

Aus der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Kommissarische Direktorin: Priv.-Doz. Dr. U. Thyen

**Differentielle Aktivierung
androgenresponsibler Reportergene
durch
anabole und androgene Steroide**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von

Stefan Piefke

aus Braunschweig

Lübeck 2004

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Ball

Tag der mündlichen Prüfung: 13.08.2004

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den 13.08.2004

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung	1
1.1.	Der humane Androgenrezeptor	1
1.1.1.	Aufbau des Androgenrezeptors	1
1.1.2.	Hormonresponsible Elemente	2
1.1.3.	Wirkungsmechanismus des Androgenrezeptors	3
1.2.	Physiologie der Androgenwirkung	6
1.3.	Differentielle Androgenwirkungen	8
1.3.1.	Dihydrotestosteron	8
1.3.2.	Testosteron und Testosteronvorstufen	8
1.3.3.	Weitere Beispiele androgener Wirkung	9
1.4.	Anabole Steroide	9
1.5.	Differenzierung zwischen androgenen und anabolen Steroiden anhand biologischer Wirkungen	11
1.6.	Mögliche Wirkungsmechanismen anaboler Steroide	12
1.7.	Beschreibung genregulatorischer Elemente	14
1.8.	Prinzip einer Transaktivierungsmessung	16
1.9.	Fragestellung	17
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Transfektionsuntersuchungen	19
2.1.1.	Material zur Züchtung der Zellen	19
2.1.1.1.	Chinesische-Hamstero-var-Zellen	19
2.1.1.2.	Dulbecco´s-Modified-Eagles-Medium	19
2.1.1.3.	PBS	20
2.1.2.	Beschreibung der Plasmide	21
2.1.2.1.	Androgenrezeptor-Expressionsplasmid	21
2.1.2.2.	Reportergene	22
2.1.2.2.1.	MMTV-luc	22
2.1.2.2.2.	pRE ₂ -TATA-luc	19
2.1.2.2.3.	GRE-OCT-luc	23
2.1.2.3.	pRL-SV40-Vektor zur Messung der Transfektionseffizienz	24
2.1.2.4.	Carrier-Plasmid pTZ19	25

2.1.3.	Plasmidpräparation	25
2.1.4.	Hormone und Hormonderivate	27
2.1.4.1.	Testosteron	28
2.1.4.2.	Dihydrotestosteron	28
2.1.4.3.	Androstendion	29
2.1.4.4.	Dehydroepiandrosteron	29
2.1.4.5.	Methyltrienolon	30
2.1.4.6.	Stanozolol	30
2.1.4.7.	Oxandrolon	31
2.1.4.8.	Nandrolon	31
2.2.	Transaktivierung	32
2.2.1.	Vorbereitung der Zellen	32
2.2.2.	Transfektion	33
2.2.3.	Hormoninkubation	34
2.2.4.	Messung der Luziferaseaktivität	34
2.3.	Normalisierung der Ergebnisse	35
2.4.	Hierarchische Clusteranalyse der Transaktivierungsdaten	36
2.5.	Negativkontrollen	36
2.6.	Western-Blot zur Prüfung der Qualität der Transfektionen	37
2.6.1.	Herstellung der Zellproteinlysate	37
2.6.2.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.7.	Verzeichnis der Bezugsfirmen	41
3.	Ergebnisse	42
3.1.	Kontrolle der Transfektion	42
3.2.	Aktivierung am MMTV-, GRE-OCT- und TATA-luc-Reportergen	43
3.2.1.	MMTV-luc-Reportergen	43
3.2.2.	GRE-OCT-luc-Reportergen	44
3.2.3.	pRE ₂ -TATA-luc-Reportergen	45
3.3.	Konzentrationsabhängige Reportergenaktivierungsprofile	47
3.3.1.	Hormonkonzentration 0,001nM	47
3.3.2.	Hormonkonzentration 0,01nM	48
3.3.3.	Hormonkonzentration 0,1nM	49
3.3.4.	Hormonkonzentration 1,0nM	50

3.3.5.	Hormonkonzentration 10nM	50
3.3.6.	Hormonkonzentration 100nM	51
3.4.	Hierarchische Clusteranalyse der Reportergenaktivitäten	52
3.5.	Negativkontrollen	54
3.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse	55
4.	Diskussion	57
4.1.	Aussagekraft des verwendeten Zellkulturmodells	57
4.2.	Differentielles Profil aktivierter Reportergene	59
4.3.	Alternative Möglichkeiten für die differentielle Wirkungsvermittlung von anabolen und virilisierenden Androgenen	61
4.4.	Einfluss von Transkriptionsfaktoren	62
5.	Zusammenfassung	64
6.	Wertetabellen	65
7.	Literaturverzeichnis	73
8.	Anhang	85

Abkürzungsverzeichnis

A	Androstendion
Abb.	Abbildung
AF-1	activation-function-1 (= Aktivierungs-Element 1)
AR	Androgenrezeptor
ARE	androgenresponsibles Element
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinesische-Hamster-Ovar-Zellen
DCC-FCS	steroidfreies Fetales-Kälberserum
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
FCS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GRE	glukokortikoidresponsibles Element
hAR	humaner Androgenrezeptor
HRE	hormonresponsibles Element
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
HSP90	heat shock protein 90 (=Hitzeschock-Protein 90)
IUPAC	Internationale Union für Reine und Angewandte Chemie
i.v.	intra venös
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
Lig.-Konz.	Liganden-Konzentration

luc	Luziferase
M	molar = mol/l
MG	Molekülgewicht
min	Minuten
ml	Milliliter = 10^{-3} l
MLA	Musculus levator ani
mM	millimolar = 10^{-3} mol/l
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N	Nandrolon
Neg.-Induk.	Negativ-Induktion
NF-1	nuclear factor 1 (= Kernfaktor 1)
ng	Nanogramm = 10^{-9} g
nM	Nanomolar = 10^{-9} mol/l
NNR	Nebennierenrinde
ORI	origin of replication (= Ursprung der Replikation)
Ox	Oxandrolon
p450arom	Cytochrom-P450-Aromatase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PRE	progesteronresponsibles Element
R1881	Methyltrienolon
RNA	Ribonukleinsäure
S	Stanozolol
SD	Standardabweichung
SHBG	Sexualhormonbindendes Globulin
T	Testosteron
Tab.	Tabelle
u	units = Einheiten
z.B.	zum Beispiel
μ g	Mikrogramm = 10^{-6} g
μ l	Mikroliter = 10^{-6} l

1. Einführung

1.1. Der humane Androgenrezeptor

1.1.1. Aufbau des Androgenrezeptors

Der Androgenrezeptor gehört zu einer Gruppe von Hormonrezeptoren, die aufgrund ihrer Homologie und Wirkungsweise als Steroidhormonrezeptor-Superfamilie zusammengefasst wird. Zu dieser Gruppe gehören zudem der Progesteron-, Glukokortikoid-, Mineralkortikoid-, Östrogen-, Triiodthyronin-, Vitamin-D- und Retinoatrezeptor. Sie sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren in der Regulation der Genexpression.

Das Gen für den Androgenrezeptor liegt auf dem langen Arm des X-Chromosoms an Position Xq11-q12. Die Länge variiert zwischen 75 und 90 Kilobasen. Die protein-kodierende Region besteht aus einer Länge von insgesamt ca. 2800 Basenpaaren. Unterteilt werden die Exons durch Introns mit Längen zwischen 0,7 und 26 Kilobasen (Abb. 1-1).

Das Androgenrezeptorprotein ist aus insgesamt 910 bis 919 Aminosäuren aufgebaut und hat ein Molekülgewicht von 110 bis 112 kDa. Verschiedene Domänen bilden den Androgenrezeptor und vermitteln unterschiedliche Aufgaben.

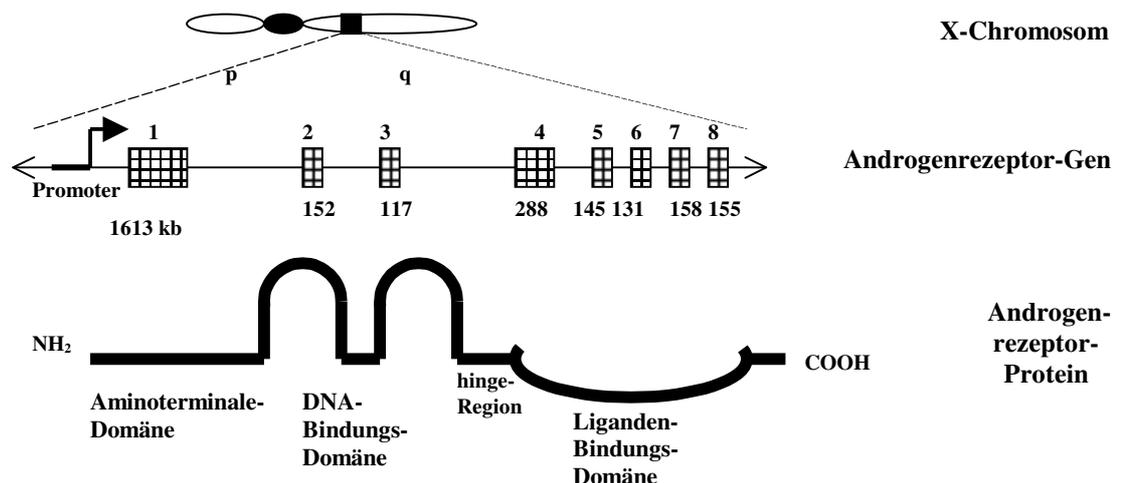


Abb. 1-1: Schematische Darstellung des X-Chromosoms (oben); der Exons im AR-Gen mit Angabe ihrer Größe in kb (Mitte) und des Androgenrezeptor-Proteins (unten);

(modifiziert nach Quigley CA, *Endocr. Rev* (1995); Erläuterung siehe Text)

Die Aminoterminale-Domäne stellt mit bis zu 537 Aminosäuren die größte Domäne des Androgenrezeptors dar. Sie wird von Exon 1 codiert. Zugleich ist es der Bereich mit der größten DNA-Sequenz-Variabilität zwischen den einzelnen Mitgliedern der Steroidrezeptorfamilie.

Zu den Aufgaben wird die Aktivierung und Kontrolle der Transkription gezählt, was unter anderem durch die activation-function-1 (Aktivierungs-Element, AF-1) vermittelt wird. Daneben gibt es weitere Bereiche, die über Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle in der Transkriptionsregulation spielen [27].

Die DNA-Bindungsdomäne ist der Bereich mit der größten Homologie in der Familie der Steroidrezeptoren [79]. Ihre Aminosäuresequenz hat eine Übereinstimmung von ungefähr 80%. Diese Domäne ist für die Wechselwirkung des Rezeptors mit der DNA [13,30] zuständig. Über den 2. Zink-Finger zweier Zink-Finger wird die Bindung mit den Ziel-DNA-Abschnitten vermittelt. Diese DNA-Bereiche weisen Sequenzen auf, die als hormone-response-elements (hormonresponsible Elemente, HRE) bezeichnet werden.

Die sogenannte hinge-Region (Scharnier-Region) unterstützt die Bindung des liganden-gebundenen Steroidhormonrezeptors an die DNA [13,30]. Das mit der hinge-Region und DNA-Bindungsdomäne assoziierte nuclear-targeting-signal (Kern-Ziel-Signal) [96] ist für den Transfer des liganden-gebundenen Androgenrezeptors vom Zytoplasma in den Zellkern verantwortlich.

Die Liganden-Bindungsdomäne wird mit ungefähr 50% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der Steroidrezeptoren durch eine relativ große Homologie gekennzeichnet.

