28,56	0,09-20,67	0,04-0,67	0,05-0,78	0,04-0,78
	Median	10,43	2,46	0,14	0,13	0,14
	<b>Variabilität</b>	<b>43,9 x</b>	<b>229,66 x</b>	<b>16,75 x</b>	<b>15,6 x</b>	<b>19,5 x</b>
17β-HSD7	Proben (n)	33	11	30	29	59
	Variationsbreite der normalisierten Ratios	0,73-2,97	0,55-2,46	0,28-4,52	0,37-5,85	0,28-5,85
	Median	1,28	1,05	1,29	1,39	1,35
	<b>Variabilität</b>	<b>4,07 x</b>	<b>4,47 x</b>	<b>16,14 x</b>	<b>15,8 x</b>	<b>20,89 x</b>
17β-HSD10	Proben (n)	33	11	30	29	59
	Variationsbreite der normalisierten Ratios	1,16-4,23	1,00-3,04	0,24-4,58	0,21-6,45	0,21-6,45
	Median	1,81	1,57	1,05	1,07	1,07
	<b>Variabilität</b>	<b>3,65 x</b>	<b>3,04 x</b>	<b>19,1 x</b>	<b>30,7 x</b>	<b>30,7 x</b>
SRD5A1	Proben (n)	33	11	30	29	59
	Variationsbreite der normalisierten Ratios	0,85-3,24	1,05-4,59	0,21-2,30	0,35-1,98	0,21-2,30
	Median	1,80	1,73	0,73	0,75	0,75
	<b>Variabilität</b>	<b>3,8 x</b>	<b>4,37 x</b>	<b>10,95 x</b>	<b>5,66 x</b>	<b>10,95 x</b>
SRD5A2	Proben (n)	31	11	15	14	29
	Variationsbreite der normalisierten Ratios	0,19-252,01	0,40-199,44	0,11-30,66	0,37-12,20	0,11-30,66
	Median	25,89	36,62	0,87	0,76	0,83
	<b>Variabilität</b>	<b>1326,4 x</b>	<b>498,6 x</b>	<b>278,7 x</b>	<b>32,97 x</b>	<b>278,7 x</b>
AR	Proben (n)	33	11	30	29	59
	Variationsbreite der normalisierten Ratios	7,85-58,56	3,56-24,90	0,09-0,57	0,08-0,69	0,08-0,69
	Median	19,88	12,26	0,21	0,25	0,23
	<b>Variabilität</b>	<b>7,46 x</b>	<b>6,99 x</b>	<b>6,33 x</b>	<b>8,6 x</b>	<b>8,6 x</b>

#### **4.4 Untersuchung der Transkriptionsprofile von Patienten mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung**

Es wurden RNA-Proben von Patienten mit unterschiedlichen Geschlechtsdifferenzierungsstörungen aus den RNA-Lokalisationen Blut, hVHF und Skrotalhautfibroblasten untersucht. Diese Lokalisationen wurden gewählt, um die ermittelten Transkriptionsprofile mit den vorhandenen Normalkontrollgruppen vergleichen zu können.

Bei den Patientenproben lagen zwei unterschiedliche Gruppen vor. Zum einen die Patienten mit einer bekannten Diagnose: Androgen-Insensitivitäts Syndrom (AIS), 17 $\beta$ HSD3-Defekt, 5 $\alpha$ R2-Defekt, Adrenogenitales Syndrom (AGS) und Leydigzell-Hypoplasie. Bei der zweiten Gruppe handelte es sich um Patienten mit einer Hypospadie unbekannter Ursache.

##### **4.4.1 Veränderte Transkriptionsprofile einzelner Enzyme bei Patienten mit einer Hypospadie ungeklärter Ursache**

###### hVHF:

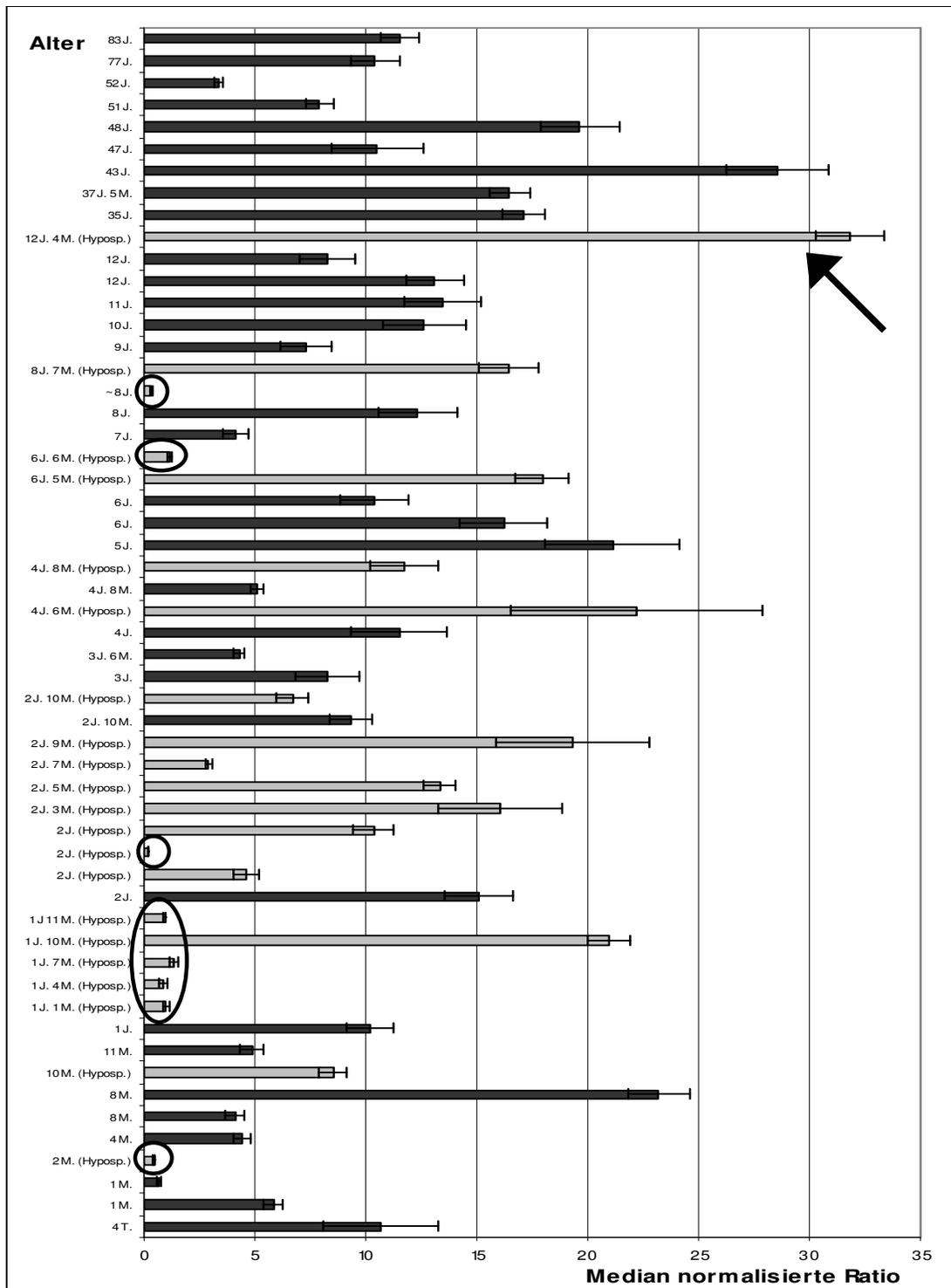
Die Ergebnisse der hVHF-Proben von den Normalkontrollen und den Hypospadiepatienten wurden miteinander verglichen. Ein Vergleich durch den Mann-Whitney-U-Test der Transkriptionsprofile der 22 hVHF-RNA-Proben von Patienten mit einer Hypospadie unbekannter Ursache mit den 33 untersuchten hVHF Normalkontrollen erbrachte keine signifikanten Unterschiede auf Transkriptionsebene.

Bei einer weiteren Abfrage wurden nur die Normalkontrollen mit einem Alter von  $\leq$  12 Jahren mit einbezogen, da der älteste Patient bei der Gewebeentnahme ein Alter von 12 Jahren und 4 Monaten aufwies. Die Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests ergab dabei für die 17 $\beta$ -HSD Typ 2 einen signifikanten Unterschied zwischen den Normalkontrollen ( $n = 24$ ) und den Hypospadiepatienten ( $n = 21$ ) ( $p = 0,029$ ). Diese ermittelte Signifikanz kam jedoch nur aufgrund einer einzelnen Normalkontrollprobe zustande, die einen Ratio-Wert von 53,02 aufwies, wohingegen die Werte der anderen Normalkontrollen zwischen 0,19 und 13,27 lagen.

**Tab. 14:** Transkriptionsunterschiede der Enzyme 17 $\beta$ -HSD Typ 1, 3, 5 und 7, der 5 $\alpha$ R1 und 2 und dem AR in zehn unterschiedlichen Hypospadiepatientenproben verglichen mit den Normalkontrollen. Es sind die Mediane der normalisierten Ratio-Werte dargestellt. Alle Proben, die ein im Vergleich zu den Normalkontrollen auffällig verändertes Transkriptionsprofil aufwiesen, wurden mit ihren entsprechenden Proben-Nr. aus Tab. 7a gekennzeichnet. hVHF-Norm. = humane Vorhautfibroblasten von normal virilisierten gesunden Männern; SRD5A1 und SRD5A2 = Gen der 5 $\alpha$ R1 und 2.

		17 $\beta$ -HSD1	17 $\beta$ -HSD3	17 $\beta$ -HSD5	17 $\beta$ -HSD7	SRD5A1	SRD5A2	AR
<b>hVHF-Norm.</b>	Proben (n)	32	31	33	33	33	31	33
	Variationsbreite der normalisierten Ratios	0,86-14,58	0,27-2,82	0,65-28,56	0,73-2,97	0,85-3,24	0,19-252,01	7,85-58,56
<b>Hypospadiе Patienten</b>	Proben (n)	21	22	22	22	22	22	22
	<b>n niedrige Transkription</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>4</b>			<b>1</b>
	<b>niedrige Transkription</b>	<b>0,47<sup>(19)</sup></b> <b>0,61<sup>(4)</sup></b>	<b>0,22<sup>(6)</sup></b>	<b>0,44<sup>(1)</sup></b> <b>0,99<sup>(3)</sup></b> <b>0,86<sup>(19)</sup></b> <b>1,37<sup>(5)</sup></b> <b>0,93<sup>(7)</sup></b> <b>0,22<sup>(9)</sup></b> <b>1,18<sup>(4)</sup></b> <b>0,33<sup>(20)</sup></b>	<b>0,49<sup>(1)</sup></b> <b>0,58<sup>(19)</sup></b> <b>0,56<sup>(5)</sup></b> <b>0,42<sup>(7)</sup></b>			<b>4,12<sup>(5)</sup></b>
	<b>n hohe Transkription</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	
	<b>hohe Transkription</b>	<b>12,60<sup>(1)</sup></b> <b>14,37<sup>(20)</sup></b>	<b>3,51<sup>(9)</sup></b>	<b>31,84<sup>(22)</sup></b>		<b>4,25<sup>(1)</sup></b>	<b>382,79<sup>(6)</sup></b>	

Für die übrigen Gene konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch für die Enzyme der 17 $\beta$ -HSD Typ 1, 3, 5 und 7, der 5 $\alpha$ R1 und 2 und dem AR bei insgesamt zehn Proben von Hypospadiepatienten eindeutige Auffälligkeiten in ihren Transkriptionsprofilen (Tab. 14) im Vergleich zu den Normalkontrollen. Bei allen Patienten lag ein 46,XY Karyotyp vor, jedoch handelte es sich bei den auffälligen Proben um drei Patienten mit einer weiblichen und sieben Patienten mit einer männlichen Geschlechtszuweisung.



**Abb. 17:** Transkriptionsprofil der 17β-HSD 5 für die untersuchten hVHF-Normalkontrollen (schwarz) und hVHF-Hypospadiaspatienten (grau). Die Proben sind nach Alter aufgetragen, von links (4 Tage) nach rechts (83 Jahre). Die 8 Hypospadiaspatientenproben, die durch einen sehr niedrigen Median der normalisierten Ratio im Vergleich zu den Normalkontrollen auffallen, sind durch Kreise markiert. Eine Probe (Pfeil) fällt durch eine sehr hohe Transkription auf.

Die auffälligsten Unterschiede in ihrer Transkription zeigte die 17 $\beta$ -HSD 5. Bei insgesamt acht der 22 untersuchten Hypospadiepatientenproben lagen eindeutig niedrigere normalisierte Ratio-Werte zwischen 0,22 und 1,37 (siehe Tab. 14) im Vergleich zu den Normalkontrollen vor. Für die Normalkontrollen wurde ein Variationsbereich zwischen 0,65 und 28,56 ermittelt. Nur bei einer Probe wurde eine Ratio unter 1,00 (0,65) nachgewiesen (Abb. 17) alle anderen Werte lagen über 3,00. Zudem wurde bei einer der Hypospadieproben der höchste Ratio-Wert (31,84) für die 17 $\beta$ -HSD 5 gemessene (Abb. 17).

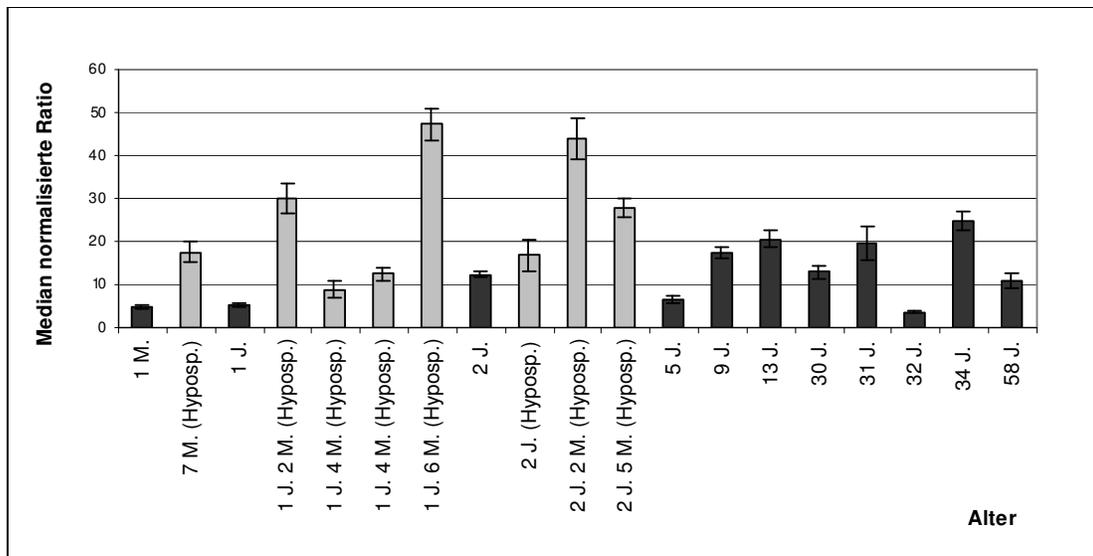
Für die 17 $\beta$ -HSD 7 wurden bei vier Proben deutlich verminderte mRNA-Konzentrationen gemessen. Die 17 $\beta$ -HSD 1 wies bei jeweils zwei Patientenproben verminderte und erhöhte Ratio-Werte auf (Tab. 14). Jedoch wurden für die 17 $\beta$ -HSD 1 auch bei zwei Normalkontrollen deutlich erhöhte Ratio-Werte gemessen. Alle weiteren Transkriptionsunterschiede sind der Tab. 14 zu entnehmen, wobei jede auffällige Patientenprobe mit ihren entsprechenden Proben-Nr. aus Tab. 7a gekennzeichnet worden ist.