An dieser Domäne kommt es zur Ligandenbindung, die abhängig der Struktur der Liganden-Bindungsdomäne spezifisch für verschiedene Steroide ist [58]. Diese initiale Aktivierung des Rezeptors führt zur Konformationsänderung der Liganden-Bindungsdomäne [73].

1.1.2. Hormonresponsible Elemente

Nach Bindung eines Liganden an einen Steroidhormonrezeptor wird dieser aus dem Zytoplasma in den Zellkern verlagert. Durch Dimerisierung zweier Rezeptoren können sie

gemeinsam an spezifische Zielsequenzen der DNA, die hormon-responsiblen Elemente (HRE's) [13,30,59,79], binden.

Anhand ihrer Basenstruktur können verschiedene HRE's unterschieden werden. Meist handelt es sich hierbei um komplett oder partiell palindromische Sequenzen [13,30,59,79]. Die verschiedenen HRE's können weiterhin anhand ihrer Spezifität für die einzelnen Steroidhormonrezeptoren unterschieden werden. Androgenresponsible Elemente (ARE) oder zum Beispiel glukokortikoidresponsible Elemente (GRE) weisen eine Spezifität für die jeweiligen Steroide auf.

Demgegenüber wurden auch Basensequenzen beschrieben, die nicht spezifisch für einen bestimmten Rezeptor sind [6,13,30,79,89].

Ein HRE mit der Struktur 5'-AGAACA_nnnTGTTCT-3' konnte unter anderen von Claessens et al. [13] gezeigt werden. Der aktivierte Androgen-, Glukokortikoid-, Mineralokortikoid- oder Progesteronrezeptor kann mit dieser DNA-Sequenz interagieren. Interessanterweise kann bei einer direkten Abfolge der oben dargestellten DNA-Sequenz ohne die drei zwischengeschalteten Basen nur der Androgenrezeptor mit diesem HRE interagieren, 5'-TGTTCT-3' [4,13,30,79].

Durch Punktmutationen kann diese Spezifität für einen bestimmten Steroidhormonrezeptor verändert werden. Verrijdt et al. [89] konnten einen Wechsel der Spezifität eines HRE's von Androgen- zu Glukokortikoidrezeptoren zeigen.

In einer anderen Arbeit konnten Robins et al. [75] nachweisen, dass der Glukokortikoidrezeptor an ein ARE binden kann, dabei aber keine Effekte ausgeübt werden. Dies kann durch spezifische Transkriptionsfaktoren und Wechselwirkungen mit dem Androgenrezeptor erklärt werden.

Die Aktivität der Androgene wird weiterhin über die die HRE's flankierenden Basenstrukturen reguliert [30,59]. Möglicherweise bindet der Rezeptor durch allosterische Kräfte an diese Sequenzen der DNA und reguliert dadurch die Transkription.

1.1.3. Wirkungsmechanismus des Androgenrezeptors

Androgene und anabole Steroide werden von Transportproteinen zur Zielzelle transportiert. Im Zielgewebe kommt es zu einer Dissoziation des Liganden vom Transportprotein und zur Diffusion ins Zytoplasma der Zielzelle.

Der nicht-ligandengebundene Androgenrezeptor ist hochaffin für Androgene. Dies wird hervorgerufen durch ein heat-shock-protein-90 (Hitzeschockprotein-90, HSP-90), welches an der Liganden-Bindungsdomäne gebunden ist und den Androgenrezeptor in der Konformation verändert [23] und dadurch die Androgenbindung erleichtert wird. Die Bindung des HSP90 an den Rezeptor ist in-vitro abhängig der Struktur der Liganden-Bindungsdomäne [3].

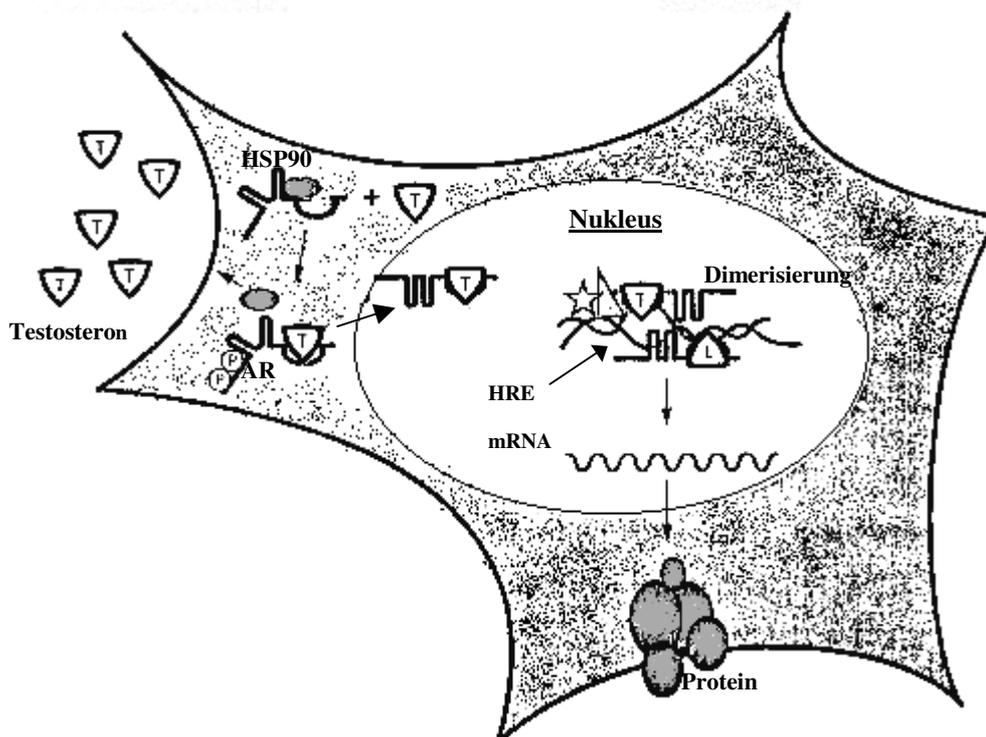


Abb. 1-2: Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus des Androgenrezeptors (umgezeichnet nach Quigley CA, „The androgen receptor: Physiology and pathophysiology“ in Nieschlag E und Behre HM „Testosterone“, Springer-Verlag, 2. Auflage, 1998; Erläuterung siehe Text)

Durch elektrostatische Kräfte und anschließende Konformationsänderungen kommt es zur Bindung der Androgene an die Liganden-Bindungsdomäne [92,93] des Rezeptors. Dieser Mechanismus ist ligandenspezifisch. So konnten Matias et al. [54] zeigen, dass die Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor durch unterschiedliche Wechselwirkungen hervorgerufen werden, wodurch ligandenabhängig verschiedene Aktivitäten resultieren.

Insgesamt ist die Bindung von Liganden an die Liganden-Bindungsdomäne sehr komplex. Durch Änderung der Proteinstruktur hervorgerufen durch Punktmutationen an der

Liganden-Bindungsdomäne wurde das Bindungsmuster und daraus resultierend das Aktivitätsprofil der einzelnen Liganden verändert [55]. Teilweise konnte ein Ligand nicht mehr an den Rezeptor binden, teilweise resultierte eine schnellere Dissoziation des Liganden vom Rezeptor.

Das nuclear-targeting-signal (Kern-Ziel-Signal) des Rezeptors vermittelt ligandenspezifisch [44] die Verlagerung des ligandengebundenen Rezeptors in den Zellkern, in dem es durch Konformationsänderungen zu einer Dimer-Bildung zwischen zwei Rezeptoren kommt. Diese lagern sich in einer antiparallelen Orientierung aneinander an, wobei sich die Aminoterminal-Domäne des einen Rezeptors mit der Liganden-Bindungsdomäne des anderen Rezeptors und umgekehrt verbindet [17].

Bei der Dimerisierung der Rezeptoren handelt es sich meist um zwei gleiche Rezeptoren, eine Homodimerbildung. Eine Heterodimerbildung zwischen zwei unterschiedlichen Steroidrezeptoren wurde ebenfalls beschrieben [12,61]. Durch solch eine Konstellation werden unterschiedliche Effekte durch die zwei verschiedenen Rezeptoren hervorgerufen. Schließlich binden die aktivierten Rezeptoren mit der DNA-Bindungsdomäne an die HRE's der DNA und leiten die Transkription ein. Okuno et al. [61] konnten eine Veränderung der DNA-Bindungsaffinität des Rezeptors bei speziellen HRE's zeigen, je nachdem ob die Rezeptoren als Homo- oder Heterodimer vorlagen.

Cofaktoren der Transkription beeinflussen als sekundäre Transkriptionsfaktoren die Transkription und damit die Genregulation [6,42,56]. Dabei handelt es sich um Proteine, die mit spezifischen Basensequenzen innerhalb der Promoterregion interagieren. Durch eine Brückenbildung des ligandengebundenen Steroidhormonrezeptors an die DNA oder einen Chromatinumbau resultiert eine differentielle Beeinflussung der Transkription [42]. Aus der Interaktion der Cofaktoren mit dem Rezeptor kann eine Konformationsänderung der Liganden-Bindungsdomäne des Rezeptorproteins resultieren [10]. Diese Konformationsänderung ist Steroidhormonrezeptor spezifisch [29] und führt zu Wechselwirkungen mit weiteren Transkriptionsfaktoren.

1.2. Physiologie der Androgenwirkung

Androgene sind essentiell für die Differenzierung der männlichen Geschlechtsorgane. In der 7. Bis 12. Schwangerschaftswoche kommt es zu einer Virilisierung des äußeren Genitales sowie zur Ausbildung von Prostata und Samenblase.

Zwischen 6 und 8 mg Testosteron werden täglich im erwachsenen männlichen Organismus synthetisiert, davon ungefähr 95% in den Leydig'schen Zwischenzellen des Hodens. Daneben wird ein geringer Anteil des zirkulierenden Testosterons in der Zona reticularis der Nebennierenrinde synthetisiert [14]. Hier ist das Dehydroepiandrosteron (DHEA), ein wenig potentes Androgen, das quantitativ am stärksten produzierte Androgen. Im weiblichen Organismus werden die Androgene hauptsächlich in der Nebennierenrinde und zu einem geringen Anteil im Ovar gebildet.

Die Synthese der Androgene im Hoden wird vermittelt über das Hypothalamus-Hypophysen-System. Im Hypothalamus wird Gonadotropinfreisetzendes-Hormon (GnRH) synthetisiert, welches über den Portalkreislauf der Hypophyse in den Hypophysenvorderlappen transportiert wird. Hier stimuliert es die gonadotropen-basophilen Zellen, Gonadotropine (LH und FSH) zu synthetisieren. LH, auch interstitial-cell-stimulating-hormone (ICSH) genannt, induziert das Wachstum der Leydig'schen Zwischenzellen und die Testosteronbiosynthese. FSH wirkt unter anderem regulierend auf die Spermio-genese.

Als Substrat für die Synthese der Steroidhormone dient Cholesterin, welches über verschiedene biochemische Zwischenprodukte letztlich in Testosteron umgewandelt wird. Einen Überblick über die wichtigsten Syntheseschritte zeigt Abbildung 1-3.

Testosteron selbst wird über die 5α -Reduktase in das wesentlich aktivere Dihydrotestosteron umgewandelt. Von dem Enzym 5α -Reduktase konnten zwei verschiedene Isoenzyme nachgewiesen werden. Typ II kommt vor allem im peripheren Zielgewebe des inneren und äußeren Genitales, wie Prostata, Samenblase oder Corpora cavernosa, vor. Für das Isoenzym Typ I (5α -Reduktase-I) konnte bisher noch keine eindeutige Rolle in der männlichen Sexualdifferenzierung beschrieben werden. So erscheinen männliche Mäuse mit einem 5α -Reduktase-Typ-I-Mangel phänotypisch männlich [85]. Die 5α -Reduktase-I konnte bisher unter anderem in Hautanhangsgewebe [78] oder in in-vitro-Versuchen in humanen osteoblasten-ähnlichen Zellen [40] in einem deutlich stärkeren Ausmaß als die 5α -Reduktase-II nachgewiesen werden.