#### Skrotalhautfibroblasten:

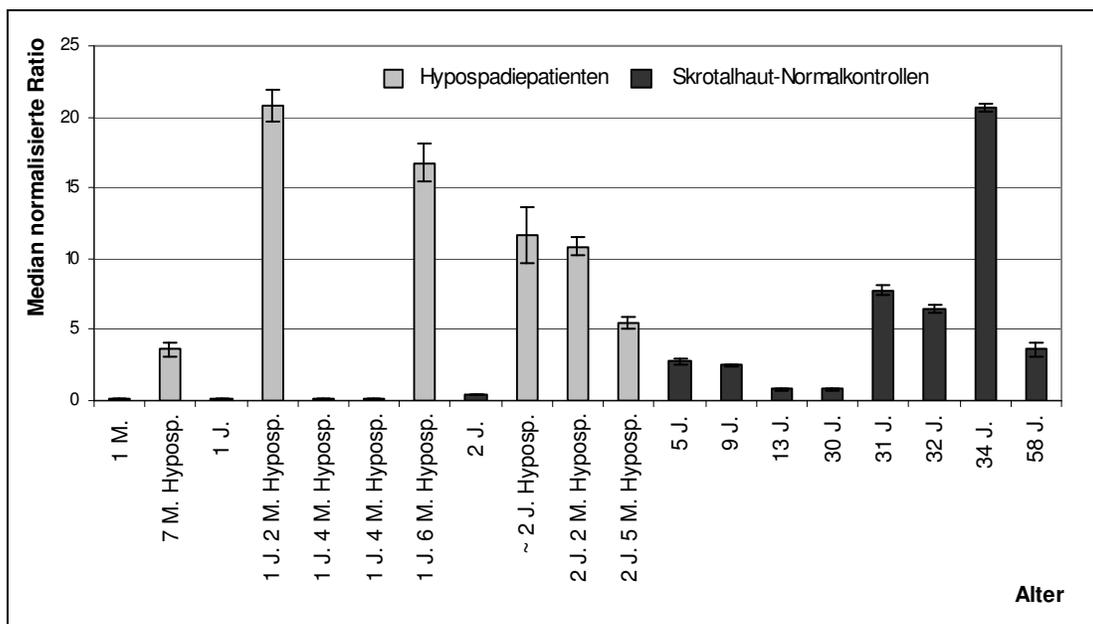
Aus Skrotalhautfibroblasten wurden acht Proben von Hypospadiepatienten untersucht und mit den Quantifizierungsergebnissen der 11 Normalkontrollproben verglichen.

Eine Untersuchung der beiden Gruppen durch den Mann-Whitney-U-Test ergab ein signifikantes Ergebnis für den AR ( $p = 0,039$ ). Dabei zeigten die Hypospadiepatientenproben, im Vergleich zu den Normalkontrollen (Abb. 18), deren maximaler Ratio-Wert 2,0 betrug, ein deutlich höheres Transkriptionslevel mit einem Ratio-Wert von max. 47,24. Es lag somit ein nicht ganz 25-facher Unterschied vor.

Die übrigen untersuchten Gene zeigten keine signifikanten Unterschiede, jedoch konnte bei der 17 $\beta$ -HSD 5 eine eindeutige Verschiebung des Transkriptionsprofils gezeigt werden (Abb. 19). Während das Isoenzym Typ 5 der 17 $\beta$ -HSD für die Normalkontrollen  $\leq 13$  Jahre einen maximalen Ratio-Wert von 2,77 aufwies, wurden für die Hypospadiepatienten Ratio-Werte von bis zu 20,8 ermittelt, was einen 7,5-fachen Unterschied entsprach.



**Abb. 18:** Deutlich signifikant erhöhte Transkription des AR bei den Hypospadiepatientenproben in Skrotalhautfibroblasten-RNA im Vergleich zu den Normalkontrollen. Hellgraue Balken = Hypospadiepatientenproben; dunkelgraue Balken = Skrotalhautfibroblastenproben; Fehlerbalken = Standardabweichung.



**Abb. 19:** Fünf der Hypospadiepatientenproben mit einem Alter von  $\leq 13$  Jahren zeigten auffällig hohe Ratio-Werte (20,8), verglichen mit den Normalkontrollen, deren Ratio-Werte für diesen Altersbereich deutlich niedriger waren (2,77). Die ermittelten Mediane der normalisierten Ratio-Werte der 17 $\beta$ -HSD 5 in der RNA aus Skrotalhautfibroblasten von 11 Normalkontrollen (dunkelgrau) und acht Hypospadiepatienten (hellgrau). Fehlerbalken = Standardabweichung.

Da die Probe des ältesten Patienten in dieser Untersuchung ein Alter von 2 Jahren und 5 Monate hatte, wurde zusätzlich eine Untersuchung mit einer Altersbeschränkung von  $\leq 13$  Jahren durchgeführt. Hierfür wurden sechs Normalkontrollproben und acht Patientenproben miteinander verglichen. Ein anschließender Gruppenvergleich durch den Mann-Whitney-U-Test ergab keine Veränderungen zu den ermittelten Werten ohne Altersbeschränkung.

#### **4.4.2 Patienten mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung bekannter Ursache**

Es konnten Proben von Patienten mit unterschiedlichsten Geschlechtsdifferenzierungsstörungen mit bekannter Diagnose untersucht werden. Da es sich hierbei um sehr seltene Fälle handelt, konnte jeweils nur auf eine geringe Anzahl von Proben zurückgegriffen werden. Es lagen RNA-Proben aus peripheren Blutzellen, hVHFs und Skrotalhautfibroblasten vor.

##### **4.4.2.1 RNA aus peripheren Blutzellen**

Wie bereits im Abschnitt 3.1.9 beschrieben wurde, konnten sowohl Blut-RNA-Proben von Patienten mit einem 46,XX als wie auch einem 46,XY Karyotyp untersucht werden. Hierbei handelte es sich um Proben von vier AGS (Adrenogenitales Syndrom)- (46,XX), fünf 17 $\beta$ -HSD3-, einen 5 $\alpha$ R2-Defekt-, zwei CAIS (kompletes Androgen-Insensitivitäts Syndrom)- und fünf LCH (Leydigzell-Hypoplasie)-Patienten (alle 46,XY) (Tab. 4).

Die ermittelten Ratio-Werte aller Patientengruppen wurden jeweils durch den Mann-Whitney-U-Test mit denen der Normalkontrollen verglichen. Dabei wurden unterschiedliche Abfragen durchgeführt, bei denen die miteinander zu vergleichenden Kohorten in jeweils geschlechts- und alters-abhängige und/oder unabhängige Gruppen unterteilt worden sind.

Das Transkript der 17 $\beta$ -HSD 1 konnte nur in den Patientenproben mit einem 17 $\beta$ -HSD3-Defekt nachgewiesen werden. In den anderen Patientengruppen war es nicht detektierbar.

### AGS-Patienten: verminderte Transkription bei AGS-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen

Die Transkriptionsprofile der AGS-Blutpatientenproben wurden denen der Blut-Normalkontrollen gegenübergestellt. Ein Vergleich der vier Blut-RNA-Proben von AGS (Adrenogenitales Syndrom)-Patienten und allen Blut-Normalkontrollen ergab einen signifikanten Unterschied für die mRNA-Expression der 17 $\beta$ -HSD 3 ( $p = 0,028$ ) und einen hochsignifikanten Unterschied bei der 17 $\beta$ -HSD 5 ( $p = 0,006$ ). Dabei wiesen die Patientenproben im Vergleich zu den Normalkontrollen niedrigere Ratio-Werte auf. Die gleichen signifikanten Unterschiede zeigten sich nach einer geschlechtsspezifischen Aufteilung der Normalkontrollen für die 29 untersuchten männlichen Normalkontrollen und den AGS-Patienten. Bei dem Vergleich der Transkriptionsprofile der AGS-Patienten und der 30 weiblichen Normalkontrollen zeigte sich nur noch für die 17 $\beta$ -HSD 5 ( $p = 0,007$ ) ein hochsignifikanter Unterschied.

Die gleichen Abfragen erfolgten nach einer Altersgruppenunterteilung in  $\leq 20$  Jahre und  $> 20$  Jahre. Die AGS-Proben teilten sich daraufhin in drei Proben  $\leq 20$  Jahre und eine Probe  $> 20$  Jahre. Ein Vergleich der Proben zeigte für die Gruppen  $\leq 20$  Jahre signifikante Ergebnisse. Die drei untersuchten AGS-Proben wiesen, im Vergleich zu den männlichen Normalkontrollen, Transkriptionsunterschiede für die Gene der 5 $\alpha$ R1 ( $p = 0,01$ ), der 17 $\beta$ HSD Typ 3 ( $p = 0,02$ ), 4 ( $p = 0,03$ ), 5 ( $p = 0,02$ ), 7 ( $p = 0,02$ ) und 10 ( $p = 0,04$ ) auf.

Die gleiche Abfrage zwischen den weiblichen Normalkontrollen  $\leq 20$  Jahre und den drei AGS-Patientenproben ergab, bis auf die 17 $\beta$ -HSD 10, für die gleichen Gene signifikante Unterschiede: 5 $\alpha$ R1 ( $p = 0,02$ ), der 17 $\beta$ HSD Typ 3 ( $p = 0,04$ ), 4 ( $p = 0,04$ ), 5 ( $p = 0,02$ ) und 7 ( $p = 0,02$ ).

Die AGS-Patientenproben wiesen dabei im Vergleich zu den Normalkontrollen immer niedrigere Ratio-Werte der entsprechenden Gene auf.

### LCH-Patienten: erniedrigte Transkription der 5 $\alpha$ R1

Die fünf Blut-RNA-Proben von LCH (Leydigzell-Hypoplasie)-Patienten zeigten, verglichen mit allen männlichen Normalkontrollen, ein signifikant niedrigeres Transkriptionsprofil für das Gen der 5 $\alpha$ R1 ( $p = 0,03$ ).

Den gleichen signifikanten Transkriptionsunterschied für die 5αR1 zeigte die LCH-Patientengruppe nach einer Alterseinteilung. Für die Altersgruppe  $\leq 20$  Jahre wiesen die vier LCH-Patienten, verglichen mit allen untersuchten Normalkontrollen ( $n = 23$ ;  $p = 0,02$ ), sowie mit jeweils nur den weiblichen ( $n = 11$ ;  $p = 0,03$ ) und den männlichen Normalkontrollen ( $n = 12$ ;  $p = 0,03$ ), signifikant niedrigere Transkriptkonzentrationen auf.

#### 17β-HSD3-Defekt-Patienten: erhöhte Transkriptkonzentrationen in den Patientenproben nachweisbar

Von den fünf untersuchten Patienten lagen insgesamt sieben Proben vor, die alle untersucht worden sind. Von zwei 17β-HSD3-Patienten konnten jeweils zwei Blutproben untersucht werden.

Die eine Patientin war bei der ersten Blutabnahme 13 Jahre und 3 Monate alt (Probe 1a) und bei der zweiten 14 Jahre (Probe 1b). Die ermittelten Ratio-Werte dieser Patientin zeigten hohe Übereinstimmungen. Nur in der Transkription des AR und der 17β-HSD 1 wurden Ratio-Werte ermittelt, die sich um das Doppelte unterschieden. Dabei wies die ermittelte Ratio der zuerst entnommenen Probe jeweils höher Werte auf (Tab. 14).

Von der zweiten Patientin wurden die Proben in einem Alter von 18 Jahren (Probe 2a) und von 19 Jahren und 8 Monaten (Probe 2b) entnommen. Auch bei dieser Patientin lagen die ermittelten Ratio-Werte für den AR, der 17β-HSD 1 aber auch für die 17β-HSD 5 um etwa das Doppelte auseinander (Tab. 14), während sich für die übrigen Gene keine großen Unterschiede zeigten.

**Tab. 14:** Mediane der Gene mit abweichenden Ratio-Werte und den dazugehörigen Standardabweichungen für die beiden doppelten Proben von 17β-HSD3-Patienten. Patientin 1 zeigt für die 17β-HSD 5 keine unterschiedlichen Werte. (1a + b = Patienten 1; 2a + b Patientin 2)

17β-HSD3-Patientin	AR	17βHSD1	17βHSD5
Probe 1a	<b>0,3 (±0,02)</b>	<b>21,77 (±1,44)</b>	0,12 (±0,01)
Probe 1b	<b>0,14 (±0,02)</b>	<b>9,85 (±1,22)</b>	0,12 (±0,02)
Probe 2a	<b>0,42 (±0,05)</b>	<b>8,12 (±1,10)</b>	<b>0,16 (±0,01)</b>
Probe 2b	<b>0,28 (±0,01)</b>	<b>5,86 (±0,40)</b>	<b>0,08 (±0,01)</b>

Bei einem Vergleich der Patientengruppe mit allen weiblichen Normalkontrollen zeigte sich für die Patienten eine signifikant höhere Transkription für die 17 $\beta$ -HSD 1 ( $p = 0,027$ ). Nach einer Altersunterteilung wurden für die Patientenproben, verglichen mit den weiblichen Normalkontrollen, für den Altersbereich  $\leq 20$  Jahre ein signifikanter Unterschied in der Transkription des AR ( $p = 0,04$ ), der 17 $\beta$ -HSD Typ 1 ( $p = 0,04$ ), 4 ( $p = 0,04$ ), 7 ( $p = 0,02$ ) und 10 ( $p = 0,04$ ) gefunden.

Die Patientenproben wiesen dabei alle, verglichen mit den weiblichen Normalkontrollen, höhere Transkriptkonzentrationen auf. Es konnte kein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Transkriptionsprofilen des AR und der 17 $\beta$ -HSD 1, bezogen auf die Schwankungen der doppelten Patientenproben, gefunden werden.

#### AIS- und 5 $\alpha$ R2 Reduktase (5 $\alpha$ R2)-Defekt-Patienten:

Die Transkriptionsprofile der Blut-RNA-Proben der zwei CAIS (komplettes Androgen-Insensitivitäts Syndrom)-Patientinnen und der Patientin mit einem 5 $\alpha$ R2-Defekt zeigten, verglichen mit den Normalkontrollgruppen, keine Auffälligkeiten.

#### **4.4.2.2 RNA aus hVHF- und Skrotalhautfibroblasten**

##### **hVHF: Transkriptionsunterschiede bei allen drei unterschiedlichen Diagnosen**

Es lagen von insgesamt acht Patienten hVHF-Proben mit drei unterschiedlichen Diagnosen vor. Dabei handelte es sich um Patienten mit einem 17 $\beta$ -HSD3-Defekt ( $n = 2$ ), einem 5 $\alpha$ R2-Defekt ( $n = 3$ ) und einem AIS ( $n = 3$ ). Die Transkriptionsprofile der drei unterschiedlichen Patientengruppen wurden durch den Mann-Whitney-U-Test mit den 33 untersuchten hVHF-Normalkontrollen verglichen.

#### 17 $\beta$ -HSD3-Defekt-Patienten:

Für die Proben der beiden 46,XY Patientinnen mit einem 17 $\beta$ -HSD3-Defekt konnten, verglichen mit den hVHF-Normalkontrollen, signifikante Unterschiede in der Transkription der 17 $\beta$ -HSD 1 ( $p = 0,03$ ) und der 17 $\beta$ -HSD 7 ( $p = 0,03$ ) ermittelt werden. Eine genaue Überprüfung der Werte zeigte, dass der signifikante

Transkriptionsunterschied für die 17 $\beta$ -HSD 1 durch zwei Normalkontrollen entstand, die sehr hohe Ratio-Werte aufwiesen. Die beiden Patientenproben zeigten relativ niedrige Ratio-Werte (0,78 und 0,81).