Mahendroo et al. [52] konnten zeigen, dass bei weiblichen Mäusen mit einem 5α -Reduktase-I-Mangel erhöhte Estradiol-Spiegel, durch eine verstärkte Metabolisierung der

Androgene zu Östrogenen (siehe Abbildung 1-3), nachweisbar waren [34]. Daraus resultierte eine angestiegene Abortrate. Durch Metabolisierung von Testosteron zu DHT durch die 5 α -Reduktase-I könnte somit ein Schutz vor einem Östrogen-Exzess mit erhöhter Abortrate postuliert werden.

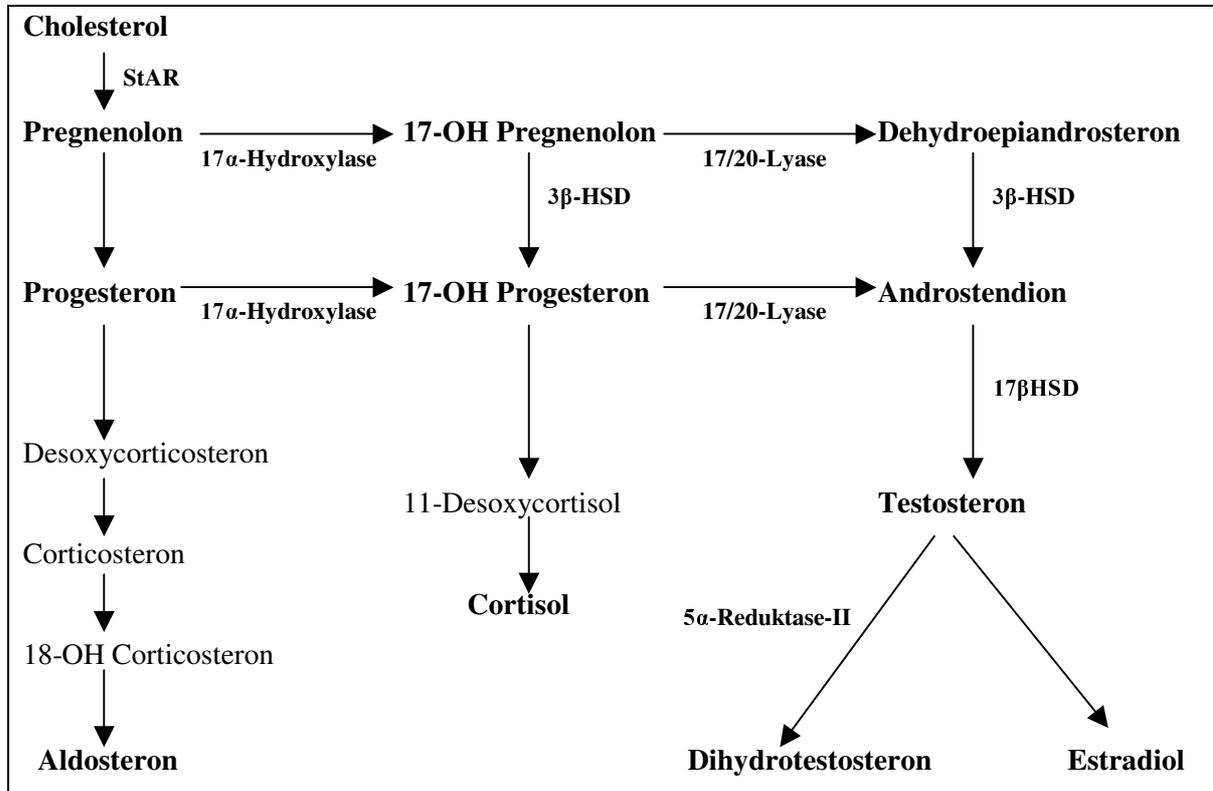


Abb. 1-3: Synthese- und Metabolisierungswege der physiologischen Androgene; Angabe der wichtigsten Enzyme

DHT wird durch die 3 α /3 β -Dehydrogenase zu 5 α -Androstandiol metabolisiert und dadurch inaktiviert.

Neben der Umwandlung in DHT kann Testosteron ebenfalls durch 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (17 β -HSD) wieder in sein eigenes Substrat Androstendion umgewandelt werden [26]. Ein weiterer aktiver Metabolit des Testosteron ist das 17 β -Estradiol. Dieses wird durch Aromatisierung des Testosterons durch die Cytochrom-P450-Aromatase (p450arom), welches – neben Gonaden und Leber – auch in Plazenta, Fettgewebe, Gehirn und Haarfollikeln vorhanden ist, erzielt.

Daraus kann geschlossen werden, dass das Enzymmuster des jeweiligen Gewebes die Aktivität der verschiedenen Androgene und Östrogene moduliert.

Neben diesen aktiven gibt es zusätzlich die inaktiven Metaboliten, vor allem Androsteron und Etiocholanolon.

1.3. Differentielle Androgenwirkungen

1.3.1. Dihydrotestosteron

Die Ausbildung des äußeren Genitales und das Wachstum der Prostata wird wesentlich über DHT vermittelt [11,36,83]. Durch die 5α -Reduktase wird Testosteron in einem gewebespezifischen Ausmaß in das aktivere DHT metabolisiert.

Bei einigen Patienten, bei denen das äußere Genitale nicht phänotypisch männlich ausgebildet ist, konnte ein Mangel oder ein völliges Fehlen der 5α -Reduktase-II nachgewiesen werden. Diese Patienten weisen bei einem 46,XY-Karyotyp eine normale Entwicklung des Wolff'schen Ganges, des Nebenhodenganges und der Samenblase auf. Andererseits liegt eine deutliche Virilisierungsstörung mit einem oftmals phänotypischen äußeren weiblichen Genitale vor. Zur Virilisierung dieser Patienten kommt es meist während der Pubertät, da eine normale Testosteronsynthese in den Hoden vorliegt und DHT durch die - in der Pubertät ebenfalls relevante - 5α -Reduktase-I synthetisiert werden kann.

Daraus lässt sich eine Beteiligung von DHT an der Entwicklung des äußeren Genitales herleiten.

1.3.2. Testosteron und Testosteronvorstufen

In der Nebenniere und im Hodengewebe katalysiert die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β -HSD) die Umwandlung von Dehydroepiandrosteron in Androstendion, welches weiter unter Katalysierung durch die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ III (17β -HSD) in Testosteron [2,34] umgewandelt wird (siehe Abbildung 1-3).

Bei Patienten mit einem Defekt der 3β -HSD oder der 17β -HSD liegen hohe Spiegel an Androstendion und DHEA, jedoch verminderte Spiegel bis zu einem vollständigen Mangel an Testosteron vor. Phänotypisch weisen diese Patienten ein weibliches äußeres Genitale [34,35] bei einem 46,XY-Chromosomensatz auf. Dennoch kommt es zu einer Ausbildung der Derivate des Wolff'schen Ganges [11,57,84,87], was unter anderem durch eine Wirkung von Testosteronvorstufen auf diese Strukturen erklärt werden könnte. Für die

ausbleibende Virilisierung während der Pubertät könnte das fehlende Testosteron maßgeblich sein.

Aus diesen Erfahrungen kann postuliert werden, dass die Ausbildung des inneren Genitales über Testosteron und seine Vorstufen moduliert wird.

1.3.3. Weitere Beispiele androgener Wirkungen

Neben den oben genannten Effekten auf die Differenzierung des Genitales spielen Androgene ebenfalls eine wichtige Rolle im sexuellen Verhalten des Mannes. So wirken sich Androgene wahrscheinlich stimulierend auf sexuelle Phantasien, nächtliche Erektionen, sexuelle Aktivitäten sowie Orgasmen aus [53,88].

Bei der Ausprägung des männlichen Behaarungsmusters gibt es verschiedene Wirkungen, die durch Androgene vermittelt werden. Es kommt im Laufe der Pubertät zu Bartwuchs, einer verstärkten Behaarung des Stammes und der typischen rautenförmigen Geschlechtsbehaarung. Daneben spielen Androgene bei der Ausbildung einer Stirnglatze im späten Lebensalter des Mannes eine Rolle. Interessanterweise ist in Haarfollikelzellen die Konzentration an DHT größer als die des Testosterons.

1.4. Anabole Steroide

Die in dieser Arbeit untersuchten Anabolika gehören als synthetische Derivate der steroidalen Androgene zur Gruppe der Steroidhormone. Aufgrund ihrer chemischen Struktur können anabole Steroide grob in zwei Gruppen unterteilt werden, 17 α -alkylierte Derivate wie zum Beispiel Stanozolol und 19-Nor-Derivate (z.B. Nandrolon) [8,62]. Durch zum Teil unterschiedliche Wirkungen ist diese Unterteilung auch klinisch relevant.

Anabolika haben ebenfalls virilisierende und anabole Effekte. Sie üben über eine positive Stickstoffbilanz eine proteinaufbauende Wirkung aus [48]. Eine daraus resultierende mögliche Zunahme der Muskelmasse und –kraft durch kontraktile Proteine wird unterschiedlich bewertet [24,81,82].

Zu einer Steigerung der Erythropoese kann es über einen positiven Effekt auf das blutbildende Knochenmark und einer vermehrten Sekretion des Erythropoetins in der Niere kommen. Auf das Längenwachstum im heranwachsenden Organismus wirken sich anabole Steroide positiv aus [49]. Möglicherweise wird dies durch einen leicht verzögerten Epiphysenfugenschluss und damit das Ende des Knochenlängenwachstums hervorgerufen.

Fiegel und Kulhanek [25] sprechen dagegen von der Gefahr der reduzierten Endgröße durch frühzeitige und beschleunigte Knochenreifung mit vorzeitigem Epiphysenfugenschluss.

Eine weitere Wirkung ist zudem die Steigerung der Mineralisierung von Knochen [50]. Durch Untersuchungen mit verschiedenen anabolen Steroiden konnte ein positiver Effekt auf die „knochenaufbauenden“ Osteoblasten gezeigt werden. Daraus resultierte vor allem eine Zunahme der Kortikalis der Knochen.

Zu den anabolen Effekten gehört ebenfalls eine dunklere, tiefere Stimme, die durch ein verstärktes Kehlkopfwachstum und eine Zunahme der Muskelfasern des Musculus vocalis hervorgerufen wird.

Eine klinische Wirkung üben Anabolika über ihre fibrinolytische Aktivität aus [74]. Bei ansteigenden Testosteronkonzentrationen sinken die Fibrinogen-, Protein C- und Protein S-Konzentrationen im Plasma, wohingegen der Antithrombin-III-Spiegel ansteigt [28]. Dennoch wurde auch eine verstärkte Plättchenaggregation bei Gabe von Androgenen beobachtet [91]. Andere Arbeiten beschreiben eine verstärkte Kollagensynthese durch Stanazolol [22].

Bekannt geworden sind anabole Steroide in letzter Zeit durch den Missbrauch im Leistungs- und Freizeitsport und bei der Kälbermast [8,25,46,71].

Daneben gibt es aber auch eine Reihe medizinischer Indikationen, die aus ihren Wirkungen ersichtlich werden. So wurden Anabolika bei stark kachektischen Patienten wie chronisch kranken Patienten, Tumorpatienten, Verbrennungsoptionen eingesetzt. Hierbei wird vor allem die proteinanabole Wirkung ausgenutzt. Ebenso können einige Anämie-Patienten mit einer verstärkten Erythropoese unterstützt werden.