Die Transkriptionskonzentration der 17 $\beta$ -HSD 7 war bei den Patientenproben höher als bei den Normalkontrollen. Ein Vergleich der Probengruppen für den Altersbereich  $\leq 12$  Jahre, welche beide Patientenproben und 24 Normalkontrollproben umfassten, zeigte die gleichen signifikanten Unterschiede für beide Isoenzyme.

#### 5alpha Reduktase (5 $\alpha$ R2)-Defekt-Patienten:

Bei den drei Proben mit einem 5 $\alpha$ R2-Defekt handelte es sich um Patienten mit einem 46,XY Karyotyp, wobei die Geschlechtszuweisung bei einem Patienten männlich (2 Jahre), bei einem weiblich (6 Monate) und bei einem Patienten nicht eindeutig geklärt (10 Monate) war.

Ein Vergleich der Transkriptionsprofile ergab für alle drei untersuchten Patientenproben eine signifikant niedrigere Transkription der 17 $\beta$ -HSD 10 ( $p = 0,02$ ). Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls bei einem Vergleich der Ratio-Werte der Proben für den Altersbereich  $\leq 12$  Jahre.

Die männliche Patientenprobe (2 Jahre) fiel durch einen besonders hohen Ratio-Wert für die 17 $\beta$ -HSD 2 auf. Es war mit 87,86 ( $\pm 5,26$ ) der höchste gemessene Ratio-Wert der 17 $\beta$ -HSD 2 in hVHF-Proben. Die höchste Normalkontrolle wies eine Ratio von 53,02 ( $\pm 8,38$ ) auf.

#### AIS-Patienten:

Es wurden drei hVHF-Proben von 46,XY Patienten mit einem Androgen-Insensitivitäts Syndrom (AIS) untersucht. Bei zwei der Patienten lag die Diagnose cAIS und eine weibliche Geschlechtszuweisung vor. Bei dem dritten Patienten wurde ein partielles (P)AIS diagnostiziert mit einer männlichen Geschlechtszuweisung. Ein Vergleich der Transkriptionsprofile der Patienten- und Normalkontrollgruppe ergab eine signifikant niedrigere Transkription der Isoenzyme 17 $\beta$ -HSD Typ 2 ( $p = 0,03$ ) und 10 ( $p = 0,03$ ) für die drei AIS-Patienten. Auch hier zeigten sich die gleichen signifikanten Unterschiede nach einer Altersunterteilung, bei der nur die Probengruppen mit einem Alter von  $\leq 12$  Jahre miteinander verglichen worden sind. Dabei wurde jedoch ebenfalls die AIS-

Patientenprobe mit einem Alter von 14 Jahre und 10 Monaten mit in die Abfrage einbezogen.

### **Skrotalhautfibroblasten:**

#### AIS-Patienten:

Es konnten vier Proben aus Skrotalhautfibroblasten von Patienten mit der Diagnose AIS untersucht und die ermittelten Ratio-Werte mit den Ergebnissen der elf Normalkontrollen verglichen werden. Dabei handelte es sich um drei Patienten mit einer männlichen und einem Patienten mit einer weiblichen Geschlechtszuweisung bei einem 46,XY Karyotyp. Ein Vergleich der Transkriptionsprofile der Patienten- und der Normalkontrollgruppe durch den Mann-Whitney-U-Test ergab für die Transkripte des AR-Gens ( $p = 0,02$ ) und der 17 $\beta$ -HSD Typ 1 ( $p = 0,02$ ) signifikante Unterschiede. Eine genauere Betrachtung der Werte zeigte jedoch, dass sich der signifikante Transkriptionsunterschied für die 17 $\beta$ -HSD Typ 1 durch eine Normalkontrolle erklären ließ, auf die bereits aufgrund ihres besonders hohen gemessenen Ratio-Wertes in Abschnitt 4.3.4 (S.67) eingegangen worden ist.

Für das Transkript des AR zeigte sich dieser signifikante Unterschied ( $p = 0,01$ ) ebenfalls nach einer Alterseinteilung, in der nur die Proben in dem Altersbereich  $\leq 12$  Jahre miteinander verglichen worden sind (AIS-Patienten:  $n = 4$ ; Normalkontrollen:  $n = 5$ ). Dabei wiesen die Proben der AIS-Patienten interessanterweise immer die höheren Transkriptkonzentrationen des AR auf. Einen Unterschied in der Transkription zwischen den drei männlichen AIS-Patientenproben und der Probe der weiblichen 46,XY Patientin konnte nicht gezeigt werden. Die älteste männliche AIS-Patientenprobe von 7 Jahren und 8 Monaten zeigte jedoch auffällig hohe Ratio-Werte für das Transkript der SRD5A2 (Gen der 5 $\alpha$ R2) und der 17 $\beta$ -HSD 5. Dabei war der ermittelte Ratio-Wert für die 5 $\alpha$ R2 (435,52 ( $\pm 42,49$ )) fast doppelt so hoch wie der höchste gemessene Ratio-Wert aller untersuchten Normalkontrollen (227,5 ( $\pm 27,68$ ); 9 Jahre). Bei der 17 $\beta$ -HSD 5 lag mit 13,10 ( $\pm 0,82$ ) der zweithöchste gemessene Ratio-Wert vor. Der höchste gemessene Wert für die 17 $\beta$ -HSD 5 in den Skrotalhautfibroblastenproben lag bei 20,67 ( $\pm 0,27$ ) und wurde bei einer Normalkontrolle gemessen, die zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme 34 Jahre alt war.

## 5 Diskussion

Um die Wirkungsmechanismen von verschiedenen Genen und deren Proteinen verstehen zu können, benötigt man genaue Erkenntnisse auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene. Der Großteil der Sequenzen des menschlichen Genoms ist inzwischen bereits publiziert und jederzeit online zugänglich. Dadurch ist die DNA-Sequenz der meisten Gene mit ihren Exon- und Intronengrenzen bekannt und kann mit den entsprechenden spezifischen Primern amplifiziert und sequenziert werden. Bevor jedoch ein Protein exprimiert werden kann, muss das Gen in Form der mRNA transkribiert werden. Viele Studien beschäftigen sich bereits mit der Untersuchung der Transkription von Genen der Sexualsteroidbiosynthese. Man geht davon aus, dass die Transkriptionslevel auf eine mögliche Proteinexpression hinweisen. Aus verschiedenen Gründen wurde in dieser Arbeit die Proteinebene nicht untersucht. Zum einen benötigt man einen Antikörper für die zu untersuchenden Proteine, die für den Großteil der in dieser Arbeit untersuchten Proteine jedoch noch nicht vorhanden oder erhältlich waren (Aerts *et al.*, 2004). Zum anderen ist es notwendig, dass eine ausreichende Menge des Proteins und somit entsprechend viel Untersuchungsmaterial verfügbar ist (Koh *et al.*, 2002). Dies war in der vorliegenden Arbeit ein limitierender Faktor, da nicht unbegrenzt Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand.

### Transkriptionsuntersuchung durch Real-Time-RT-PCR:

Um das Transkriptionslevel der ausgewählten Proteine untersuchen zu können, musste zuerst die RNA aus dem Blut und den Fibroblastenzellkulturen extrahiert werden und danach die vorhandene mRNA in cDNA umgeschrieben (revers transkribiert) werden. Eine sehr sorgfältige und standardisierte Durchführung dieser beiden unterschiedlichen Methoden ist eine Grundvoraussetzung, um die gemessenen Ergebnisse der relativen Quantifizierung mittels RT-PCR später auch vergleichen zu können (Ståhlberg *et al.*, 2004). Veränderungen in den Reaktionsbedingungen können die Konzentration der entsprechenden mRNA entscheidend beeinflussen. Um dies zu vermeiden, wurden für die RNA-Extraktion aus peripheren Blutzellen und aus Fibroblastenzellkulturen jeweils exakte, standardisierte Versuchsprotokolle angewandt. Bei den Zellkulturen wurden definierte Ausgangsbedingungen festgesetzt, die eingehalten werden mussten

(Abschnitt 3.2.1). Vor der RNA-Extraktion mussten die Zellen eine 100%ige Konfluenz in den Zellkulturflaschen aufweisen und sich somit zum Großteil in der mitotischen G<sub>0</sub>-Phase (keine Zellteilung) befinden. Des Weiteren wurde bei den Zellen 4 Tage vor der Extraktion der letzte Mediumwechsel durchgeführt, so dass die Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion ihren Stoffwechsel soweit wie möglich herunter gefahren hatten. Dies diente ebenfalls dazu, die Versuchsbedingungen zu standardisieren, da die Zellen in diesem Zustand nur die absolut notwendigsten Proteine exprimieren. Nur RNA-Proben, die unter den beschriebenen Bedingungen isoliert worden sind, wurden in dieser Arbeit miteinander verglichen.

Die Bedingungen der Blutentnahme konnte nur zum Teil beeinflusst werden. Ein genauer Tageszeitpunkt der Abnahme konnte nicht festgelegt werden, da viele Proben von externen Ärzten eingesandt worden sind. Es ist bekannt, dass die Transkription und Wirkungsweise vieler Gene einem bestimmten zirkadianen Rhythmus unterliegen (Axelsson *et al.*, 2005), somit könnte dieser Faktor einen Einfluss auf die ermittelten Transkriptionsprofile gehabt haben. Der Nachweis der großen interindividuellen Schwankungen könnte dadurch eventuell erklärt werden. Jedoch zeigten auch die Normalkontrollen, von denen der Abnahmezeitpunkt bekannt war, entsprechende Schwankungen. Die ermittelte eindeutige gewebespezifische Transkription spricht ebenfalls dafür, dass diese unterschiedlichen Abnahmebedingungen nicht der Grund für die schwankende mRNA-Expression der untersuchten Proteine war, sondern eine gewisse Schwankungsbreite normal zu sein scheint. Andere Untersuchungen zeigten bereits, dass gerade die Testosteronsynthese stärker vom Schlaf reguliert wird als von anderen zirkadianen Faktoren (Axelsson *et al.*, 2005).

Bei der cDNA-Erstrangsynthese wurde ebenfalls ein standardisiertes Versuchsprotokoll durchgeführt, wobei die eingesetzte RNA-Konzentration 1 µg betrug (Abschnitt 3.2.5). Diese Ausgangskonzentration konnte nicht für alle untersuchten Proben eingesetzt werden. Dabei handelte es sich um 17 Blut-RNA Proben von Normalkontrollen und von Patienten, von denen dann weniger RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt werden mussten. Da eine relative Quantifizierung durchgeführt worden ist und somit alle gemessenen Transkriptionsergebnisse der Gene mit dem Haushaltsgen abgeglichen worden sind, sollte dies keinen großen Einfluss gehabt haben. Es ist jedoch bekannt, dass

die Ausbeute der RT-PCR stark von der RNA Ausgangskonzentration beeinflusst wird (Stählberg *et al.*, 2004) und somit nicht immer die optimalsten Bedingungen für eine 100% cDNA-Ausbeute vorlagen. Bei den meisten untersuchten RNA-Proben, besonders bei denen der Patienten, war es jedoch nicht möglich wiederholt Blut zu erhalten, um die Ergebnisse zu reproduzieren. Auch hier könnten die zum Teil differierenden RNA-Konzentrationen einen Einfluss auf die ermittelten interindividuellen Transkriptionsunterschiede gehabt haben, jedoch zeigten sich diese auch für die RNA-Proben aus Fibroblastenzellkulturen, bei denen eine RNA-Konzentration von 1 µg für die Erstrangsynthese eingesetzt werden konnte.

Für die vorliegende Untersuchung wurde eine relative Quantifizierung mittels einer Real-Time RT-PCR an einem LightCycler Instrument durchgeführt. Die Real-Time RT-PCR hat im Vergleich mit anderen mRNA Untersuchungsmethoden, wie z. B. der Northern-Blot-Analysen oder der kompetitiven RT-PCR, einige Vorteile. Sie ist sehr schnell, sensitiv, einfach in der Vorbereitung und Anwendung und erzeugt sehr gut reproduzierbare Ergebnisse trotz einer zum Teil sehr niedrigen mRNA-Ausgangskonzentrationen von nur einer notwendigen Kopie des zu untersuchenden Zielgens (Aerts *et al.*, 2004; Ball *et al.*, 2003; Wall und Edwards, 2002; LightCycler Operator`s Manual Version 3.5). Zudem erfolgt bei der Real-Time PCR die Messung während der exponentiellen Phase, wodurch eine genaue Bestimmung der Ausgangskonzentration möglich ist (Schmittgen *et al.*, 2000). Mit Hilfe von vorher erstellten Standardkurven der zu untersuchenden Gene und des Haushaltsgens wird die Effizienz des einzelnen Laufes mit einberechnet, die im Idealfall bei 100% liegt. Eine optimale Effizienz bedeutet, dass sich alle 3,33 Zyklen das Ausgangsprodukt um das 10-fache erhöht und die PCR-Bedingungen somit ideal wären. Die für diese Untersuchungen erstellten Standardkurven wiesen Effizienzen zwischen 80-99,5% auf, was sehr guten bis optimalen PCR-Bedingungen entspricht.

Das verwendete Fluoreszenzformat SYBR Green I zeichnet sich durch seine hohe Exaktheit aus, in jede vorhandene doppelsträngige DNA zu interkalieren und somit eine sehr genaue Schmelzkurvenanalyse zu produzieren (Schmittgen *et al.*, 2000). Es kann jedoch auch zu unspezifischen Fluoreszenzmessungen kommen, welche man anhand der Schmelzkurvenanalyse erkennen kann. Handelt es sich dabei um unspezifische Produkte, so müssen die PCR-Konditionen optimiert

werden oder neue spezifische Primer verwendet werden. Beim Auftreten von Primerdimeren sollte die Primerkonzentration, soweit wie möglich, verringert werden. Um eine falsch positive Fluoreszenz aufgrund von Primerdimerbildung endgültig auszuschließen, ist es mit der Real-Time PCR am LightCycler (Roche, Mannheim) möglich einen zusätzlichen Primerdimer Schmelz-Schritt im Amplifikationszyklus einzubauen. Dafür muss die Temperatur am Ende eines jeden Amplifikationszyklus kurz erhöht werden, so dass sie über der Temperatur des Schmelzpunktes der Primerdimere liegt. Dadurch wird die Fluoreszenz nicht am Ende der Elongation gemessen, sondern erst nachdem die Primerdimere geschmolzen und somit einzelsträngig vorliegen. Diese Modifizierung der PCR-Protokolle eliminiert die unspezifische Fluoreszenz der Primerdimere, ohne neue Primer ermitteln oder das PCR-Protokoll weiter optimieren zu müssen (Ball *et al.*, 2003).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der relativen Quantifizierung mittels Real-Time PCR ist die Wahl des Haushaltgens. Die aus unterschiedlichen Geweben gemessene mRNA-Expression der zu untersuchenden Gene wird mit der des internen Kontrollgens abgeglichen, um eine Normalisierung der Versuchsbedingungen zu erlangen. Deshalb muss das verwendete Haushaltgen eine konstante mRNA-Expression in den unterschiedlichen Geweben aufweisen. Da es jedoch kein universell einsetzbares Haushaltgen gibt, dass in allen gesunden und pathologisch veränderten Geweben gleichmäßig exprimiert wird, sollte möglichst für jede Untersuchung ein stabil transkribiertes Gen gesucht werden (Kim und Kim, 2003, Thellin *et al.*, 1999). Eine weitere Möglichkeit zur Normalisierung der Daten ist es, die mRNA-Expression von mehreren Haushaltsgenen zu messen, um dann mit dem Mittelwert aller verwendeten Haushaltsgene den Normalisierungsabgleich für die Zielgene durchzuführen. Bei dieser Methode ist es jedoch notwendig, darauf zu achten, dass die verwendeten Haushaltsgene unterschiedliche biochemische Funktionen aufweisen (de Kok *et al.*, 2005). In der Untersuchung von de Kok (2005) wurden 13 unterschiedliche Haushaltsgene untersucht. Es zeigte sich dabei, dass die ermittelte Expression der HPRT am ehesten den Mittelwert aller untersuchten Gene reflektierte und als Haushaltsgen empfohlen wurde. In der Untersuchung handelte es sich jedoch um einen Vergleich zwischen gesundem und Tumorgewebe.

In vielen Untersuchungen werden mehrere Haushaltsgene auf eine mögliche

Regulation in den zu untersuchenden Geweben hin getestet und letztendlich meist nur das am geeignetsten erscheinende Gen für die relative Quantifizierung eingesetzt (Blouin *et al.*, 2003; Wiebe und Lewis, 2003). Bei der Auswahl eines Haushaltsgens sollte man darauf achten, ein Gen zu verwenden, dass etwa gleich stark transkribiert wird wie die zu untersuchenden Zielgene. Von den sehr häufig verwendeten Haushaltsgenen wie GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase), 18S rRNA oder  $\beta$ -Aktin, weiß man, dass es sich um relativ hoch exprimierte Gene handelt (de Kok *et al.*, 2005), die ebenfalls unterschiedliche Variationen in ihren Expressionen aufweisen können (Chang *et al.*, 1998; Janssens *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 1992).

Für diese Arbeit wurden zwei Haushaltsgene getestet, die Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und die Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase (HPRT). Beide Gene sind bereits in unterschiedlichen Studien als Haushaltsgene verwendet worden und es ist bekannt, dass sie eher niedrig exprimiert werden (Bemeur *et al.*, 2004; Gil und Coetzer, 2004; Janssens *et al.*, 2004; Meller *et al.*, 2005). Dies war ein wichtiger Faktor bei der Wahl des Haushaltsgens, da der Großteil der Zielgene sehr niedrige Transkriptionskonzentrationen in den untersuchten Geweben aufwiesen.

Beide Gene zeigten eine relativ konstante Expression in den 30 untersuchten hVHF- und den 10 Skrotalhautfibroblastenproben. Dabei wurde das Gen der PBGD in den Fibroblasten schwächer transkribiert als das der HPRT. Ein Vergleich der Transkription beider Gene in den 25 Blut-RNA-Proben zeigte jedoch unterschiedliche CP-Werte, wobei die HPRT meist eine geringere mRNA-Expression aufwies im Vergleich zur PBGD. Da die Schwankungsbreite der gemessenen CP-Werte bei der HPRT höher waren als die der PBGD und damit auch die Variation ihrer Transkriptkonzentrationen, wurde die PBGD als Haushaltsgen für diese Untersuchungen verwendet.

#### Die untersuchten RNA-Lokalisationen:

Für die Auswahl der untersuchten RNA-Lokalisationen (Blut und Genitalhautfibroblasten) sprachen verschiedene Faktoren. Bisher ist über einen möglichen regulatorischen Einfluss von Sexualsteroiden auf Wirkungsmechanismen im Blut sehr wenig bekannt. Es existieren wenige Veröffentlichungen, in denen der Einfluss von Sexualsteroiden auf das

Immunsystem und damit der zirkulierenden Zellen im Blut hinsichtlich einer altersabhängigen Transkription untersucht worden ist (Hammer *et al.*, 2005; Li *et al.*, 1993; Samy *et al.*, 2000). Zusätzlich ist es mit Blut möglich die Enzyme auch auf eine geschlechtsspezifische Transkription hin zu untersuchen.

Der weitere Vorteil von Blut als Untersuchungsmaterial ist die relativ einfache Materialgewinnung, die keinen operativen Eingriff voraussetzt. Es konnten relativ einfach viele Normalkontrollen von gesunden Männern und Frauen generiert und untersucht werden. Ebenfalls die sehr seltenen und besonderen Patientenproben waren so einfacher zu erhalten. Jedoch ist die Blutentnahme bei Kleinkindern schwierig, so dass es nicht möglich war, von Kindern in einem Alter zwischen 0 und 10 Jahren eine große Anzahl von Proben zu untersuchen.

Im Vergleich dazu lassen sich Fibroblastenzellkulturen sehr leicht kultivieren und können bei sorgfältiger Behandlung immer wieder aufgetaut und angezüchtet werden. Jedoch ist zur Materialgewinnung eine Operation notwendig. Dadurch war es teilweise sehr schwierig, entsprechend geeignetes Probenmaterial zu erhalten und vor allem die Patientenprobengewinnung musste sehr genau geplant und mit den behandelnden Ärzten koordiniert werden. Zudem kann es bei häufiger Passagierung zu Veränderungen der Zellen und somit der Enzymaktivität kommen. Solche Veränderungen können durch Mutationen oder durch veränderte Zellkultivierungsbedingungen verursacht werden, so dass bei häufig verwendeten Zelllinien in hohen Passagen das Expressionsmuster verändert sein kann (Griffin *et al.*, 1981; Lamberigts *et al.*, 1979; Mowszowicz *et al.*, 1980; Theintz *et al.*, 1989). Beim Vergleich von Zellkulturproben sollten deshalb möglichst mit gleichen Zellkulturpassagen und unter standardisierten Kultivierungsbedingungen gearbeitet werden.

Bei Genitalhautfibroblasten handelt es sich um mesenchymale Zellen, die sich während der männlichen Embryonalentwicklung unter dem Einfluss von DHT im Penis und Skrotum ausdifferenziert haben. Ihre bekanntermaßen regulatorische Funktion in der sowohl postnatalen als auch pubertären Ausbildung der äußeren männlichen Geschlechtsmerkmale macht sie zu einem häufig verwendeten Zellmodell für Aktivitäts- und Transkriptionsuntersuchungen von geschlechtsspezifischen Genen (Avila *et al.*, 2002; Boehmer *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 1981; Habib *et al.*, 1998; Hellwinkel *et al.*, 2000; Holterhus *et al.*, 2003; Issa *et al.*, 2002;

Pelletier *et al.*, 1998; Theintz *et al.*, 1989). Die Verwendung von Genitalhautfibroblasten macht es somit möglich bereits vorhandene Ergebnisse aus anderen Studien mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen zu vergleichen (Hellwinkel *et al.*, 2000; Thiele *et al.*, 2005).

#### Blut-RNA-Normalkontrollen:

In den Blutproben konnten von den zehn untersuchten Genen bis auf die 17 $\beta$ -HSD 2 alle Transkripte nachgewiesen werden. Dieses Isoenzyme katalysiert die Deaktivierung der Sexualsteroiden T und Östradiol (E<sub>2</sub>) sowie des adrenalen Androgens DHEA (Abb. 3). Da das Transkript der 17 $\beta$ -HSD 2 auch in unverdünnten Blut-cDNA-Proben nicht detektiert werden konnte, scheint es im Blut für die Metabolisierung von Sexualsteroiden nicht notwendig zu sein. Die Funktion dieses Isoenzymen könnte von einem anderen Isoenzymen übernommen werden, wie der 17 $\beta$ -HSD Typ 4 oder 10, die ein sehr gleichbleibendes Transkriptionsprofil in der untersuchten Blut-RNA aufwiesen und die gleichen Reaktionen wie die 17 $\beta$ -HSD 2 katalysieren (Abb. 3 und Tab. 1).

Von der 17 $\beta$ -HSD 4 ist bekannt, dass sie annähernd ubiquitär vorkommt. Sie ist das erste steroidmetabolisierende Enzym, das in den Peroxisomen lokalisiert ist (Leenders *et al.*, 1998). Mutationen in dem menschlichen Gen der 17 $\beta$ -HSD 4 können peroxisomale Störungen zur Folge haben (Leenders *et al.*, 1998). Sie wird auch als multifunktionelles Protein 2 (MFP2) bezeichnet (Jiang *et al.*, 1997), da sie ebenfalls eine wichtige Funktion im Fettsäuremetabolismus übernimmt (Breitling *et al.*, 2001).

Die 17 $\beta$ -HSD 10 wurde schon in der Leber, dem Gehirn, den Gonaden und der Skelettmuskulatur nachgewiesen (He *et al.*, 2001). Sie ist in den Mitochondrien lokalisiert und wird auch als Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (SCHAD) bezeichnet. Sie besitzt unterschiedliche enzymatische Funktionen, so zeigt sie ebenfalls hohe 3 $\alpha$ -HSD Aktivität (He *et al.*, 2000; He *et al.*, 2001; Nordling *et al.*, 2001) und spielt wie die 17 $\beta$ -HSD 4 eine Rolle im Fettsäuremetabolismus (He *et al.*, 2001). Da die 17 $\beta$ -HSD 2 nicht im Gehirn exprimiert wird und die 17 $\beta$ -HSD 4 im menschlichen Gehirn nur in den Purkinje Zellen vorkommt, spielt die 17 $\beta$ -HSD 10 wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Deaktivierung aktiver Steroide im Gehirn. Es ist ebenfalls bekannt, dass das Protein der 17 $\beta$ -HSD 10 vermehrt im Gehirn von Alzheimer Patienten exprimiert wird und ihr somit ein Einfluss bei

dieser Erkrankung zugeschrieben wird (He *et al.*, 2001). Über die Transkription dieser 17 $\beta$ -HSDs in Blut-RNA und ihrer möglichen Wirkungsweise ist bisher jedoch nichts beschrieben.

Eine geschlechtsabhängige Transkription konnte für die untersuchten Gene in der Blut-RNA nicht nachgewiesen werden. Dass sich die Blut mRNA-Expression in einigen Genen geschlechtsspezifisch unterscheidet, konnte von Whitney *et al.* (2003) an Mikroarray Versuchen nachgewiesen werden. Da bisher jedoch nur sehr wenig über die Androgen-Metabolisierung und -Funktionsweise in Blutzellen bekannt ist, sprechen die gefundenen Ergebnisse am ehesten dafür, dass die Androgenbiosynthese im Blut keinen Einfluss auf die Geschlechtsdifferenzierung hat. Ein möglicher regulatorischer Einfluss von Androgenen auf immunologische Vorgänge (Regulation der Transkription von IL-1 oder IL-6) (Li *et al.*, 1993, Samy *et al.*, 2000) sowie auf Zellwachstum und Apoptose (Cutolo *et al.*, 2005) wurde schon beschrieben und auch weitere geschlechtsunabhängige Wirkungsweisen sind denkbar. Es ist bekannt, dass die Konzentration der adrenalen Steroide DHEA und Androstendion, sowie der Sexualsteroiden im Serum bei Männern mittleren Alters stark vom Nikotinabusus, dem Alter und vom Körpergewicht (*body mass index* = BMI) abhängig ist (Field *et al.*, 1994). Eine proteinarme Diät führt bei älteren Männern zu einer SHBG Zunahme und einer Abnahme des bioaktiven Testosterons im Serum (Longcope *et al.*, 2000). Da das Körpergewicht einen Einfluss auf die Androgenmetabolisierung im Blut zu haben scheint, sollte es zukünftig als möglicher Parameter bei den Untersuchungen berücksichtigt werden.

Eine altersabhängige höhere Transkription zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung nur für die 5 $\alpha$ R1 in den Blutproben von Frauen und Männern  $\leq 20$  Jahren und in den Proben von Frauen  $\leq 12$  Jahre (Abschnitt 3.3.1.1). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurde der 5 $\alpha$ R1 bisher erst nach der Pubertät ein möglicher Einfluss auf die Metabolisierung von DHT zugeschrieben (Forti *et al.*, 1996; Thiele *et al.*, 2005; Thigpen *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1993). Diese neuen Ergebnisse deuten jedoch dafür hin, dass die 5 $\alpha$ R1 bereits in jungen Jahren für die DHT-Metabolisierung im Blut verantwortlich sein könnte und nicht die 5 $\alpha$ R2. Da die 5 $\alpha$ R1 bei Frauen auch katabole Wirkungsmechanismen aufweisen kann (Mahendroo und Russell, 1999), könnte der Transkriptnachweis dieses Isoenzymen auch auf andere steroidmetabolisierende Aufgaben im Blut hinweisen.

Ein Transkriptionsanstieg der 17 $\beta$ -HSD 5 im Blut von älteren Männern, wie von Hammer *et al.* (2005) ermittelt, konnte in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden. Bei Hammer *et al.* (2005) wird die Hochregulation der 17 $\beta$ -HSD 5 im Alter mit einer ansteigenden Umwandlung von DHEA in das immunmodulatorisch wirksame Androstendiol und von A in T erklärt. Jedoch wurde in der Studie nur eine sehr geringe Probenzahl untersucht und es wurde darauf verwiesen, dass zur genauen Klärung der Hochregulation weitere Untersuchungen notwendig sind, um eine mögliche endokrinologische Verbindung zu dieser immunologischen Bedeutung zu finden (Hammer *et al.*, 2005).

#### Genitalhautfibroblasten-RNA-Normalkontrollen:

Die Fibroblastenproben der zwei unterschiedlichen Lokalisationen aus dem Genitalhautbereich wurden getrennt voneinander betrachtet. Es konnten jedoch in beiden Lokalisationen die Transkripte aller untersuchten Proteine nachgewiesen werden.

#### hVHF:

Für die hVHF-Proben konnte eine altersabhängige Transkription der 5 $\alpha$ R2 gezeigt werden. Die Proben, die bei der Biopsieentnahme  $\leq 13$  Jahre waren wiesen eine eindeutig höhere Transkription dieses Isoenzym auf, verglichen mit den Proben über 13 Jahre. Da jedoch keine Proben für den Altersbereich zwischen  $> 12$  und  $< 35$  Jahren vorlagen, ist es nicht möglich, zu sagen, ab welchem Alter der Abfall in der Transkription stattfindet. Diese altersabhängige Transkription der 5 $\alpha$ R2 wurde bereits von Theintz *et al.* (1989) beschrieben, wobei in dieser Studie die älteste untersuchte Probe von einem acht jährigen Jungen stammte. Diese Beobachtung konnte in der Untersuchung von Hellwinkel *et al.* (2000) bestätigt werden. Es konnte aber auch in dieser Untersuchung nicht exakt beschrieben werden, ab welchem Alter es zu dem Transkriptionsabfall kam, obwohl Material von älteren Probanden untersucht worden ist. Interessanterweise fielen in der vorliegenden Arbeit die beiden Proben mit einem Alter von 12 Jahre bei Biopsieentnahme dadurch auf, dass sie die niedrigsten Transkripte des Altersbereichs  $\leq 13$  Jahre aufwiesen. Wenn die beiden 12-jährigen Kinder sich zum Zeitpunkt der Entnahme bereits in der Pubertät befanden, könnte man daraus schlussfolgern, dass der Transkriptionsabfall der 5 $\alpha$ R2 mit der Pubertät beginnt und deshalb nur die

präpubertären Proben eine hohe mRNA-Expression des Enzyms aufweisen. Somit könnte man die Hypothese aufstellen, dass es präpubertär zu einer erhöhten Synthese von DHT in Vorhautgewebe kommt und dass die 5 $\alpha$ R2 vor allem präpubertär für die Bereitstellung von DHT in der Vorhaut verantwortlich ist. Diese Funktion könnte ab der Pubertät oder aber spätestens postpubertär von einem anderen Enzym übernommen werden, wobei spekuliert wird, dass diese Aufgabe von der 5 $\alpha$ R1 aufgefangen wird (Thiele *et al.*, 2005; Thigpen *et al.*, 1993).