Die Wirkungen auf die Knochen können bei Osteoporose-Patienten ausgenutzt werden. Das vermehrte Längenwachstum bei Gabe von anabolen Steroiden ist bei Patientinnen mit dem Ullrich-Turner-Syndrom beobachtet worden, bei denen im Durchschnitt eine um ca. fünf Zentimeter höhere Endgröße beschrieben wurde [25,49].

Der Antagonismus zu Östrogen kann bei Mammakarzinomen ausgenutzt werden, die einen östrogenrezeptor-positiven Tumor haben, da Anabolika Östrogenwirkungen antagonisieren können, aber keine starken androgenen Effekte hervorrufen.

Neben diesen Indikationen gibt es eine Reihe von Krankheiten, bei denen Anabolika als Adjuvans gegeben werden können. Hierzu zählen chronische Lebererkrankungen mit starker Hypoproteinämie und das akute oder chronische Nierenversagen, bei denen durch

Anabolika Proteinverlust und Proteinkatabolismus reduziert werden können. Der Mangel des Proteins C₁-Esterase-Inhibitor beim Angioneurotischen-Syndrom kann zum Teil durch Anabolika reduziert werden.

Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen stehen vor allem die oben beschriebenen virilisierenden Wirkungen im Vordergrund, die in einem gewissen Maße immer vorhanden sind.

Vor der Pubertät kann sich im männlichen Organismus durch Therapie mit anabolen Steroiden ein Hypergenitalismus als Ausdruck einer Pubertas praecox entwickeln. Nach der Pubertät bewirken Anabolika durch reduzierte FSH-Spiegel eine Abnahme der Hodengröße und Oligo-/Azoospermie [9,25]. Im weiblichen Organismus kann eine Klitorishypertrophie, ein Hirsutismus und eine Amenorrhoe resultieren.

Bei der Behandlung mit anabolen Steroiden (vor allem mit 17 α -alkylierten Derivaten) zeigte sich eine reversible hepatotoxische Wirkung vor allem bei Patienten mit präexistenten Lebererkrankungen [8,25].

1.5. Differenzierung zwischen androgenen und anabolen Steroiden anhand biologischer Wirkungen

Bereits seit langem versucht man, virilisierende von anabolen Wirkungen zu differenzieren. Eisenberg und Gordan haben bereits 1950 [20] die Effekte von Androgenen auf Samenblase und Musculus levator ani (MLA) bei der kastrierten infantilen Ratte untersucht. Die Wirkung auf die Samenblase, als typisches männliches Geschlechtsorgan, entspricht dabei der androgenen Wirkung. Demgegenüber spiegelt die myotrophe Wirkung auf den MLA den anabolen Effekt wieder.

Um die Steroide direkt in-vivo differenzieren zu können, wurde die Stickstoffretention durch Anabolika gemessen. Die positive Stickstoffbilanz ist notwendig für den protein-anabolen Effekt. Der androgene Effekt konnte demgegenüber über die Menge und den Fruktosegehalt des Ejakulates bestimmt werden.

Andere Untersuchungen haben die anabolen Wirkungen anhand der Zunahme des Körpergewichtes, die Wirkungen auf Muskulatur, auf den Musculus temporalis des Meerschweinchens, auf das Nierengewicht und auf die Aufnahme radioaktiv-markierter Aminoisobuttersäure bestimmt.

Bereits 1966 wurde die lange Zeit geltende [94] Bestimmung nach Overbeek [63] eingeführt, bei der die Wirkungen auf den MLA und auf die Samenblase bei infantilen kastrierten Ratten gemessen wird. Als Standardmedikament wird als i.v.-Präparat das Testosteron-Phenylpropionat und bei oraler Medikation 17α -Methyltestosteron verwendet. Die jeweils zu untersuchenden Substanzen werden anschließend zu diesen Standardpräparaten in Relation gesetzt.

Aus diesen Ergebnissen konnte für jedes untersuchte Steroidhormon die sogenannte anabol/androgene-Ratio (Q-Wert) angegeben werden, die das Verhältnis der anabolen zur virilisierenden Wirkung angibt.

1.6. Mögliche Wirkungsmechanismen anaboler Steroide

Steroide können anhand ihrer biologischen Wirkungen in überwiegend virilisierende oder anabole Substanzen unterteilt werden. Nur wenige Untersuchungen haben sich mit den Ursachen für diese differentiellen biologischen Effekte in-vivo beschäftigt.

Chen et al. [12] haben gezeigt, dass anabole Androgene partiell an den Glukokortikoidrezeptor binden. Die physiologisch katabolen Effekte der Glukokortikoide können durch diese Bindung kompetitiv aufgehoben werden, so dass letztendlich eine anabole Stoffwechsellage resultiert. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt die Arbeitsgruppe Ellis et al. [21], die die Bindung von Stanozolol an den Progesteron-Rezeptor beschrieben haben.

Weiterhin kann es zu einer Heterodimerisierung des ligandengebundenen Androgenrezeptors mit einem Glukokortikoidrezeptor kommen [12]. Dabei werden die biologischen Effekte spezifisch durch beide Rezeptoren vermittelt. Durch eine veränderte Bindungsaffinität eines heterodimerisierten Rezeptors an spezifische DNA-Sequenzen kann eine differentielle Aktivität resultieren [61].

Eine andere Ursache der Differenzierung zwischen anabol und virilisierend zeigt die Gewebeverteilung der 5α -Reduktase. Die 5α -Reduktase-II wird vorwiegend im äußeren Genitale, in der Prostata und in der Samenblase exprimiert. Nahezu nicht exprimiert wird sie dagegen im Muskelgewebe.

Von Tóth und Zakár wurde der Einfluss der 5α -Reduktase-II auf die Effekte von Testosteron und Nandrolon als auch ihren jeweiligen Metaboliten untersucht [86].

Nandrolon hat zwar eine höhere Affinität zur 5 α -Reduktase-II als Testosteron, das dabei entstandene Dihydrondrolon ist gegenüber DHT aber ein inaktiver Metabolit, der keine Wirkungen am Androgenrezeptor hervorrufen kann.

Ein weiterer möglicher anaboler Wirkungsmechanismus wurde von Abu-Shakra und Nachtmann [1] diskutiert. Ihre Versuche legen nahe, dass es rezeptorunabhängige Mechanismen geben könnte, was vor allem bei hohen Dosen der anabolen Steroide beobachtet werden konnte. Durch Antagonisten am Androgenrezeptor gelang es nicht, die Wirkungen von Stanozolol zu antagonisieren, was durch einen rezeptorunabhängigen Wirkungsmechanismus von Stanozolol erklärt werden könnte. Ebenso verhält es sich bei den Ergebnissen von Boada et al. [7]. Diese Arbeitsgruppe konnte Bindungskomplexe für 17 α -alkylierte-Steroide, also zum Beispiel Stanozolol, in Mikrosomen von Lebergewebe und Mammakarzinom-Zellen nachweisen [7,51]. Dieser spezifische Bindungskomplex ist ein 118kDa schweres integrales Protein, das an das Endoplasmatische Retikulum in Leber- und Mammakarzinom-Zellen gebunden ist [51].

Kempainen et al. [45] und Roselli [77] untersuchten die Bindungsaffinitäten verschiedener Steroide an den Androgenrezeptor. Sie konnten zeigen, dass anabole Steroide meist mit unterschiedlicher Affinität mit dem Androgenrezeptor interagieren. Diese Ergebnisse zeigen eine Möglichkeit für differentielle anabole Effekte der verschiedenen Steroide.

Die spezifische Wirkung von Liganden an Steroidhormonrezeptoren zeigt sich in einem charakteristischen Wechsel der Konformation des Rezeptors nach Bindung des Liganden. Aus der Bindung von Methyltrienolon an den Androgenrezeptor resultiert ein Konformationswechsel der Liganden-Bindungs-Domäne [54,66,90]. Dieser Vorgang ist ligandenabhängig und entsteht durch unterschiedliche, spezifische Interaktionen des Liganden mit definierten Aminosäureresten des Rezeptors. Dadurch wird ein spezifisches Muster von van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen erzielt.

Trotz der relativ hohen Sequenzhomogenität der einzelnen Steroidrezeptoren weisen sie jeweils einen speziellen Aufbau auf. Hieraus könnten sich die unterschiedlich starken Bindungen der einzelnen Liganden an verschiedene Rezeptoren mit spezifischen biologischen Effekten erklären.

Hsiao et al. haben die unterschiedlichen Wirkungen von Testosteron und Dihydrotestosteron in-vitro untersucht [39]. Sie konnten nachweisen, dass bei Versuchen mit drei strukturell unterschiedlichen Reportergenen mit differierenden ARE's unterschiedlich starke Transaktivierungen durch die beiden Hormone hervorgerufen wurden. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten sie, dass die Wirkungen der physiologischen Androgene über spezifische Wechselwirkungen des Rezeptors mit verschiedenen DNA-Zielsequenzen differenziert werden könnten.

Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass androgen-spezifische Wirkungen nicht nur durch *quantitative* Unterschiede hinsichtlich der Rezeptoraktivierung bedingt sein könnten. Darüber hinaus könnten unterschiedliche biologische Wirkungen strukturell unterschiedlicher Androgene, wie z.B. adrenale Androgene aber auch synthetischer Androgene mit anabolen Wirkungen sowie virilisierend wirkender Androgene jeweils durch ein *qualitativ* unterschiedliches Muster im Profil aktivierter Zielgene bedingt sein.

1.7. Beschreibung genregulatorischer Elemente

Die Erbinformation eukaryontischer Zellen ist in Form doppelsträngiger DNA im Zellkern kodiert. Durch Replikation werden diese Informationen an die nachfolgenden Generationen weitergegeben. Als Transkription wird das Abschreiben von DNA in RNA bezeichnet. Während der Translation werden schließlich entsprechende Proteine synthetisiert. Durch diesem Mechanismus wird die genetische Erbinformation umgesetzt.

Promotoren sind spezifische DNA-Sequenzen mit transkriptions-regulierender Funktion. Nach Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren, kommt es zum Aufbau einer basalen Transkriptionsmaschinerie, die unter anderem zur Assoziation der RNA-Polymerase-II führt. Durch diesen Mechanismus wird die Transkription spezifischer DNA-Abschnitte erzielt.

Die Regulation der Transkription wird außerdem über andere, die Transkription potentiell verstärkende Faktoren erzielt, den sogenannten Enhancern (Verstärkern). Enhancer befinden sich einige hundert Basenpaare oberhalb der Promoterregion und können nach Bindung spezifischer Proteine die Transkription beeinflussen. Unter anderem binden die ligandengebundenen Steroidhormonrezeptoren als transkriptionsregulierende Proteine an die HRE's, die als Enhancer der Transkription fungieren [80].

Die Untersuchung der Transkriptionsregulation kann *in vitro* mit Hilfe von Reporterassays erfolgen. Dabei werden synthetische DNA-Abschnitte in Form von Plasmid-DNA, in eukaryontische Zellen durch den Vorgang der transienten Transfektion eingeführt. Bei Plasmiden handelt es sich um extrachromosomale DNA-Elemente, die in ringförmiger, doppelsträngiger Form vorliegen.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Ansatz erfolgte stets eine Kotransfektion, die gleichzeitige Transfektion mehrerer Plasmide. Sie kodieren einerseits für den humanen Androgenrezeptor, andererseits stellen sie die unterschiedlichen Reporter Gene dar, deren Expression durch verschiedene, androgen-regulierte Promoter gesteuert wird. Weiterhin wurden zusätzliche, für die Normalisierung der Ergebnisse erforderliche Plasmide, kotransfiziert.