#### Skrotalhautfibroblasten:

Für die Skrotalhautfibroblastenproben konnte ebenfalls eine altersabhängige Transkription nachgewiesen werden. Die 17 $\beta$ -HSD 5 zeigte eine mit dem Alter ansteigende Transkription in den Skrotalhautfibroblasten, was auf eine gesteigerte Testosteronbiosynthese hinweisen könnte. Diese Beobachtung wurde in der Literatur für Skrotalhautfibroblasten bislang noch nicht beschrieben. Aufgrund der sehr niedrigen Probenanzahl ( $n = 11$ ) und dadurch, dass für den Altersbereich zwischen  $> 13$  Jahre und  $< 30$  Jahren kein Probenmaterial vorlag, lässt sich nicht genau feststellen, ab welchem Alter die 17 $\beta$ -HSD 5 in Skrotalhautgewebe hochreguliert wird. Bei Untersuchungen an anderen Geweben wurde eine Hochregulation des 17 $\beta$ -HSD 5 Transkripts bereits mit einer Testosteronbiosynthese in den entsprechenden Geweben in Verbindung gesetzt (Dufort *et al.*, 1999; El-Alfy *et al.*, 1999; Hammer *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2004; Quinkler *et al.*, 2003; Quinkler *et al.*, 2004).

Eine genaue Betrachtung der Ergebnisse der 17 $\beta$ -HSD 3 deutet ebenfalls daraufhin, dass das Transkript dieses Isoenzym in skrotalem Gewebe mit zunehmenden Alter abnimmt (Abb. 13). Diese Beobachtung ließ sich jedoch statistisch nicht belegen und ist rein deskriptiv. Man könnte diese Ergebnisse so deuten, dass die 17 $\beta$ -HSD 3 präpubertär ( $\leq 13$  Jahre) für die Synthese von T verantwortlich ist und diese Aufgabe im erwachsenen Alter von der 17 $\beta$ -HSD 5 übernommen wird. Um diese Aussage belegen zu können, wird es zukünftig jedoch notwendig sein, eine größere Probenanzahl für alle Altersbereiche zu untersuchen. Zusätzlich müssten weitere Untersuchungen angeschlossen werden, wie zum Beispiel ein Metabolitennachweis im Zellkulturüberstand.

Vergleich der Transkriptionsprofile zwischen den Blut- hVHF- und Skrotalhaut-fibroblastenproben von Normalkontrollen:

Die erstellten Transkriptionsmuster der untersuchten Gene wiesen eindeutige lokalisationspezifische Unterschiede zwischen den Blut- und den Genitalhautfibroblastenproben in ihrer jeweiligen mRNA-Expression auf (Abb. 14 und 15) (Hoppe *et al.*, 2006). Im Vergleich zu den Blutproben zeigte sich für die Genitalhautfibroblastenproben eine erhöhte Transkription der Gene der 17 $\beta$ -HSDs Typ 4, 5 und 10, der 5 $\alpha$ R1 und 2 und des AR. Auffällig hoch sind dabei die ermittelten Unterschiede für die 17 $\beta$ -HSD 5, der 5 $\alpha$ R2 und dem AR (Abb. 17). Die deutlich höhere Transkriptkonzentration dieser Gene in den Genitalhautfibroblastenproben könnte auf eine T- und DHT-Metabolisierung in der Genitalhautregion hinweisen. Obwohl in anderen Untersuchungen der Transkriptionsnachweis für die 17 $\beta$ -HSD 5, der 5 $\alpha$ R2 und des AR bereits mit einer möglichen extragonadalen, gewebespezifischen Androgenmetabolisierung in unterschiedlichsten Geweben in Zusammenhang gebracht worden ist (Ando *et al.*, 1999; Blouin *et al.*, 2003; Dufort *et al.*, 1999; El-Alfy *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004; Luu-The *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2005; Pelletier und Ren, 2004; Quinkler *et al.*, 2003; Quinkler *et al.*, 2004), wurde eine Transkription dieser drei Gene in Genitalhautfibroblasten bisher nicht zusammen untersucht.

In den Blut-RNA-Proben zeigte sich, verglichen mit den Genitalhautfibroblastenproben, eine erhöhte Transkriptkonzentration der 17 $\beta$ -HSDs Typ 1 und 3. Dieses Ergebnis ist sehr interessant, da diese Isoenzyme der 17 $\beta$ -HSD hauptverantwortlich für die Bereitstellung der Geschlechtshormone T und Östradiol (E<sub>2</sub>) sind. Die 17 $\beta$ -HSD 3 ist für die gonadale Testosteronbiosynthese verantwortlich und wird vorwiegend in den Leydig-Zellen des Hodens exprimiert. Ihr Transkript konnte bisher erst in wenigen anderen Geweben nachgewiesen werden, wie im Gehirn (Green *et al.*, 1999; Steckelbroeck *et al.*, 1999; Stoffel-Wagner *et al.*, 1999), im Fettgewebe (Corbould *et al.*, 2002; Meseguer *et al.*, 2002) und im Gewebe von Prostata-Karzinomen (Koh *et al.*, 2002; Margiotti *et al.*, 2002). Über einen Nachweis in Blut-RNA wurde jedoch noch nichts beschrieben. Die 17 $\beta$ -HSD Typ 1 ist ein zytosolisches Protein, welches in homodimerer Form vorliegt und hauptsächlich die Konversion von Östron (E<sub>1</sub>) zu E<sub>2</sub> in den Ovarien katalysiert (Labrie *et al.*, 2000(b)). Ihr Vorkommen wurde bereits in

unterschiedlichen gesunden und pathologisch veränderten Geweben nachgewiesen, wie in der Plazenta (Takeyama *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2002), im Brustgewebe (Gunnarsson *et al.*, 2003; Speirs *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2003), im Uterus (Sasano *et al.*, 2000), dem Ovar (Qin und Rosenfield, 2000) und vielen anderen Geweben. Auch in diesen unterschiedlichen Studien wird der Nachweis der 17 $\beta$ -HSD Typ 1 als ein möglicher Hinweis auf eine gewebespezifische Östrogenmetabolisierung angesehen. In Zellkulturen kann die 17 $\beta$ -HSD 1 jedoch ebenfalls die Reduktion von Androstendion zu T oder von DHEA zu Androstendiol katalysieren. Präferiert wird dabei jedoch die Reduktion von Östron zu Östradiol (Puranen *et al.*, 1997; Vihko *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1996). Über eine mögliche Transkription der 17 $\beta$ -HSD 1 in Blutzellen ist bisher nichts bekannt. Die mRNA-Expression dieser beiden Isoenzyme der 17 $\beta$ -HSD in peripheren Blutzellen könnte somit auf eine mögliche Sexualsteroidmetabolisierung in Blut hinweisen.

Die spezifische mRNA-Expression wird besonders deutlich, wenn man die Transkriptionsprofile der Gene aus den beiden Genitalhautfibroblastenlokalisationen miteinander vergleicht. Die Vorhaut und Skrotalhaut sind anatomisch direkt benachbarte Gewebe. Fibroblastenzellkulturen dieser Gewebe weisen dennoch sehr unterschiedliche Transkriptionsprofile der Gene auf. Bei fünf der untersuchten Gene zeigten sich signifikante Unterschiede in der Transkription. Dabei handelt es sich um die 17 $\beta$ -HSDs Typ 1, 2, 4 und 5 und dem AR. Bis auf die 17 $\beta$ -HSD 1 wiesen diese Gene eine deutlich höhere Transkriptkonzentration in den hVHF-RNA-Proben auf (Abb. 15).

Trotz dieser eindeutig spezifischen Transkription in den Blut-, hVHF- und den Skrotalhautfibroblastenproben konnte zusätzlich eine zum Teil sehr hohe interindividuelle Schwankung in der Transkriptkonzentration nachgewiesen werden (Tab. 13). Diese Ergebnisse deuten auf eine sehr unterschiedliche Metabolisierung und biologische Aktivität von Steroiden in den unterschiedlichen Lokalisationen hin mit starken interindividuellen Schwankungen. Eine solche Variabilität in der Androgen-Bereitstellung könnte einen Einfluss auf die phänotypisch stark variierende Ausprägung jedes Einzelnen haben (Hoppe *et al.*, 2006). Von Chang *et al.* (2002) wurde bereits gezeigt, dass Fibroblasten von unterschiedlichsten Lokalisationen eindeutig gewebespezifische Transkriptionsmuster aufweisen. Selbst unter stark veränderten Bedingungen, wie unterschiedliche Passagenanzahl und veränderte Zellkultivierung, zeigten die

Fibroblasten die größten Transkriptionsunterschiede aufgrund der unterschiedlichen topographischen Lokalisationen. In der Untersuchung von Holterhus *et al.* (2003) konnten zudem charakteristische Transkriptionsunterschiede zwischen den Genitalhautfibroblasten von normalen gesunden Männern und von 46,XY Frauen mit einem AIS nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass nicht nur die anatomische Lage der Fibroblasten von Bedeutung ist, sondern dass diese Zellen über ein autonomes, festgelegtes Genexpressionsmuster verfügen, das von der Expression des Androgenrezeptors beeinflusst wird (Holterhus *et al.*, 2003).

#### Vergleich der Hypospadiepatientenproben mit den Normalkontrollen:

Bei den Patientenproben mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung ungeklärter Ursache handelt es sich um Genitalhautfibroblastenproben von Patienten mit einer Hypospadie.

Eine Hypospadie ist eine angeborene Fehlmündung des Harnröhrenausganges (*Meatus urethrae*) an der Ventralseite des Penis, die oft in Verbindung mit einer Krümmung des Gliedes und einer dorsalen Vorhautschürze (lange Vorhaut auf der einen Seite und fehlen der Vorhaut auf der anderen) einhergeht. Es können unterschiedliche Schweregrade vorliegen (Abb. 20 im Anhang), wobei die eher leichte glanduläre Form am Häufigsten auftritt (Baskin, 2004; Silver, 2004). Mit einer stetig ansteigenden Inzidenz von ca. 1:125 bis 1:500 Geburten handelt es sich bei der Hypospadie um eine der häufigsten Fehlbildungen des Urogenitaltraktes mit bisher unklaren multifaktoriellen Ursachen (Baskin, 2004; Silver, 2004). Aufgrund der bekannten hohen familiären Häufung ist ein genetischer Einfluss auf die Ausbildung einer Hypospadie unbestritten. Jedoch werden auch Umwelteinflüsse für die Ausbildung von Hypospadien verantwortlich gemacht, die mit Veränderungen in der Enzymexpression einhergehen können (McLachlan, 2001).

Bei einem sehr geringen Anteil von Hypospadiepatienten konnten bereits Mutationen im 5 $\alpha$ R2-Gen oder im AR-Gen gefunden werden, wodurch das Auftreten einer Hypospadie in Zusammenhang mit einem 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 2 Mangel oder dem Androgenresistenz-Syndrom gebracht werden konnte (Allera *et al.*, 1995; Hiort *et al.*, 1994; Hyun *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002; Silver und Russell, 1999; Stock *et al.*, 1995). Um entsprechende Defekte bei den untersuchten

Hypospadieproben auszuschließen, wurden die in dieser Arbeit untersuchten Proben im Vorwege auf eine Mutation im 5 $\alpha$ R2-, im AR- und im 17 $\beta$ -HSD3-Gen hin überprüft.

#### hVHF:

Der Vergleich zwischen den Transkriptionsprofilen der hVHF-RNA-Proben von den Hypospadiepatienten und den Normalkontrollen zeigte nur für die 17 $\beta$ -HSD 2 einen signifikanten Unterschied in der Transkription. Dieser Befund musste jedoch vernachlässigt werden, da er sich durch eine einzelne Normalkontrollprobe erklären ließ, die eine extrem erhöhte Transkription dieses Enzyms aufwies. Bei zehn der Patientenproben zeigten sich dennoch Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der 17 $\beta$ -HSDs Typ 1, 3, 5 und 7, der 5 $\alpha$ R1 und 2 und dem AR, die eindeutig von denen der Normalkontrollen abwichen aber nicht signifikant waren (Tab. 14). Die auffälligsten Veränderungen wies das Transkriptionsmuster der 17 $\beta$ -HSD 5 auf. Bei etwa 40 % der untersuchten Patientenproben zeigten sich, verglichen mit den Normalkontrollproben, eindeutig abweichende Transkriptkonzentrationen für dieses Enzym. Acht der untersuchten Patientenproben wiesen eine eindeutig verminderte Transkription auf (Abb. 17). Interessanterweise zeigten alle drei Proben von Patienten mit einer sehr schweren Genitalfehlbildung, die mit einer weibliche Geschlechtszuweisung aufwachsen, eine verminderte mRNA-Expression der 17 $\beta$ -HSD 5. Im Gegensatz dazu wurde bei einer der Patientenproben die höchste Transkriptkonzentration der 17 $\beta$ -HSD 5 von allen untersuchten hVHF-RNA-Proben gemessen. Die ausgesprochen niedrigere Transkription der 17 $\beta$ -HSD 5 in vergleichsweise vielen Hypospadiepatientenproben könnte auf eine veränderte T-Synthese in der Vorhaut dieser Patienten hinweisen, welche einen Einfluss auf die normale androgenabhängige Morphogenese der Urethra haben kann. Eine Veränderung der Aktivität dieses Enzyms in der frühen Ontogenese der Urethra könnte die Ausbildung einer Hypospadie begünstigen.

Die abweichende mRNA-Expression der anderen Gene (die 17 $\beta$ -HSDs Typ 1, 3, 5 und 7, die 5 $\alpha$ R1 und 2 und der AR) könnte ebenfalls auf eine gestörte Steroidbiosynthese in der Vorhaut dieser Patienten hindeuten. Für solche veränderten Transkriptionsprofile kann es unterschiedliche Erklärungen geben. Mögliche Ursachen könnten ein bisher nicht bekannter monogenetischer Defekt,

oder ein epigenetisches Phänomen sein (Jaenisch und Bird, 2003). So könnten Mutationen in den korrespondierenden Genen dieser Enzyme zu Veränderungen führen (Kim *et al.*, 2002).

#### Skrotalhautfibroblasten:

In der RNA aus Skrotalhautfibroblastenproben zeigte sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression des AR-Gens, sowie eine deutlich erhöhte Transkription der 17 $\beta$ -HSD 5 bei etwa 80 % der untersuchten Patientenproben im Vergleich zu den Proben der Normalkontrollen (Abb. 19). Die höhere Transkriptkonzentration des AR könnte auf eine verstärkte Synthese von Androgenen in der Skrotalhaut dieser Patienten hinweisen. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Holterhus *et al.* (2005), die die Expression des AR mit einer veränderten Androgen-Responsivität in Fibroblastenzellkulturen in Verbindung bringen konnten. Die hohe Transkription der 17 $\beta$ -HSD 5 in sechs der acht untersuchten Patientenproben könnte auf eine erhöhte Metabolisierung von Androgenen in den Skrotalhautfibroblasten hindeuten, was wiederum die erhöhte AR Expression erklären würde. Diese scheinbar erhöhte Androgenmetabolisierung in der Skrotalhaut von Patienten mit einem eindeutigen Virilisierungsdefizit könnte mit einem lokalen Kompensationsmechanismus erklärt werden. Dieser könnte dazu dienen, die möglicherweise vorhandene Störung in dem androgenabhängigen Virilisierungsprogramm der Embryogenese der Skrotalhaut zu kompensieren. Zusätzlich demonstrieren die Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der 17 $\beta$ -HSD 5 zwischen der Vorhaut und der Skrotalhaut die gewebespezifische Steroidmetabolisierung anatomisch benachbarter Genitalhautbereiche (Hoppe *et al.*, 2006).

#### Vergleich der Patientenproben von Patienten mit bekannter Geschlechtsdifferenzierungsstörung mit den Normalkontrollen:

##### Vergleich der Patientengruppen und der Normalkontrollen aus Blutproben:

##### Patienten mit einem AGS:

Bei einem AGS liegt ein erblich bedingter 21-Hydroxylasemangel vor. Die 21-Hydroxylase katalysiert normalerweise die Synthese von Desoxycorticosteron aus Progesteron sowie die Synthese von Desoxycortisol aus 17-OH-Progesteron (Abb.

3). Dieser Enzymmangel führt zu einer gestörten Glukokortikoid-Synthese, wodurch der Körper nicht ausreichend Cortison produzieren kann. Auch die Produktion von Aldosteron kann gestört sein, was bei den Betroffenen zu einem Salzverlust führt. Da der Androgensyntheseweg nicht blockiert ist, führt der Überschuss an 17-OH-Progesteron zu einer Überproduktion an männlichen adrenalen Sexualhormonen (Androgenen), was bei 46,XX Embryonen zu einer Virilisierung des äußeren Genitale führen kann. Das innere Genitale ist weiblich. 46,YX Kinder zeigen keine genitalen Fehlbildungen.

Die vier untersuchten 46,XX AGS-Patientinnen wiesen im Vergleich mit den Normalkontrollproben für einen Großteil der untersuchten Gene deutlich niedrigere Transkriptkonzentrationen auf. Dabei fiel vor allem die deutlich niedrigere Transkription der 17 $\beta$ -HSDs Typ 3 und 5 auf. Auch die 5 $\alpha$ R1 zeigte deutlich niedrigere Transkriptionslevel verglichen mit den Normalkontrollen. Da scheinbar keine Androgene in diesen Patienten metabolisiert werden, weisen auch die Enzyme eine deutlich verminderte mRNA-Expression auf, die zur Deaktivierung der Androgene notwendig sind, wie die 17 $\beta$ -HSDs Typ 4 und 10. Da bisher keine weiteren Untersuchungen dieser steroidmetabolisierenden Enzyme bei AGS-Patienten existieren, konnten diese Ergebnisse nicht durch entsprechende Literatur unterstützt werden.

#### Patienten mit einer LCH:

Die Leydig-Zell-Hypoplasie ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, bei der eine LH-Rezeptormutation vorliegt. Dabei können das plazentale Hormon hCG und später das fetale LH nicht oder nur unzureichend wirken, was eine verminderte bis ausbleibende T-Synthese in den Leydigzellen des Hodens zur Folge hat. Das phänotypische Erscheinungsbild des äußeren Genitale bei 46,XY Kindern kann variieren, ist aber oft weiblich, da in den Hoden keine Androgene gebildet werden können (Misrahi et al., 1998; Richter-Unruh et al., 2004).

Bei den fünf untersuchten Patientenproben konnte eine verringerte mRNA-Expression der 5 $\alpha$ R1 nachgewiesen werden. Eine geringere Transkription der 5 $\alpha$ R1 könnte darauf hindeuten, dass dieses Isoenzym normalerweise bei gesunden Personen für die Synthese von DHT in peripheren Blutzellen verantwortlich ist. Dies würde somit die Ergebnisse der Normalkontrollen, die eine höhere 5 $\alpha$ R1 mRNA-Expression in Proben  $\leq$  20 Jahre aufwiesen, bestätigen.

Diese Aufgabe entfällt bei diesen Patienten, bei denen keine gonadale T-Synthese nachweisbar ist.

#### Patienten mit einem 17 $\beta$ -HSD3-Defekt:

Bei den Patientenproben mit einem 17 $\beta$ -HSD3-Defekt zeigten sich im Vergleich mit den weiblichen Normalkontrollproben Unterschiede in ihren Transkriptionsprofilen, wobei insbesondere die 17 $\beta$ -HSD 1 durch eine erhöhte Transkription in den Patienten-RNA-Proben auffiel. Hierfür könnte es verschiedene Erklärungen geben. Patienten mit einem 17 $\beta$ -HSD3-Defekt weisen einen erhöhten Androstendionspiegel im Blut auf, da dieses nicht, wie normalerweise üblich, durch das Enzym 17 $\beta$ -HSD 3 in den Hoden zu T umgewandelt wird. Aus Androstendion kann nun durch Aromatisierung Östron entstehen, welches dann wiederum durch die 17 $\beta$ -HSD Typ 1 zu dem potenten Östrogen E<sub>2</sub> umgewandelt werden kann (Abb. 3). Bei einem extremen Überschuss an Androstendion, kann die 17 $\beta$ -HSD 1 ebenfalls die Synthese von T katalysieren (Vihko et al., 2003; Zhang *et al.*, 1996). Jedoch liegt die androgene Aktivität der 17 $\beta$ -HSD 1 bei gerade einmal 1% ihrer Gesamtaktivität und ist somit sehr gering. So wird die T-Synthese in den Ovarien eher der katalytischen Aktivität der 17 $\beta$ -HSD Typ 5 zugeschrieben und nicht der 17 $\beta$ -HSD 1 (Qin und Rosenfield, 2000). Die 17 $\beta$ -HSD 5 zeigte jedoch in dieser Untersuchung bei den Patientenproben kein auffällig verändertes Transkriptionsprofil im Vergleich zu den Normalkontrollproben. Von der 17 $\beta$ -HSD 1 ist weiterhin bekannt, dass sie die Synthese von Androstendiol aus DHEA katalysieren kann, welches dann durch eines der beiden Isoenzyme der 3 $\beta$ -HSD zu T umgewandelt wird (Abb. 3) (Zhang *et al.*, 1996). Aber auch bei dieser möglichen katalytischen Funktion muss darauf verwiesen werden, dass dieses Isoenzym die Synthese von E<sub>2</sub> favorisiert.

Die Patientenproben in dem Altersbereich von  $\leq 20$  Jahren zeigten ebenfalls, verglichen mit den gleichaltrigen weiblichen Normalkontrollproben, signifikant höhere Transkriptkonzentrationen für die Gene der 17 $\beta$ -HSDs Typ 1, 4, 7 und 10 und des AR. Die 17 $\beta$ -HSD Typ 7 katalysiert wie das Isoenzym Typ 1 die Synthese der biologisch aktiven Östrogens E<sub>2</sub>. Eine androgene Aktivität ist für das Isoenzym bisher noch nicht beschrieben worden. Die Isoenzyme Typ 4 und 10 katalysieren hingegen vorwiegend die Deaktivierung von Steroidhormonen. Ihre erhöhte Transkription in den Patientenproben könnten einen kontrollierenden

Einfluss auf die Hormonhomöostase haben, indem sie der Bereitstellung an biologisch aktiven Steroidhormonen entgegenwirken (He *et al.*, 2001; Nagayoshi *et al.*, 2005). Diese Aufgabe wird in anderen Geweben normalerweise von der 17 $\beta$ -HSD 2 übernommen. Die 17 $\beta$ -HSD Typ 4 und 10 wiesen in den Blut-Normalkontrollen ein sehr konstantes Transkriptionsprofil auf.

Die erhöhte AR-mRNA-Expression könnte ebenfalls auf eine verstärkte Metabolisierung von Androgenen in den peripheren Blutzellen der 17 $\beta$ -HSD3-Patienten hinweisen. Da es bei Patienten mit einem 17 $\beta$ -HSD3-Defekt in der Pubertät zu irreversiblen Virilisierungen kommt, müssen betroffene Patienten DHT synthetisieren können. Die DHT-Synthese erfolgt normalerweise über T, welches bei den Patienten jedoch nicht in ausreichender Menge synthetisiert werden kann. Es ist bisher nicht geklärt, wie es zu der Virilisierung dieser Patienten kommt.

Von zwei Patienten mit einem 17 $\beta$ -HSD3-Defekt konnten jeweils zwei Blut-Proben untersucht werden, wobei die Abnahme der beiden Proben jeweils etwa ein Jahr auseinander lagen. Ein Vergleich der beiden Proben (a und b) zeigte für beide Patienten abweichende Transkriptionslevel in der mRNA-Expression des AR und der 17 $\beta$ -HSD 1, wobei die zuerst abgenommenen die höheren Werte aufwiesen (Tab. 14). Für den Patienten 2 konnte zusätzlich eine Veränderung in der mRNA-Expression der 17 $\beta$ -HSD 5 gezeigt werden, bei der ebenfalls eine verringerte Transkription in der älteren Patientenprobe detektiert wurde. Genauere Abfragen der gesamten Patientengruppe zeigten, dass das Weglassen von jeweils einer der beiden doppelten Patientenproben auf die signifikant veränderte Transkriptionskonzentration des AR und der 17 $\beta$ -HSD 1 keinen Einfluss hatte. Die verringerten Transkriptionslevel in den jeweils älteren Patientenproben könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die Transkription dieser Gene bei den Patienten einer altersabhängigen Regulation unterliegt.

#### Patienten mit einem AIS oder 5 $\alpha$ R2-Defekt:

Beide Patientengruppen zeigten keine auffälligen Transkriptionsmuster. Bei nur drei untersuchten Patientenproben war es jedoch auch nicht möglich eine genauere Auswertungen der Ergebnisse vorzunehmen.

Vergleich der Patientengruppen und der Normalkontrollen aus hVHF-RNA-Proben:

Die drei untersuchten Patientengruppen (AIS, 17 $\beta$ -HSD3- und 5 $\alpha$ R2-Defekt) aus den hVHF-Proben zeigten alle veränderte Transkriptionsprofile im Vergleich zu den Normalkontrollproben. Bei der jeweils sehr niedrigen Probenanzahl, die untersucht werden konnten, lässt sich keine Aussage darüber machen, welche Bedeutung diese veränderten Transkriptionsmuster haben könnten.

Vergleich der Patientengruppen und der Normalkontrollen aus Skrotalhautfibroblastenproben:

Von der Lokalisation Skrotalhaut konnten insgesamt vier Patientenfibroblastenproben mit der Diagnose AIS untersucht werden. Dabei wiesen drei der Patienten eine Punktmutation auf, welche jeweils zu einem Aminosäureaustausch führt. Die Konsequenz dieser Mutation ist eine verminderte bis ausbleibenden Synthese des AR. Bei dem vierten Patienten lag eine exonische splice-site Mutation im Exon acht vor, durch die es zu zwei unterschiedlich langen Transkripten des AR-Gens kommt (Hellwinkel *et al.*, 2001). Auch diese Mutation führt zu einer verminderten Bereitstellung des AR. Alle vier Patientenproben zeigten jedoch eine deutlich erhöhte AR Transkription. Dies könnte darauf hindeuten, dass in dem Skrotalhautgewebe durch eine vermehrte Transkription des Gens versucht wird den Mangel an AR zu kompensieren.

Die erhöhte Transkription der 5 $\alpha$ R2 und der 17 $\beta$ -HSD Typ 5 bei einem Patienten könnte auf eine verstärkte Synthese von T und DHT hinweisen. Beide Androgene können aufgrund des AR-Defektes nicht normal wirken. Dieser Fall verdeutlicht, dass die Transkriptionsprofile von Patienten mit einer Geschlechtsdifferenzierungsstörung stark variieren können.

Anhand der erzielten Ergebnisse lassen sich folgende Aussagen machen:

- Es konnte ein Transkriptionsprofil von allen untersuchten Genen in der RNA der untersuchten Blut-, hVHF- und Skrotalhautfibroblastenproben von gesunden Normalkontrollen erstellt werden. Nur die 17 $\beta$ -HSD 2 konnte nicht in der RNA aus Blutzellen nachgewiesen werden.
- Die drei unterschiedlichen RNA-Lokalisationen zeigten dabei ein sehr lokalisationsspezifisches Transkriptionsprofil für die untersuchten Gene. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass in jedem Gewebe und jeder Zellkultur eine

- sehr unterschiedliche Steroidmetabolisierung vorliegt und die Bereitstellung dieser Steroide somit stark variieren kann.
- Die interindividuellen Transkriptionsunterschiede der einzelnen Gene lassen auf eine für jedes Individuum unterschiedliche Steroidmetabolisierung schließen, die sich in den vielfältig auftretenden phänotypischen Ausprägungen widerspiegeln könnte.
  - In nahezu allen untersuchten Patientengruppen zeigten sich eindeutig veränderte Transkriptionsprofile für einige der untersuchten Gene. Dieses Ergebnis sind ein erster Hinweis darauf, dass die untersuchten Gene einen Einfluss auf die normale Steroidbiosynthese haben und eine veränderte Expression zu einer Störung der Synthese führen könnte.

Letztendlich sind die Ergebnisse vorwiegend deskriptiver Natur und beschränken sich auf das Transkriptionslevel der untersuchten Gene. Eine genaue Aussage über die Expression der Gene und die Synthese der Steroide lässt sich nicht machen. Andere Untersuchungen haben bereits einen funktionellen Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression und einer extragonadalen sowie gewebespezifischen Androgenmetabolisierung nachgewiesen. Um die vorliegenden Ergebnisse zu verifizieren, ist es notwendig, funktionelle Untersuchungen auf Protein-Ebene anzuschließen, wie auch biochemische Analysen der Steroidprofile in den Geweben und Zellkulturen.

**Literaturverzeichnis**

- Adamski J, Jakob F J (2001) A guide to 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 171:1-4.
- Aerts J, Gonzales M, Topalian S (2004) Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques* 36 (1):84-6, 88, 90-1
- Ahmed S, Hughes I (2002) The genetics of male undermasculinization. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56 (1):1-18.
- Allera A, Herbst M, Griffin J, Wilson J, et al (1995) Mutations of the androgen receptor coding sequence are infrequent in patients with isolated hypospadias. *J Clin Endocrinol Metab* 80 (9):2697-2699.
- Andersson S, Geissler W, Wu L, Davis D, et al (1996) Molecular genetics and pathophysiology of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (1):130-136.
- Andersson S, Moghrabe N (1997) Physiology and molecular genetics of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids* 62:143-147.
- Ando Y, Yamaguchi Y, Hamada K, Yoshikawa K, Itami S (1999) Expression of mRNA for androgen receptor, 5 $\alpha$ -reductase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in human dermal papilla cells. *Br J Dermatol* 141 (5):840-845.
- Avila D-M, Wilson C-M, Nandi N, Griffin J-E, McPhaul M-J (2002) Immunoreactive AR and genetic alterations in subjects with androgen resistance and undetectable AR levels in genital skin fibroblast ligand-binding assays. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (1):182-8.