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgt in transformierten Bakterien. Damit stets die richtigen Bakterienstämme zur Vermehrung kommen, enthalten die Plasmide ein Ampicillin-Resistenzgen. Dadurch können sie mittels eines ampicillinhaltigen Nährmediums selektioniert werden.

Für den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsaufbau wurden verschiedene Reporter Gene verwendet. Diese Reporter Gene wurden so ausgewählt, dass sie einen deutlich unterschiedlichen Aufbau der molekularen Struktur ihrer androgen-regulierten Promoterregionen aufwiesen. Dies zeigt sich unter anderem in dem Vorkommen unterschiedlicher HRE's sowie unterschiedlicher Bindungsstellen für weitere Kofaktoren. Wie unter 1.1.2. beschrieben sind HRE's nicht grundsätzlich spezifisch für einen einzigen ligandengebundenen Rezeptor [13,30,79,89]. Das MMTV-luc-Reporter Gen setzt sich unter anderem aus vier verschiedenen glukokortikoidresponsiblen Elementen (GRE's) zusammen, an die auch der aktivierte Androgenrezeptor binden kann. Je nach GRE unterscheidet sich die Bindungsaffinität. Beim GRE1 ist sie am stärksten für den Progesteronrezeptor und am niedrigsten für den Androgenrezeptor. Dies ist bei GRE3 genau umgekehrt [32].

Die Struktur der einzelnen, verwendeten Promoter ist schematisch im Kapitel „Material und Methoden“ dargestellt (Abb. 2-2, 2-3, 2-4). Damit stellen die untersuchten Reporter Gene ein artifiziell generiertes Modell für potentiell unterschiedliche, natürliche androgen-regulierte Gene dar.

Alle verwendeten, androgen-regulierten Reportergene exprimieren die Firefly-Luziferase („Glühwürmchen-Luziferase“), sodass ihre Aktivierung im Luziferaseassays gemessen werden kann.

1.8. Prinzip einer Transaktivierungsmessung

Die Ligand-Rezeptor-Interaktion, die zur Transkription eines androgen-regulierten Genes führt, kann in in-vitro-Experimenten mit Hilfe eines Reporterassays analysiert werden.

Durch Transfektion wird die Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen integriert. Das Androgenrezeptorplasmid führt zur Expression des Androgenrezeptorproteins. Die hinzugefügten Hormone binden und aktivieren den Rezeptor. Der dabei entstandene Ligand-Rezeptor-Komplex kann mit den hormonresponsiblen Elementen des Reporterplasmids interagieren. Dadurch kommt es zur Transkription und schließlich Translation der auf dem Reporter gen kodierte Luziferase. Ihre Aktivität kann durch hinzugefügte Substrate quantifiziert werden und reflektiert somit die Aktivität der dargestellten Signaltransduktionskaskade. Der Mechanismus dieser Kaskade ist in Abbildung 1-4 schematisch dargestellt.

Da die Messergebnisse von Transfektionsexperimenten von der Menge der eingebrachten Plasmid-DNA abhängt, ist eine Kontrolle der Transfektionseffizienz erforderlich. Diese kann mit Hilfe eines speziellen Plasmids gemessen werden, das nicht-androgen-reguliert exprimiert wird (pRL-SV40-Plasmid). Dieses Plasmid kodiert für die Renilla-Luziferase. Nach Umsetzung des hinzugefügten Substrates, Renilla-Luziferin, kann das Produkt spezifisch quantitativ erfasst und von der Firefly-Luziferase eindeutig unterschieden werden.

Damit während der verschiedenen Versuche mit unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen konstante Versuchsbedingungen gewährleistet werden können, kann eine konstante Plasmidmenge stets durch Hinzufügen einer entsprechenden Menge eines Carrierplasmids (Füllplasmids) erzielt werden.

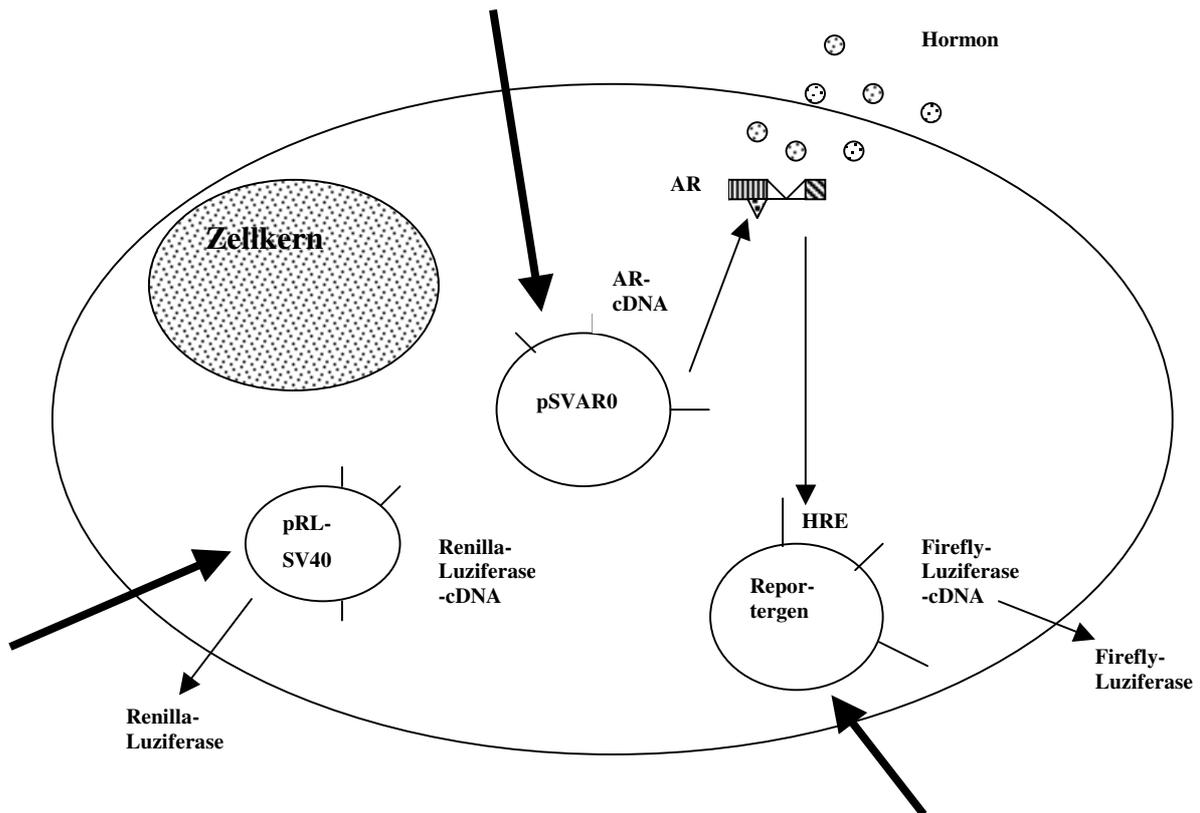


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskade
 (Integration der Plasmide (dicke Pfeile); Bindung der Liganden an den exprimierten Androgenrezeptor; Interaktion des liganden-gebundenen AR mit den HRE's; Bildung der Firefly- und Renilla-Luziferase)

1.9. Fragestellung

Bis heute ist nicht geklärt, welcher Mechanismus dazu führt, dass einerseits präferentiell virilisierende und andererseits präferentiell anabole biologische Wirkungen durch strukturell offensichtlich unterschiedliche Androgene ausgelöst werden können. Für einige Steroide wurde bislang überhaupt noch nicht nachgewiesen, ob sie den Androgenrezeptormechanismus spezifisch aktivieren können.

In der vorliegenden Arbeit sollte die grundsätzliche Hypothese experimentell untersucht werden, ob unterschiedliche, in vivo beobachtete biologische Wirkungen anaboler und virilisierender Androgene über die Aktivierung liganden-spezifischer Profile auf Ebene potentieller androgen-regulierter Zielgene erklärt werden könnten.

Insbesondere sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) Führen insbesondere anabole und adrenale Androgene zu einer Aktivierung des Androgenrezeptors?
- 2.) Welche quantitativen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen androgenen (Testosteron, Dihydrotestosteron, Methyltrienolon), anabolen (Stanozolol, Oxandrolon, Nandrolon) und adrenalen (Androstendion, Dehydroepiandrosteron) Liganden lassen sich hinsichtlich der Androgenrezeptoraktivierung im Reportermodell darstellen?
- 3.) Gibt es Unterschiede in der Androgenrezeptoraktivierung in Abhängigkeit von der Verwendung strukturell differierender Reportergene (MMTV-luc, pRE₂-TATA-luc, GRE-OCT-luc) als Modell für unterschiedliche natürliche Zielgene?
- 4.) Lassen sich aus den erhobenen Reporteraktivierungsdaten unterschiedliche Aktivierungsprofile kategorisieren und wie unterscheiden sich die verwendeten androgen, anabolen und andrenalen Liganden diesbezüglich?

2. Material und Methoden

2.1. Transfektionsuntersuchungen

2.1.1. Material zur Züchtung der Zellen

2.1.1.1. Chinesische-Hamstero-var-Zellen

Die Versuche wurden an Chinesischen-Hamstero-var-Zellen (CHO-Zellen) der Firma Deutsche-Sammlung-von-Mikroorganismen-und-Zellkulturen GmbH durchgeführt. Es wurden Zellen der Zelllinie CHO-K1 in Passagen von 4 bis 20 verwandt.

CHO-Zellen sind charakterisiert durch ein schnelles Wachstum mit einer Verdopplungszeit von 24 Stunden und einer einfachen Kultivierung (37°C bei 5%CO₂ mit DMEM^{10%-FCS}-Medium). Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von ca. -200°C in 70% Medium, 20% Fetales Kälberserum (FCS) und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich) aufbewahrt. Für die Versuche wurden die Zellen in einem Wärmebecken auf 37°C erwärmt und die Zellsuspension (2ml) mit 8ml DMEM^{10%-FCS} versetzt. Nach Zentrifugieren wurden die Zellen in ungefähr 25ml DMEM^{10%-FCS} in T175-Flaschen der Firma Sarstedt bei 37°C im Wärmeschrank für drei bis vier Tage gezüchtet. Dies entsprach der zweiten Passage der Zellen.

2.1.1.2. Dulbecco´s-Modified-Eagles-Medium

Als Kulturmedium für die Zellkultur wurde Dulbecco´s-Modified-Eagles-Medium (Dulbecco´s-modifiziertes-Adlermedium = DMEM) der Firma Sigma-Aldrich verwandt (siehe Tabelle 2-1); [31,65]. Zur Kontaminationsprophylaxe wurde eine Mischung aus Penizillin und Streptomycin der Firma Boehringer und Fetales Kälberserum (FCS) der Firma PAA-Laboratories GmbH, (siehe Tabelle 2-2) zugefügt.

Um einen Einfluss von eventuell im FCS enthaltenen geringen Mengen von Steroiden ausschließen zu können, wurde für die Versuche das DMEM mit steroidfreiem FCS versetzt (DCC-FCS), siehe Tabelle 2-3.