- Axelsson J, Ingre M, Akerstedt T, Holmback U (2005) Effects of Acutely Displaced Sleep on Testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (8):4530-4535.
- Baker M E (2001) Evolution of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases and their role in androgen, estrogen and retinoid action. *Molecular and Cellular Endocrinology* 171:211-215.
- Ball T, Plummer F, Hay G K (2003) Improved mRNA quantitation in LightCycler RT-PCR. *Int Arch Allergy Immunol* 130 (1):82-6.
- Barcat J (1973) Current concepts of treatment., in *Plastic and reconstructive surgery of the genital area*, pp 249-263. Little, Brown & Co, Boston.
- Baskin L (2004) Hypospadias. *Adv Exp Med Biol* 545:3-22.
- Bemeur C, Ste-Marie L, Desjardins P, Hazell A, et al (2004) Decreased beta-actin mRNA expression in hyperglycemic focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett* 357 (3):211-4.
- Blouin K, Richard C, Belanger C, Dupont P, et al (2003) Local androgen inactivation in abdominal visceral adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (12):5944-50.
- Boehmer A L M, Brinkmann A O, Sandkuijl L A, Halley D J J, et al (1999) 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-3 Deficiency: Diagnosis, Phenotypic Variability, Population Genetics, and Worldwide Distribution of Ancient and de Novo Mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (12):4713-4721.
- Boehmer A L M, Brinkmann A O, Nijman R M, Verleun-Mooijman M C T, et al (2001) Phenotypic Variation in a Family with Partial Androgen Insensitivity Syndrome Explained by Differences in 5 $\alpha$  Dihydrotestosterone Availability. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (3):1240-1246.

- Breitling R, Marijanovic Z, Perovic D, Adamski J (2001) Evolution of 17beta-HSD type 4, a multifunctional protein of beta-oxidation. *Mol Cell Endocrinol* 171 (1-2):205-10.
- Brennan J, Capel B (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 5 (7):509-21.
- Brown K, Boerboom D, Bouchard N, Dore M, et al (2004) Human chorionic gonadotropin-dependent regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 4 in preovulatory follicles and its potential role in follicular luteinization. *Endocrinology* 145 (4):1906-15
- Brown T, Migeon C (1981) Cultured human skin fibroblasts: a model for the study of androgen action. *Mol Cell Biochem* 36 (1):3-22.
- Bustin S A (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29 (1):23-39.
- Chai Z, Brereton P, Suzuki T, Sasano H, et al (2003) 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells. *Endocrinology* 144 (5):2084-2091.
- Chang H, Chi J, Dudoit S, Bondre C, et al (2002) Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (20):12877-82.
- Chang T, Juan C, Yin P, Chi C, Tsay H (1998) Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep* 5 (2):469-71.
- Chretien S, Dubart A, Beaupain D, Raich N, et al (1988) Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1):6-10.

- Corbould A M, Bawden M J, Lavranos T C, Rodgers R J, Judd S J (2002) The effect of obesity on the ratio of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA to cytochrome P450 aromatase mRNA in subcutaneous abdominal and intra-abdominal adipose tissue of women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 (2):165-75.
- Cutolo M, Capellino S, Montagna P, Ghiorzo P, et al (2005) Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. *Arthritis Res Ther* 7 (5):R1124-32
- de Kok J, Roelofs R, Giesendorf B, Pennings J, et al (2005) Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 85 (1):154-9.
- Deplewski D, Liao S, Rosenfield R (1997) Preputial sebocyte 5alpha-reductase isoform specificity. *Endocrinology* 138 (10):4416-20.
- Dufort I, Rheault P, Huang X F, Soucy P, Luu-The V (1999) Characteristics of a highly labile human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 140 (2):568-74.
- El-Alfy M, Luu-The V, Huang X F, Berger L, et al (1999) Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Endocrinology* 140 (3):1481-91.
- English M A, Hughes S V, Kane K F, Langman M J, et al (2000) Oestrogen inactivation in the colon: analysis of the expression and regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in normal colon and colonic cancer. *Br J Cancer* 83 (4):550-8.

- Fang Y, Fliss A E, Robins D M, Caplan A J (1996) Hsp90 Regulates Androgen Receptor Hormone Binding Affinity in Vivo. *J. Biol. Chem.* 271 (45):28697-28702.
- Fassnacht M, Schlenz N, Schneider S, Wudy S, et al (2003) Beyond adrenal and ovarian androgen generation: Increased peripheral 5 alpha-reductase activity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (6):2760-6.
- Field A, Colditz G, Willett W, Longcope C, McKinlay J (1994) The relation of smoking, age, relative weight, and dietary intake to serum adrenal steroids, sex hormones, and sex hormone-binding globulin in middle-aged men. *J Clin Endocrinol Metab* 79 (5):1310-6.
- Fioroni P (1987) *Allgemeine und vergleichende Embryologie der Tiere*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Forti G, Falchetti A, Santoro S, Davis D, et al (1996) Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency: virilization in early infancy may be due to partial function of mutant enzyme. *Clin Endocrinol (Oxf)* 44 (4):477-82.
- Foss D, Baarsch M, Murtaugh M (1998) Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol* 9 (1):67-78.
- Fritsch M, Orfanos C E, Zouboulis C C (2001) Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *J Invest Dermatol* 116 (5):793-800.
- Geissler W M, Davis D L, Wu L, Bradshaw K D, et al (1994) Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet* 7 (1):34-39.

- Gerst C, Dalko M, Pichaud P, Galey J, et al (2002) Type-1 steroid 5 alpha-reductase is functionally active in the hair follicle as evidenced by new selective inhibitors of either type-1 or type-2 human steroid 5 alpha-reductase. *Exp Dermatol* 11 (1):52-8.
- Gil M, Coetzer T (2004) Real-time quantitative RT-PCR for human telomere elongation reverse transcriptase in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 28 (9):969-72.
- Ginzinger D (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30 (6):503-12.
- Gobinet J, Poujol N, Sultan C (2002) Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 198 (1-2):15-24.
- Green V L, Speirs V, Landolt A M, Foy P M, Atkin S L (1999) 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 2, 3, and 4 expression and enzyme activity in human anterior pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (4):1340-1345.
- Griffin J, Allman D, Durrant J, Wilson J (1981) Variation in steroid 5 alpha-reductase activity in cloned human skin fibroblasts. Shift in phenotypic expression from high to low activity upon subcloning. *J. Biol. Chem.* 256 (8):3662-3666.
- Gubin A, Miller J (2001) Human erythroid porphobilinogen deaminase exists in 2 splice variants. *Blood* 97 (3):815-7.
- Gunnarsson C, Ahnstrom M, Kirschner K, Olsson B, et al (2003) Amplification of HSD17B1 and ERBB2 in primary breast cancer. *Oncogene* 22 (1):34-40.
- Habib F, Ross M, Bayne C, Grigor K, et al (1998) The localisation and expression of 5 alpha-reductase types I and II mRNAs in human hyperplastic prostate and in prostate primary cultures. *J Endocrinol* 156 (3):509-17.

- Hager G, Lim C, Elbi C, Baumann C (2000) Trafficking of nuclear receptors in living cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74 (5):249-54.
- Haider S (2004) Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 233:181-241.
- Hammer F, Drescher D G, Schneider S B, Quinkler M, et al (2005) Sex Steroid Metabolism in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Changes with Aging. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (11):6283-6289.
- Härkönen P, Törn S, Kurkela R, Porvari K, et al (2003) Sex hormone metabolism in prostate cancer cells during transition to an androgen-independent state. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2):705-712.
- He X, Merz G, Yang Y, Pullakart R, et al (2000) Function of human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase in androgen metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1484 (2-3):267-77.
- He X, Merz G, Yang Y Z, Mehta P, et al (2001) Characterization and localization of human type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* 268 (18):4899-907.
- Hellwinkel O J-C (1999) Androgene und ihr Einfluß auf die Transkription von Androgenrezeptor und 5 alpha-Reduktase 2 in menschlichen Genitalhautfibroblasten. Medizinische Universität zu Lübeck.
- Hellwinkel O, Muller A, Struve D, Hiort O (2000) Influence of androgens and age on androgen receptor and 5 alpha-reductase II transcription. *Eur J Endocrinol* 143 (2):217-25.
- Hellwinkel O, Holterhus P, Struve D, Marschke C, et al (2001) A unique exonic splicing mutation in the human androgen receptor gene indicates a physiologic relevance of regular androgen receptor transcript variants. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (6):2569-75.

- Hiort O, Klauber G, Cendron M, Sinnecker G H, et al (1994) Molecular characterization of the androgen receptor gene in boys with hypospadias. *Eur J Pediatr* 153 (5):317-21.
- Hiort O, Holterhus P-M, Sinnecker G H G, Kruse K (1999(a)) Androgenresistenzsyndrome - Klinische und molekulare Grundlagen. *Deutsches Ärzteblatt* 96 (11):686-694.
- Hiort O (1999(b)) Androgenresistenz - Physiologie und Pathophysiologie der Androgenwirkung., in *der Klinik für Pädiatrie*, pp 1-99. Medizinische Universität zu Lübeck, Lübeck.
- Hiort O, Holterhus P M (2000) The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol* 142 (2):101-10.
- Hiort O, Zitzmann M (2004) Androgen receptor: pathophysiology, in *Testosterone*,(Nieschlag E, Hermann M eds), vol 3, pp 93-124. Cambridge University Press.
- Holterhus P M, Sinnecker G H, Hiort O (2000) Phenotypic diversity and testosterone-induced normalization of mutant L712F androgen receptor function in a kindred with androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (9):3245-50.
- Holterhus P, Hiort O, Demeter J, Brown P, Brooks J (2003) Differential gene-expression patterns in genital fibroblasts of normal males and 46,XY females with androgen insensitivity syndrome: evidence for early programming involving the androgen receptor. *Genome Biol* 4 (6):R37.
- Holterhus P, Salzburg J, Werner R, Hiort O (2005) Transactivation properties of wild-type and mutant androgen receptors in transiently transfected primary human fibroblasts. *Horm Res* 63 (3):152-8

- Hoppe U, Holterhus P, Wunsch L, Jocham D, et al (2006) Tissue-specific transcription profiles of sex steroid biosynthesis enzymes and the androgen receptor. *J Mol Med* 84 (8):651-9
- Hyun G, Kolon T (2004) Endocrine evaluation of hypospadias. *Adv Exp Med Biol* 545:31-43.
- Issa S, Schnabel D, Feix M, Wolf L, et al (2002) Human Osteoblast-Like Cells Express Predominantly Steroid 5{alpha}-Reductase Type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (12):5401-5407.
- Ito K, Suzuki T, Akahira J, Moriya T, et al (2002) Expression of androgen receptor and 5alpha-reductases in the human normal endometrium and its disorders. *Int J Cancer* 99 (5):652-7.
- Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl:245-54.
- Janne O, Palvimo J, Kallio P, Mehto M (1993) Androgen receptor and mechanism of androgen action. *Ann Med* 25 (1):83-9.
- Janssens N, Janicot M, Perera T, Bakker A (2004) Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Mol Diagn* 8 (2):107-13.
- Jenster G, van d K H, van V C, van d K T, et al (1991) Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 5 (10):1396-404.
- Jenster G, Trapman J, Brinkmann A (1993) Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem J* 293 (Pt 3):761-8.

- Jiang L, Kurosawa T, Sato M, Suzuki Y, Hashimoto T (1997) Physiological role of D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein. *J Biochem (Tokyo)* 121 (3):506-13.
- Kappas A, Drummond G, Henschke C, Valaes T (1995) Direct comparison of Sn-mesoporphyrin, an inhibitor of bilirubin production, and phototherapy in controlling hyperbilirubinemia in term and near-term newborns. *Pediatrics* 95 (4):468-74.
- Kaufman M, Pinsky L, Trifiro M, Lumbroso R, et al (1993) Kinetic evidence for a unique testosterone-receptor complex in 5 alpha-reductase sufficient genital skin fibroblasts and the effects of 5 alpha-reductase deficiency on its formation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45 (6):467-76.
- Kim K, Liu W, Cunha G, Russell D, et al (2002) Expression of the androgen receptor and 5 alpha-reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra. *Cell Tissue Res* 307 (2):145-53.
- Kim S, Kim T (2003) Selection of optimal internal controls for gene expression profiling of liver disease. *Biotechniques* 35 (3):456-8, 460.
- Kimura Y, Suzuki T, Kaneko C, Darnel A, et al (2003) Expression of androgen receptor and 5alpha-reductase types 1 and 2 in early gestation fetal lung: a possible correlation with branching morphogenesis. *Clin Sci (Lond)* 105 (6):709-13.
- Klocker H, Gromoll J, Cato A (2004) The androgen receptor: molecular biology, in *Testosterone*, (Nieschlag E, Hermann M eds), vol 3, pp 39-92. Cambridge University Press.
- Koh E, Noda T, Kanaya J, Namiki M (2002) Differential expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozyme genes in prostate cancer and noncancer tissues. *Prostate* 53 (2):154-159.

- Labrie F, Luu-The V, Lin S X, Labrie C, et al (1997) The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* 62 (1):148-58.
- Labrie F, Luu-The V, Lin S X, Simard J, Labrie C (2000(a)) Role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid formation in peripheral intracrine tissues. *Trends Endocrinol Metab* 11 (10):421-427.
- Labrie F, Luu-The V, Lin S X, Simard J, et al (2000(b)) Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol* 25 (1):1-16.
- Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Belanger A, et al (2003) Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocr Rev* 24 (2):152-82.
- Lamberigts G, Dierickx P, De M P, Verhoeven G (1979) Comparison of the metabolism and receptor binding of testosterone and 17 beta-hydroxy-5 alpha-androstan-3-one in normal skin fibroblast cultures: influence of origin and passage number. *J Clin Endocrinol Metab* 48 (6):924-30.
- Lange S, Bender R (2001) Median oder Mittelwert? *Dtsch. Med. Wschr.* 126 (Suppl. Statistik):T 25-T 26.
- Leenders F, Dolez V, Begue A, Moller G, et al (1998) Structure of the gene for the human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type IV. *Mammalian Genome* 9 (12):1036-41.
- Lewis M, Wiebe J, Heathcote J (2004) Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC Cancer* 4 (1):27

- Li Z G, Danis V A, Brooks P M (1993) Effect of gonadal steroids on the production of IL-1 and IL-6 by blood mononuclear cells in vitro. *Clin Exp Rheumatol* 11 (2):157-62.
- Lin H K, Steckelbroeck S, Fung K M, Jones A N, Penning T M (2004) Characterization of a monoclonal antibody for human aldo-keto reductase AKR1C3 (type 2 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase); immunohistochemical detection in breast and prostate. *Steroids* 69 (13-14):795-801.
- Longcope C, Feldman H, McKinlay J, Araujo A (2000) Diet and sex hormone-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (1):293-6.
- Luu-The V (2001) Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76 (1-5):143-51.
- Luu-The V, Zhang Y, Poirier D, Labrie F (1995) Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: oxidation/reduction and inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55 (5-6):581-7.
- Ma R, Wu S, Lin Q (2005) Homologous up-regulation of androgen receptor expression by androgen in vascular smooth muscle cells. *Horm Res* 63 (1):6-14.
- Mahendroo M, Russell D (1999) Male and female isoenzymes of steroid 5alpha-reductase. *Rev Reprod* 4 (3):179-83.
- Margiotti K, Kim E, Pearce C L, Spera E, et al (2002) Association of the G289S single nucleotide polymorphism in the HSD17B3 gene with prostate cancer in Italian men. *Prostate* 53 (1):65-68.

- McLachlan J A (2001) Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach Us About Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocr Rev* 22 (3):319-341.
- Meller M, Vadachkoria S, Luthy D, Williams M (2005) Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta* 26 (8-9):601-7.
- Meseguer A, Puche C, Cabero A (2002) Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Horm Metab Res* 2002 Nov;34(11-12):731-6 34 (11-12):731-736.
- Mindnich R, Moller G, Adamski J (2004) The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 218 (1-2):7-20
- Misrahi M, Beau I, Meduri G, Bouvattier C, et al (1998) Gonadotropin receptors and the control of gonadal steroidogenesis: physiology and pathology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12 (1):35-66.
- Moore R, Wilson J (1976) Steroid 5alpha-reductase in cultured human fibroblasts. Biochemical and genetic evidence for two distinct enzyme activities. *J Biol Chem* 251 (19):5895-900.
- Mowszowicz I, Kirchhoffer M, Kuttann F, Mauvais-Jarvis P (1980) Testosterone 5 alpha-reductase activity of skin fibroblasts. Increase with serial subcultures. *Mol Cell Endocrinol* 17 (1):41-50.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, et al (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-73.
- Mullis K, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-50.

- Murray A, Elliott D, Atkinson M (1970) Nucleotide biosynthesis from preformed purines in mammalian cells: regulatory mechanisms and biological significance. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 10:87-119.
- Murray A (1971) The biological significance of purine salvage. *Annu Rev Biochem* 40:811-26.
- Nagayoshi Y, Ohba T, Yamamoto H, Miyahara Y, et al (2005) Characterization of 17(beta)-hydroxysteroid dehydrogenase type 4 in human ovarian surface epithelial cells. *Mol Hum Reprod* 11 (9):615-21
- Napoli J L (2001) 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 9 and other short-chain dehydrogenases/reductases that catalyze retinoid, 17beta- and 3alpha-hydroxysteroid metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 171 (1-2):103-9.
- Nelson V L, Qin-Kn K N, Rosenfield R L, Wood J R, et al (2001) The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (12):5925-33.
- Nordling E, Oppermann U C, Jornvall H, Persson B (2001) Human type 10 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: molecular modelling and substrate docking. *J Mol Graph Model* 19 (6):514-520, 591-593.
- Novoradovskaya N, Whitfield M, Basehore L, Novoradovsky A, et al (2004) Universal Reference RNA as a standard for microarray experiments. *BMC Genomics* 5 (1):20.
- Oduwole O, Makinen J, Isomaa V, Karttunen T, Vihko P (2003) Sex steroid metabolism in human gastric mucosa: 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in normal, inflamed and neoplastic gastric tissues. *Anticancer Res* 23 (5A):3889-97.

- Oliveira I, Lhullier C, Brum I, Spritzer P (2003) The 5alpha-reductase type 1, but not type 2, gene is expressed in anagen hairs plucked from the vertex area of the scalp of hirsute women and normal individuals. *Braz J Med Biol Res* 36 (10):1447-54.
- Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, et al (2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact* 143-144:247-53.
- Owen G, Zelent A (2000) Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cell Mol Life Sci* 57 (5):809-27.
- Ozawa H (2005) Steroid Hormones, their receptors and neuroendocrine system. *J Nippon Med Sch* 72 (6):316-25.
- Patel P, Nussbaum R, gramson P, Ledbetter D, et al (1984) Organization of the HPRT gene and related sequences in the human genome. *Somat Cell Mol Genet* 10 (5):483-93.
- Pelletier G, Luu-The V, Huang X, Lapointe H, Labrie F (1998) Localization by in situ hybridization of steroid 5alpha-reductase isozyme gene expression in the human prostate and preputial skin. *J Urol* 160 (2):577-82.
- Pelletier G, Luu-The V, Tetu B, Labrie F (1999) Immunocytochemical localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human reproductive tissues. *J Histochem Cytochem* 47 (6):731-8.
- Pelletier G, Ren L (2004) Localization of sex steroid receptors in human skin. *Histol Histopathol* 19 (2):629-36.
- Peltoketo H, Luu-The V, Simard J, Adamski J (1999) 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol* 23 (1):1-11.

- Penning T M (1997) Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev* 18 (3):281-305.
- Penning T M, Burczynski M E, Jez J M, Hung C F, et al (2000) Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldoketo reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J* 351 (Pt 1):67-77.
- Penning T M, Burczynski M E, Jez J M, Lin H K, et al (2001) Structure-function aspects and inhibitor design of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). *Mol Cell Endocrinol* 171 (1-2):137-49.
- Prince F (2001) The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *J Endocrinol* 168 (2):213-216.
- Provost P R, Blomquist C H, Drolet R, Flamand N, Tremblay Y (2002) Androgen inactivation in human lung fibroblasts: variations in levels of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 5alpha-reductase activity compatible with androgen inactivation. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (8):3883-3892.
- Puranen T, Poutanen M, Ghosh D, Vihko R, Vihko P (1997) Origin of substrate specificity of human and rat 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, using chimeric enzymes and site-directed substitutions. *Endocrinology* 138 (8):3532-9.
- Puy H, Gross U, Deybach J, Robreau A, et al (1998) Exon 1 donor splice site mutations in the porphobilinogen deaminase gene in the non-erythroid variant form of acute intermittent porphyria. *Hum Genet* 103 (5):570-5.
- Qin K N, Rosenfield R L (2000) Expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 in human ovary: a pilot study. *J Soc Gynecol Investig* 7 (1):61-4.

- Quinkler M, Bumke-Vogt C, Meyer B, Bahr V, et al (2003) The human kidney is a progesterone-metabolizing and androgen-producing organ. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (6):2803-2809.
- Quinkler M, Sinha B, Tomlinson J W, Bujalska I J, et al (2004) Androgen generation in adipose tissue in women with simple obesity - a site-specific role for 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *J Endocrinol* 183 (2):331-342.
- Richter-Unruh A, Verhoef-Post M, Malak S, Homoki J, et al (2004) Leydig Cell Hypoplasia: Absent Luteinizing Hormone Receptor Cell Surface Expression Caused by a Novel Homozygous Mutation in the Extracellular Domain. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (10):5161-5167.
- Russell D, Wilson J (1994) Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 63:25-61.
- Saez J (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15 (5):574-626.
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, et al (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839):487-91.
- Samy T S, Schwacha M G, Cioffi W G, Bland K I, Chaudry I H (2000) Androgen and estrogen receptors in splenic T lymphocytes: effects of flutamide and trauma-hemorrhage. *Shock* 14 (4):465-70.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12):5463-7.
- Sasano H, Suzuki T, Takeyama J, Utsunomiya H, et al (2000) 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human breast and endometrial

- carcinoma. A new development in intracrinology. *Oncology* 59 (Suppl.1):5-12.
- Sato T, Tadokoro T, Sonoda T, Asada Y, et al (1999) Minoxidil increases 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 5 alpha-reductase activity of cultured human dermal papilla cells from balding scalp. *J Dermatol Sci* 19 (2):123-5.
- Schmittgen T D, Zakrajsek B A, Mills A G, Gorn V, et al (2000) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 285 (2):194-204.
- Schneider-Yin X, Bogard C, Rufenacht U, Puy H, et al (2000) Identification of a prevalent nonsense mutation (W283X) and two novel mutations in the porphobilinogen deaminase gene of Swiss patients with acute intermittent porphyria. *Hum Hered* 50 (4):247-50.
- Silver R, Russell D (1999) 5alpha-reductase type 2 mutations are present in some boys with isolated hypospadias. *J Urol* 162 (3 Pt 2):1142-5.
- Silver R (2004) Endocrine abnormalities in boys with hypospadias. *Adv Exp Med Biol* 545:45-72.
- Sinisi A, Pasquali D, Notaro A, Bellastella A (2003) Sexual differentiation. *J Endocrinol Invest* 26 (3 Suppl):23-8.
- Sinnecker G, Hiort O, Dibbelt L, Albers N, et al (1996) Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Am J Med Genet* 63 (1):223-30.
- Sinnecker G, Hiort O, Nitsche E, Holterhus P, Kruse K (1997) Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group. *Eur J Pediatr* 156 (1):7-14.

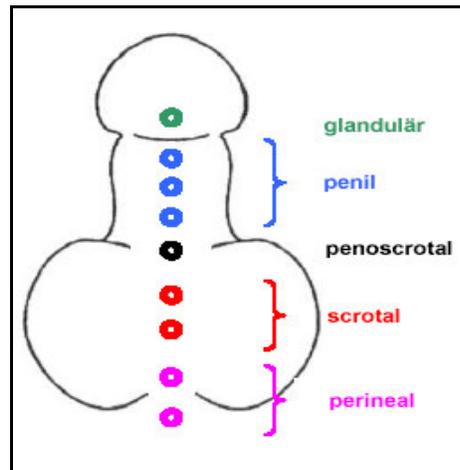
- Smith L, Sanders J, Kaiser R, Hughes P, et al (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321 (6071):674-9.
- Sobel V, Imperato-McGinley J (2004) Gender identity in XY intersexuality. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 13 (3):609-22, viii.
- Speirs V, Green A, Atkin S (1998) Activity and gene expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from normal and tumourous human breast tissue: the role of IL-8. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67 (3):267-74.
- Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M (2004) Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem* 50 (3):509-15.
- Steckelbroeck S, Stoffel-Wagner B, Reichelt R, Schramm J, et al (1999) Characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in brain tissue: testosterone formation in the human temporal lobe. *J Neuroendocrinol* 11 (6):457-64.
- Steckelbroeck S, Watzka M, Reissinger A, Wegener-Toper P, et al (2003) Characterisation of estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17beta-HSD) activity in the human brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86 (1):79-92.
- Stock J, Scherz H, Kaplan G (1995) Distal hypospadias. *Urol Clin North Am* 22 (1):131-8.
- Stoffel-Wagner B (2003) Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 1007:64-78.
- Stoffel-Wagner B, Watzka M, Steckelbroeck S, Schramm J, et al (1999) Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 3 and 4 in the human temporal lobe. *J Endocrinol* 160 (1):119-26.

- Takeyama J, Sasano H, Suzuki T, Iinuma K, et al (1998) 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human placenta: an immunohistochemical study with correlation to placental development. *J Clin Endocrinol Metab* 83 (10):3710-5.
- Theintz G, Steimer T, Sizonenko P (1989) Developmental pattern of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 5 alpha-reductase activities in the foreskin of boys from birth to eight years of age. *Horm Res* 32 (4):124-9.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De B B, et al (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75 (2-3):291-5.
- Thiele S, Hoppe U, Holterhus P-M, Hiort O (2005) Isoenzyme type 1 of 5alpha-reductase is abundantly transcribed in normal human genital skin fibroblasts and may play an important role in masculinization of 5alpha-reductase type 2 deficient males. *Eur J Endocrinol* 152 (6):875-880.
- Thigpen A, Silver R, Guileyardo J, Casey M, et al (1993) Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *J Clin Invest* 92 (2):903-10.
- Tilley W, Marcelli M, Wilson J, McPhaul M (1989) Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1):327-31.
- Trapman J, Klaassen P, Kuiper G, van d K J, et al (1988) Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 153 (1):241-8.
- Tria A, Hiort O, Sinnecker G (2004) Steroid 5alpha-reductase 1 polymorphisms and testosterone/dihydrotestosterone ratio in male patients with hypospadias. *Horm Res* 61 (4):180-3.

- Twosten W, Holterhus P, Sippell W G, Morlot M, et al (2000) Clinical, endocrine, and molecular genetic findings in patients with 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Horm Res* 53 (1):26-31.
- Veldscholte J, Berrevoets C, Zegers N, van d K T, et al (1992) Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. *Biochemistry* 31 (32):7422-30.
- Vihko P, Harkonen P, Oduwale O, Torn S, et al (2003) 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases and cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83 (1-5):119-122.
- Wall S, Edwards D (2002) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): a comparison of primer-dropping, competitive, and real-time RT-PCRs. *Anal Biochem* 300 (2):269-73.
- Warne G, Kanumakala S (2002) Molecular endocrinology of sex differentiation. *Semin Reprod Med* 20 (3):169-80.
- Whitehead S, Lacey M (2003) Phytoestrogens inhibit aromatase but not 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 1 in human granulosa-luteal cells: evidence for FSH induction of 17beta-HSD. *Hum Reprod* 18 (3):487-94.
- Whitney A R, Diehn M, Popper S J, Alizadeh A A, et al (2003) Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (4):1896-1901.
- Wiebe J, Lewis M (2003) Activity and expression of progesterone metabolizing 5alpha-reductase, 20alpha-hydroxysteroid oxidoreductase and 3alpha(beta)-hydroxysteroid oxidoreductases in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF-10A) human breast cancer cells. *BMC Cancer* 3 (1):9.

- Wilson J, Griffin J, Russell D (1993) Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev* 14 (5):577-93.
- Wu A H, Seow A, Arakawa K, Van Den Berg D, et al (2003) HSD17B1 and CYP17 polymorphisms and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. *Int J Cancer* 104 (4):450-457.
- Zhang J, Snyder S (1992) Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (20):9382-5.
- Zhang Y, Word R, Fesmire S, Carr B, Rainey W (1996) Human ovarian expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, and 3. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (10):3594-3598.
- Zhu S J, Li Y, Li H, Wang Y L, et al (2002) Retinoic acids promote the action of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 on the biosynthesis of 17beta-estradiol in placental cells. *J Endocrinol* 172 (1):31-43.

## Hypospadieabbildung



**Abb. 20:** Hypospadieeinteilung:  
glandulär = I; penil = II; penoscrotal =  
III; scrotal = IV; perineal = V.

**Erstautor von Publikationen in Fachzeitschriften:**

Hoppe U, Holterhus P, Wünsch L, Jocham D, Drechsler T, Thiele S, Marschke C, Hiort O (2006) Tissue-specific transcription profiles of sex steroid biosynthesis enzymes and the androgen receptor. *J Mol Med* 84: 651-659.

**Eingereichte Erstveröffentlichung:**

Hoppe U, Wünsch L, Holterhus P, Jocham D, Richter-Unruh A, Hiort O (2006) Altered transcription profiles of key-enzymes of androgen biosynthesis in genital skin fibroblasts from patients with hypospadias.

**Koautor von Publikationen in Fachzeitschriften:**

Hiort O, Holterhus P, Werner R, Marschke C, Hoppe U, Partsch C, Riepe F, Achermann J, Struve D (2005) Homozygous disruption of P450 side-chain cleavage (CYP11A1) is associated with prematurity, complete 46,XY sex reversal, and severe adrenal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 538-541.

Holterhus P, Werner R, Hoppe U, Bassler J, Korsch E, Ranke M, Dörr H, Hiort O (2005) Molecular features and clinical phenotypes in androgen insensitivity syndrome in the absence and presence of androgen receptor gene mutations. *J Mol Med* 83: 1005-1013.

Thiele S, Hoppe U, Holterhus P-M, Hiort O (2005) Isoenzyme type 1 of 5 $\alpha$ -reductase is abundantly transcribed in normal human genital skin fibroblasts and may play an important role in masculinization of 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficient males. *Eur J Endocrinol* 152: 875-880.

**Präsentationen:**

Hoppe U (2002) Androgenrezeptor Transkription in peripheren Blutzellen gibt neue Einblicke in die Geschlechtsdifferenzierung. In: Lübeck.

Hoppe U, Holterhus P, Marschke C, Hiort O (2003) Detection of androgen receptor transcription in peripheral blood cells. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 111: S28.

Hoppe U, Holterhus P, Marschke C, Hiort O (2004 b) The expression levels of 17 $\beta$ -HSD-isoenzymes in peripheral blood cells show interindividual variations. In: *International Symposium Intersex-from Gene to Gender*. Lübeck, Germany.

Hoppe U, Holterhus P, Marschke C, Hiort O (2005) Key-enzymes of human sexual differentiation show tissue specific transcription profiles. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 113: S65.

Hoppe U, Holterhus P, Marschke C, O H (2004 a) Existence of interindividual differences in 17 $\beta$ -HSD-isoenzymes transcription profiles in peripheral blood cells. In: *International Symposium Intersex-from Gene to Gender*. Lübeck, Germany. pp S69.