Substanz	Menge
DMEM-Nutrient Mixture F-12 HAM	Trockensubstanz für 5,0 l Aqua dest.
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃), Serva	6,0 g
Aqua dest.	auffüllen auf 5,0 l

Tab. 2-1: Zusammensetzung des verwendeten Mediums

Substanz	Menge
angesetztes DME-Medium (Tab. 2-1)	450 ml
FCS	50 ml
Penizillin/Streptomycin (10000 u/ml + 10000 µg/ml)	5,8 ml

Tab. 2-2: Zusammensetzung des Kulturmediums (DMEM^{10%-FCS})

Substanz	Menge
angesetztes DME-Medium (Tab. 2-1)	450 ml
DCC-FCS (Tab. 2-4)	50 ml
Penizillin/Streptomycin (10000 u/ml + 10000 µg/ml)	5,8 ml

Tab. 2-3: Zusammensetzung des Versuchsmediums (DMEM^{10%-DCC-FCS})

Für die Herstellung des DCC-FCS' wurde unter anderem Aktivkohle benutzt. Dadurch konnten möglicherweise im FCS enthaltenen Verunreinigungen, wie zum Beispiel Hormone, adsorbiert werden (siehe Tabelle 2-4). Am Ende wurde das DCC-FCS sterilfiltriert, bei -18°C gelagert und für den Gebrauch auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Substanz	Menge	Bezugsquelle
Aktivkohle (Norit A [®])	5,0 g	Serva
Dextran	0,5 g	Sigma-Aldrich
Tris-HCL-Puffer (10nM) pH 7,4	200 ml	Sigma-Aldrich

Tab. 2-4: Zusammensetzung der DCC-Lösung bezogen auf 500ml FCS

2.1.1.3. PBS

Der verwendete Puffer PBS (Salz-Phosphat-Puffer) diente zum Spülen der Zellen. Dafür wurde er auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt, der mittels eines pH-Meters SenTix-21 der Firma wtw ermittelt wurde. Die Zusammensetzung dieses Puffers ist

in Tabelle 2-5 wiedergegeben. Die Lagerung erfolgte bei 4°C, demgegenüber wurde der PBS im Versuch aufgewärmt mit einer Temperatur von 37°C eingesetzt.

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Natriumchlorid (NaCl)	8,0 g	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	0,2 g	
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2 g	
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	1,4 g	
Aqua dest.	1,0 l	

Tab. 2-5 Zusammensetzung des PBS

2.1.2. Beschreibung der Plasmide

2.1.2.1. Androgenrezeptor-Expressionsplasmid

Der Androgenrezeptor ist auf dem pSVAR0-Plasmid kodiert (Brinkmann et al. 1989). pSVAR0 ist ein 7219 bp großes Plasmid, das neben der hAR-DNA zusätzlich den „early promoter SV40“ (enhancer-Region) und das „rabbit β-globin poly-A-signal“ (Signale zur Beendigung der Transkription und zur Polyadenylierung der RNA zur Stabilisierung) enthält. Wichtig für die Replikation des Plasmids im Escherichia coli-Stamm ist das ORI-Element, welches den Ursprung (origin) für die Replikation in E. coli Zellen darstellt, als auch das Amp-Gen, das für die Ampicillin-Resistenz der transformierten Bakterien verantwortlich ist.

Das pSVAR0-Plasmid war ein Geschenk von Dr. A.O. Brinkmann (Erasmus Universität Rotterdam, Niederlande).

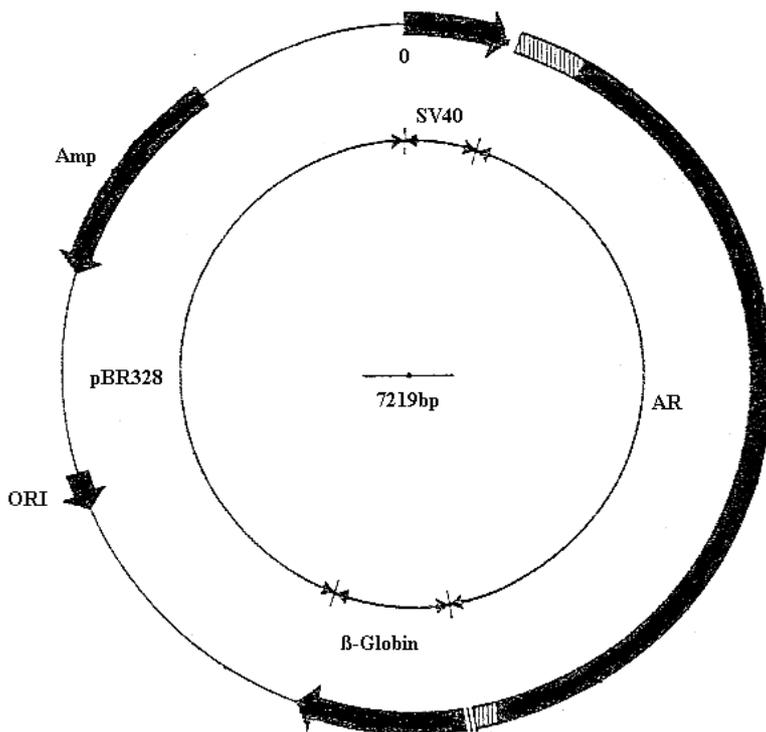


Abb. 2-1: Schematische Darstellung des pSVAR0-Plasmids
(nach Brinkmann AO; Erläuterung siehe Text)

2.1.2.2. Reportergene

2.1.2.2.1. MMTV-luc

Das MMTV-luc-Reportergen, welches insgesamt eine Größe von 7,32 kb hat, besitzt vier verschiedene glukokortikoidresponsible Elemente (GRE's).



Abb.: 2-2 Schematische Darstellung des MMTV-luc-Plasmids
(Erläuterung siehe Text)

Zusätzlich gibt es Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren wie NF-1, Oct1 und TATA-box-binding-factor [33,42,68,]. Zur Messung der Transfektion ist auf dem MMTV-luc-Reporter gen die Luziferase-cDNA kodiert.

Das MMTV-luc-Plasmid war ebenfalls ein Geschenk von Dr. A.O. Brinkmann (Erasmus Universität Rotterdam, Niederlande).

2.1.2.2.2. pRE₂-TATA-luc

Im Gegensatz zu den beiden anderen Reporter genen handelt es sich bei TATA-luc um ein in seiner Struktur sehr einfaches Reporter gen. Es enthält responsible Elemente, die aufgrund ihrer Wirkungen auch als gemeinsame PRE/ARE bezeichnet werden (siehe Abbildung 2-3).

Außerdem besitzt das TATA-luc-Reporter gen noch eine Bindungsmöglichkeit für Transkriptionsfaktoren, den TATA-box-binding-factor und wiederum die Luziferase-cDNA [43]. Insgesamt hat das Plasmid eine Größe von 4980 bp.

Das pRE₂-TATA-luc-Plasmid war ein Geschenk von Dr. G. Jenster (Erasmus Universität Rotterdam, Niederlande).



Abb. 2-3: Schematische Darstellung des pRE₂-TATA-luc-Reporter gens
(Erläuterung siehe Text)

2.1.2.2.3. GRE-OCT-luc

Das dritte untersuchte Reporter gen ist das GRE-OCT-luc-Plasmid, es ist aus zwei GRE's aufgebaut. Auch bei diesem Reporter gen gibt es in der Promoterregion die Möglichkeit der Bindung von Transkriptionsfaktoren - ein TATA-box-binding-factor und eine Sp1-Erkennung. Die cDNA für die Firefly-Luziferase befindet sich ebenfalls auf dem Plasmid. Das GRE-OCT-luc-Plasmid wurde von Dr. A.O. Brinkmann (Erasmus Universität, Rotterdam, Niederlande) bezogen.



Abb. 2-4: Schematische Darstellung des GRE-OCT-luc-Plasmids

(Erläuterung siehe Text)

2.1.2.3. pRL-SV40-Vektor zur Messung der Transfektionseffizienz

Das pRL-SV40-Plasmid von der Firma Promega setzt sich aus Komponenten zusammen, die der Vervielfältigung in *E. coli*-Zellen dienen. So besitzt es wie das pSVAR0-Plasmid ein ORI-Element (Ursprung der Transkription) und das Amp-Gen (Ampicillin-Resistenz) [70].

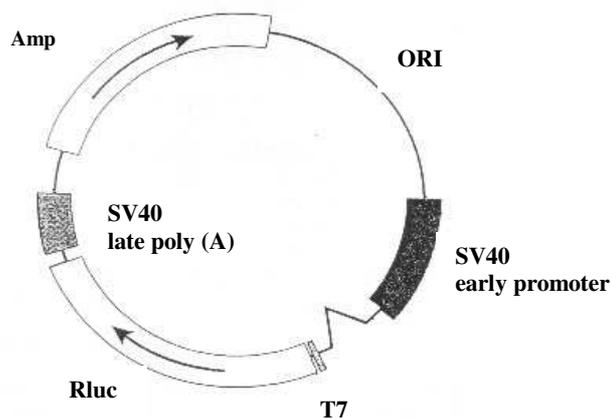


Abb. 2-5: Schematische Darstellung des pRL-SV40-Plasmids

(umgezeichnet nach *Technical Bulletin des pRL-SV40-Vektors der Firma Promega, Figure 1, 1998;*

Erläuterung siehe Text)

Wichtig für den Versuchsaufbau ist das Rluc-Gen, welches für das Renilla-Luziferase-Enzym kodiert. Die Renilla-Luziferase wird nach erfolgreicher Transfektion exprimiert und zeigt damit die Transfektionseffizienz des jeweiligen Versuches an. Um die Expression der Renilla-Luziferase zu steigern, besitzt das Plasmid noch das „SV40 late poly(A)-Signal“, eine Polyadenylierungssequenz.

Insgesamt hat das pRL-SV40-Plasmid eine Größe von 3705 bp.

2.1.2.4. Carrier-Plasmid pTZ19

Als Carrier-Plasmid, „Füllplasmids“, wurde das pTZ19 eingesetzt. Es kodiert für kein Gen und wird speziell für in-vitro-Versuche und DNA-Replikation eingesetzt.

Das pTZ19-Plasmid war ein Geschenk aus Rotterdam von Brinkmann A.O. (Erasmus Universität, Rotterdam, Niederlande).

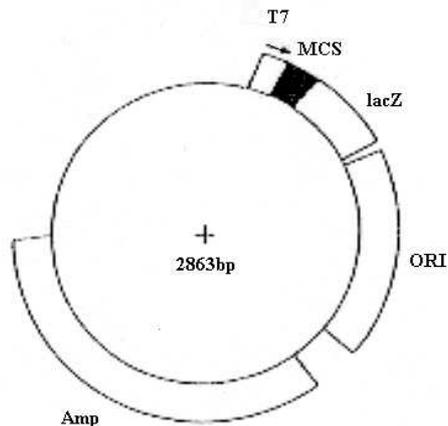


Abb. 2-6: Schematische Darstellung des pTZ19-Plasmides

(umgezeichnet nach der Produktbeschreibung für das pTZ19-Plasmid der Firma Pink-Indicates-Products (USA); Erläuterung siehe Text)

2.1.3. Plasmidpräparation

Für die Versuche mussten die Plasmide zu Maxi-Präparationen aufbereitet werden. Dazu wurden Glycerinkulturen der entsprechenden Plasmide benötigt, die bei -80°C aufbewahrt und zur weiteren Präparation bei Raumtemperatur aufgetaut wurden.

Für die Vervielfältigung der in den Glycerinkultur enthaltenen Plasmide wurde LB-Medium (siehe Tabelle 2-6) verwendet. Hierzu wurde eine Starterkultur angesetzt (siehe Tabelle 2-7), die dann für ungefähr sechs Stunden bei 37°C auf einem Rüttler bei 225rpm inkubiert wurde. Danach wurde die Starterkultur in eine Maxikultur überführt (siehe Tabelle 2-8), die ebenfalls bei 37°C und 225rpm über Nacht inkubiert wurde.

Substanz	Menge	Bezugsquelle
Hefeextrakt	5,0 g	Gibco/BRL
Natriumchlorid (NaCl)	10,0 g	Merck
Select-Peptone 140	10,0 g	Gibco/BRL

Tab. 2-6: Zusammensetzung von 1,0l LB-Medium (pH 7,5)

Substanz	Menge	Bezugsquelle
LB-Medium	4,0 ml	siehe Tab. 2-6
Ampicillin (0,1%-ig)	4,0 µl	Sigma-Aldrich
Glycerinkultur	15,0µl	siehe Kapitel 2.1.2.

Tab. 2-7: Zusammensetzung der Starterkultur

Substanz	Menge	Bezugsquelle
LB-Medium	350 ml	siehe Tab. 2-6
Ampicillin (0,1%-ig)	350 µl	Sigma-Aldrich
Starterkultur	4,0 ml	siehe Tab. 2-7

Tab. 2-8: Zusammensetzung der Maxikultur

Am nächsten Tag wurden die in den Maxikulturen enthaltenen Plasmide mittels eines Qiagen-Plasmid-Maxi-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Die Konzentration der Plasmide wurde mit einem Photometer Beckmann DU-600 bestimmt. Hierzu wurden 2µl der fertigen Plasmid-Maxi-Präparationen im Verhältnis 1:40 mit TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer Lösung, BioChemika Ultra über Sigma-Aldrich) verdünnt. Die fertigen Maxi-Präparationen wurden anschließend bei -18°C gelagert und für die Versuche auf Eis aufgetaut.

Zur Überprüfung der Identität der Maxi-Präparationen, wurden die Plasmide durch Restriktionsendonukleasen verdaut und damit die ringförmige Struktur der Plasmide aufgehoben. Die entstandenen Plasmid-DNA-Fragmente wurden auf einem Argarosegel mittels einer Elektrophorese analysiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 2-9 aufgeführt. Listen der möglichen Restriktionsendonukleasen können den Beschreibungen der Plasmide entnommen werden.

<i>Plasmid</i>	<i>Restriktionsendonuklease</i>	<i>Bezugsquelle</i>
pSV-AR0	Sma I	Gibco/BRL
MMTV-luc	Pst I	
pRE ₂ -TATA-luc	Hind III	
GRE-OCT-luc	EcoR I	
pRL-SV40	BamH I	
pTZ19	Bgl I	

Tab. 2-9: Liste der verwendeten Restriktionsendonukleasen

Für den Plasmid-Verdau wurden 1µg DNA (Plasmid), 1µl Restriktionsendonuklease, 1µl Puffer (passend zur jeweiligen Restriktionsendonuklease) und 7µl Aqua dest. gemischt und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Plasmide und Plasmidfragmente nach folgendem Schema auf einem 2%-igen Argarosegel (4g Argarose in 200ml Tris-Borat-EDTA-Puffer (Sigma-Aldrich) lösen) aufgetrennt:

1µl unverdautes Plasmid + 2µl blue stop + 7µl Aqua dest.

2µl verdautes Plasmid + 2µl blue stop + 6µl Aqua dest.

Die Elektrophorese wurde mit 10Volt pro Zentimeter Gellänge durchgeführt. Zur Färbung der DNA-Fragmente wurde das Argarosegel nach erfolgter Elektrophorese für 10min in 0,2%-iger Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und danach für weitere 10min in Wasser geschwenkt, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen. Zum Schluss wurde das Gel über einer Ultraviolettlampe fotografiert, so dass die entstandenen Banden beurteilt werden konnten.

Zur Größeneinschätzung der Fragmente wurde parallel ein Marker mit bekannten Fragmentlängen mit aufgetragen (10µl λ-Hind-III-Marker, Gibco/BRL).

2.1.4. Hormone und Hormonderivate

Alle untersuchten Hormone wurden in 96%-igem Ethanol gelöst. Aus einer einmolaren Stammlösung wurden mit 96%-igem Ethanol (Sigma-Aldrich) Konzentrationen zwischen 0,001nM und 100nM hergestellt (0,001nM; 0,01nM; 0,1nM; 1,0nM; 10nM, 100nM).

Tabelle 2-10 gibt einen Überblick über alle verwendeten Steroide und ihrer Eigenschaften.

2.1.4.1. Testosteron

Testosteron wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die Lagerung der kristallinen Substanz erfolgte bei Raumtemperatur beziehungsweise im aufgelöstem Zustand bei -20°C .

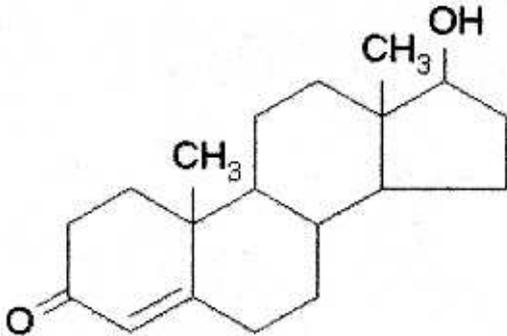


Abb. 2-7: Strukturformel des Testosterons

2.1.4.2. Dihydrotestosteron

Das in dieser Arbeit verwendete DHT stammt von der Firma Sigma-Aldrich und hat ein Molekulargewicht von 290,4u und den chemischen Namen 17 β -Hydroxy-5 α -androstan-3-on. Gelagert wurde es als kristallines Pulver bei Raumtemperatur und in Lösung bei -20°C .

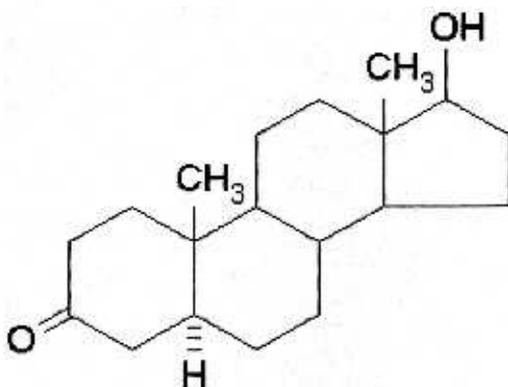


Abb. 2-8: Strukturformel des Dihydrotestosterons

2.1.4.3. Androstendion

Das verwendete Androst-4-en-3,17-dion, Androstendion, stammt von der Firma Sigma-Aldrich und hat ein Molekulgewicht von 286,4u. Bei Raumtemperatur erfolgte die Lagerung der kristallinen Substanz, wohingegen das in 96%-igem Ethanol gelöste Androstendion bei -20°C aufbewahrt wurde.

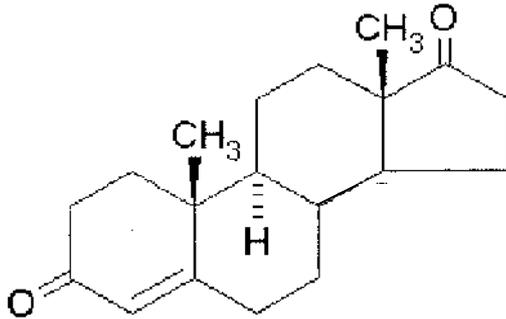


Abb. 2-9: Strukturformel des Androstendions

2.1.4.4. Dehydroepiandrosteron

Das DHEA stammt von der Firma Sigma-Aldrich. Es hat ein Molekulgewicht von 288,4u und wurde für die Versuche in 96%-igem Ethanol gelöst. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur und im aufgelöstem Zustand bei -20°C . Der chemische Name von DHEA lautet Androst-5-en-3 β -ol-17-on.

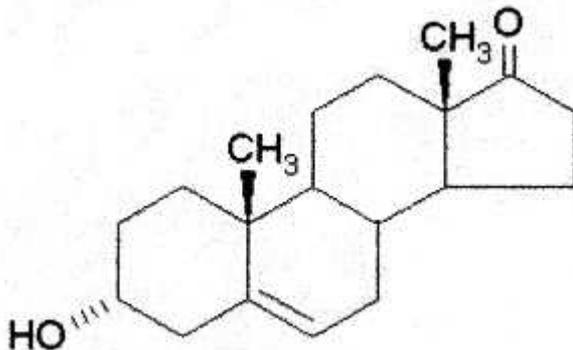


Abb. 2-10: Strukturformel des Dehydroepiandrosterons

2.1.4.5. Methyltrienolon

Das synthetisierte Hormon Methyltrienolon (R1881, Metribolone) hat ein Molekulgewicht von 284,4u und wird als Trockensubstanz und gelöst in 96%-igem Ethanol bei -20°C lichtgeschützt gelagert. Meine Bezugsquelle für Methyltrienolon war die Firma NEN-Life-Science-Products-GmbH.

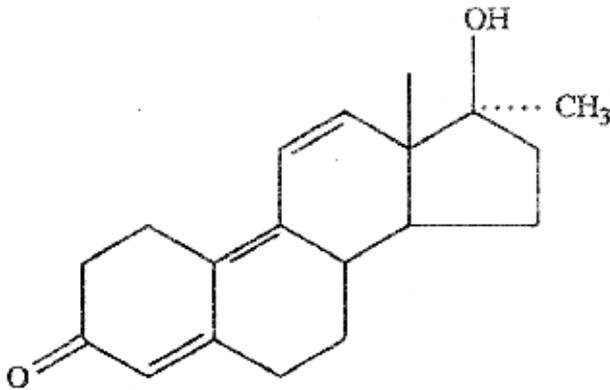


Abb. 2-11: Strukturformel des Methyltrienolons

2.1.4.6. Stanozolol

Stanozolol, 17-Methyl-5 α -androstano[3,2-c]pyrazol-17 β -ol, der Firma Sigma-Aldrich wurde für die Versuche verwendet, das bei $2-8^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt wurde. Gelöst in 96%-igem Ethanol wurde es bei -20°C gelagert.

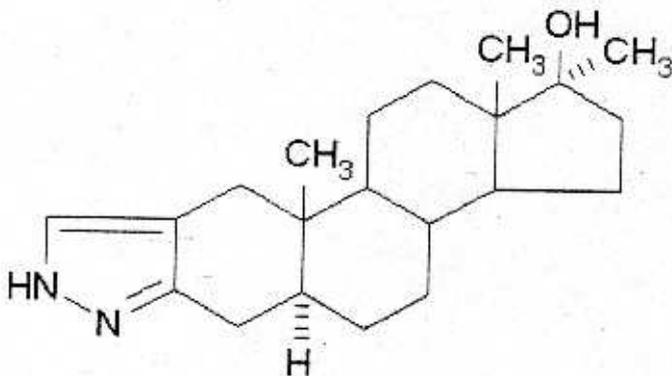


Abb. 2-12: Strukturformel des Stanozolols

2.1.4.7. Oxandrolon

Die chemische Substanz 2-Oxa-17 α -methyl-dihydrotestosteron, Oxandrolon, hat ein Molekülgewicht von 306,45u und wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die Trockensubstanz wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur und die in 96%-igem Ethanol gelöste Substanz bei -20°C gelagert.

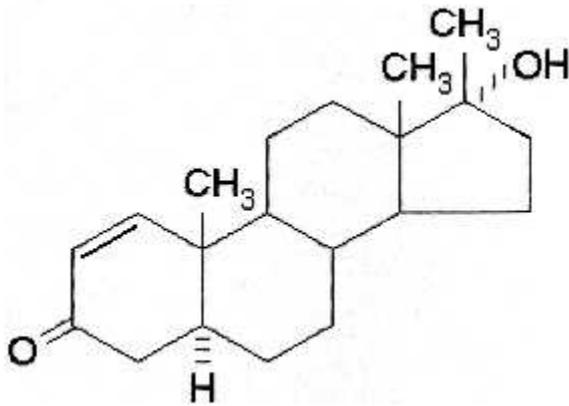


Abb.2-13: Strukturformel des Oxandrolons

2.1.4.8. Nandrolon

Nandrolon wird chemisch in die Gruppe der 19-Nor-Derivat des Testosteron eingeordnet. Die genaue Bezeichnung lautet 17 β -Hydroxy-4-estren-3-on und das Molekülgewicht liegt bei 274,39u. Als Bezugsquelle diente die Firma Sigma-Aldrich. Die kristalline Substanz wurde bei Raumtemperatur gelagert und anschließend in 96%-igem Ethanol gelöst und so bei -20°C aufbewahrt.

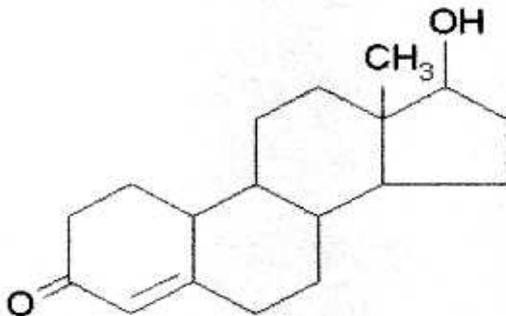


Abb. 2-14: Strukturformel des Nandrolons

<i>Hormon, IUPAC-Name</i>	<i>Molekül- gewicht [u]</i>	<i>Q-Wert</i>	<i>Eigenschaften, Literatur</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Androstendion Androst-4-en-3,17-dion	286,4	/	schwach androgen	Sigma-Aldrich
Dehydroepiandrosteron Androst-5-en-3 β -ol-17-on	288,4	/	schwach androgen, östrogen-ähnlich, [18]	
Dihydrotestosteron 17 β -Hydroxy-5 α - androstan-3-on	290,4	<1	virilisierend, [39]	
Methyltrienolon, R1881 17 β -Hydroxy-17 α -methyl- 4,9,11-estrotrien-3-on	284,4	\approx 1	Äquivalent zu Tes- tosteronpropionat in Bezug auf Prostata, [76]	NEN-Life- Science- Products- GmbH
Nandrolon 17 β -Hydroxy-4-estren-3-on	274,4	7-10	Anabolikum mit relativ hoher androgener Restaktivität, [25,62]	Sigma-Aldrich
Oxandrolon 2-Oxa-17 α -methyl- dihydrotestosteron	306,45	13	Anabolikum, [62,64]	
Stanozolol 17-Methyl-5 α -andro- stano[3,2-c]pyrazol-17 β -ol	328,5	100	starkes Anabolikum, [8,25]	
Testosteron 17 β -Hydroxy-4-androsten- 3-on	288,47	1	virilisierend, [25,62]	

Tab. 2-10: Übersicht über die verwendeten Hormone und einiger ihrer Eigenschaften

Q-Wert: anabol/androgene Ratio (Bestimmung nach Overbeek [63,94])

2.2. Transaktivierung

2.2.1. Vorbereitung der Zellen

Nach der Züchtung der CHO-Zellen in Kulturflaschen (175cm³, Sarstedt) wurde das verbrauchte DMEM^{10%-FCS}-Medium abgesaugt und die Zellen mit ungefähr 20ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die CHO-Zellen mit 2ml Trypsin/EDTA (0,5% Trypsin, 0,2% Ethyldiamintetraessigsäure, Gibco/BRL) aus der Flasche gelöst und dieser Vorgang nach zwei Minuten durch Zugabe von 8ml DMEM^{10%-DCC-FCS}-Medium gestoppt. Danach wurde diese Zellsuspension bei 900 Umdrehungen pro Minute in einer Rotanta/AP-Zentrifuge der Firma Hettich für fünf Minuten abzentrifugiert und der entstandene

Medium-Trypsin-Überstand durch neues DMEM^{10%-DCC-FCS}-Medium ersetzt und mit den abgesetzten Zellen vermischt. Die Zahl der gelösten Zellen der Zellsuspension wurde aus 20µl der Zellsuspension, angefärbt mit Bromphenolblau (Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:5, in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt, so dass für die Versuche eine standardisierte Zellzahl von 60000 Zellen pro Milliliter DMEM^{10%-DCC-FCS}-Medium gewährleistet werden konnte.

Jeweils 2,5ml der Zellsuspension, entsprechend 150000 Zellen, wurden im weiteren Ablauf auf ein Loch von 6-Loch-Platten (Nunc) ausplattiert und für 24 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank weitergezüchtet.

2.2.2. Transfektion

Zur Transfektion der Plasmide in die eukaryontischen CHO-Zellen wurde die Kalzium-Phosphat-Methode angewandt [60].

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Bezugsquelle</i>
BES-Puffer (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure)	1,07 g = 50 mM	Calbiochem
Natriumchlorid (NaCl)	1,64 g = 280 mM	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	21,3 mg = 1,5 mM	Merck
Aqua dest.	100 ml	

Tab. 2-11: Zusammensetzung des BBS-Puffers (pH 6,95, steril)

Nach Zugabe von Kalziumdichlorid (0,5M CaCl₂-Lösung, Sigma-Aldrich) zu Lösungen aus Plasmid-DNA und BBS-Puffer (siehe Tabelle 2-11) bildet sich ein Präzipitat aus DNA und Kalziumphosphat, das von der Zellmembran der CHO-Zellen adsorbiert wird. Während der weiteren Kultur kommt es zur Aufnahme der DNA in die Zelle.

Insgesamt wurden pro Loch der 6-Loch-Platten 250µl DNA-Präzipitat benötigt. Die Gesamtplasmidkonzentration von 20µg/ml war immer konstant und setzte sich je nach Fragestellung aus den einzelnen Plasmiden zusammen. Aus Vorversuchen ergaben sich hierfür folgende Standardversuchsbedingungen:

		pSVAR0	pRL-SV40	pTZ19
MMTV-luc	2µg	50ng	5ng	17,9µg
pRE₂-TATA-luc	1µg	50ng	2ng	18,9µg
GRE-OCT-luc	4µg	50ng	2ng	15,9µg

Tab. 2-12: Standardversuchsbedingungen für Plasmidkonzentrationen

Unter sterilen Bedingungen wurde das Kalziumchlorid und die einzelnen Plasmide vermischt und durch tropfenweise Hinzufügen des BBS-Puffers unter Luftblasendurchmischung die Präzipitation gestartet. Nach genau 20 Minuten wurde jeweils 250µl dieses Präzipitates auf ein Loch der jetzt mit Zellen bewachsenen 6-Loch-Platten gegeben und wiederum für 24 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank gelagert. In dieser Zeit erfolgte die Aufnahme der Plasmide in die Zelle.

2.2.3. Hormoninkubation

Nach weiteren 24 Stunden wurden die Hormone hinzugefügt. Testosteron, Androstendion, Dihydrotestosteron, Dehydroepiandrosteron, Methyltrienolon (R1881), Oxandrolon, Stanozolol und Nandrolon wurden in Konzentrationen von 0,001nM, 0,01nM, 0,1nM, 1,0nM, 10nM und 100nM mit DCC-FCS vermischt und anschließend jeweils 2,5ml pro Loch der 6-Loch-Platte auf die Zellen verteilt. Zur Messung des Basalwertes wurde die entsprechende Menge 96%-iges Ethanol (Sigma-Aldrich) ohne Hormonzusatz mit 2,5ml DMEM^{DCC-FCS} vermischt und anschließend auf die Zellen gegeben.

Zuvor wurde das verbrauchte Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen zweimal mit 2ml PBS-Lösung gewaschen. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Für jede Konzentration eines Hormons wurde die Inkubation als Triplikatansatz durchgeführt.

2.2.4. Messung der Luziferaseaktivität

Zum Abwaschen des alten Mediums wurde dieses von den Zellen in den 6-Loch-Platten abgesaugt und die Zellen zweimal mit ca. 2ml PBS gewaschen und anschließend auf jedes Loch der 6-Loch-Platten 500µl des Passive-Lysis-Buffer (Lysis-Puffer) der Firma Promega in einer 1:5 Verdünnung mit Aqua dest. gegeben. Durch diesen Puffer wurden die Zellen abgelöst und lysiert. Die 6-Loch-Platten wurden dazu für 15min auf einem Rüttler gelagert.

Danach wurden genau 20µl der Zellsuspension aus jedem Loch in ein auf Eis gelagertes Röhrchen der Firma Sarstedt gegeben.

Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte mit einem Luminometer (Lumat LB 9507, EG&G Berthold über Promega). Mittels des Luminometers wurden zwei Luziferin-Substrate hinzugefügt, die durch die transkribierten Enzyme Firefly- und Renilla-Luziferase umgesetzt wurden. Die dadurch entstandenen Lichtblitze wurden quantitativ erfasst [69].

In diesem Versuchsaufbau wurde dazu Promega's Dual-Luziferase[®] Reporter (DLRTM) Assay System (Promega) mit den Substraten Luziferase-Assay-Reagenz-II zur Messung der Firefly-Luziferase-Aktivität und der Stop&Glo-Reagenz[®] zur Messung der Renilla-Luziferase-Aktivität verwendet.

Ein Puffer unterdrückt die Messung der Firefly-Luziferase und ermöglicht so die selektive Messung der Renilla-Luziferase. Auf diese Weise wird sowohl die spezifische androgenabhängige Aktivierung (Firefly) als auch die Transfektionseffizienz (Renilla) erfasst.

2.3. Normalisierung der Ergebnisse

Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde vorab festgelegt, nur Versuche mit einer Transfektionseffizienz über 50.000 relative Einheiten mit einzubeziehen. Durch eine niedrigere Transfektionseffizienz würden die Ergebnisse einer zu großen Variabilität unterliegen.

Die Versuche wurden mittels Excel-Software der Firma Microsoft ausgewertet. Die Induktion des Reportergens wurde bestimmt, indem die gemessene Aktivität eines Hormones in einer bestimmten Konzentration auf die Basalaktivität (ohne Hormon) bezogen wurde:

$$\text{Induktion} = \frac{\text{Aktivität des Hormons}}{\text{Basalaktivität}}$$

Die Relativaktivität wurde für die Auswertung der Aktivität der untersuchten Hormone in den verschiedenen Konzentrationen an den verschiedenen Reportergenen errechnet. Sie gibt die gemessene Aktivität der Hormone in Bezug auf die Aktivität eines

Standardhormones (10nM R1881) an. Die Standardaktivität wurde für jeden Versuch neu ermittelt.

$$\text{Relativaktivität} = \frac{\text{Aktivität des Hormons}}{\text{Standardaktivität}}$$

2.4. Hierarchische Clusteranalyse der Transaktivierungsdaten

Um die umfangreichen, vielfältigen Ergebnisse einfacher und übersichtlicher darzustellen, wurden alle Ergebnisse mit einer Clusteranalyse berechnet. Diese Methode wurde entwickelt, um komplexe Expressionsprofile von Genen zu untersuchen und diese anhand der Ergebnisse zu sortieren.

Eisen et al. [19,41] und Holterhus et al. [38] beschreiben Beispiele, in denen die Clusteranalyse bisher eingesetzt wurde. Mittels dieser Methode wurden zum Beispiel Gen-Expressionsprofile des Hefe-Pilz' *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Aus ähnlichen Expressionsdaten werden hierarchische Gruppen gebildet, die eine intuitive Auswertung der Ergebnisse ermöglichen.

Die Clusteranalyse ist eine mathematische Methode, die auf statistischen Algorithmen beruht. In diesem Versuchsaufbau wurden die Expressionsdaten der einzelnen Hormone in den einzelnen Konzentrationen von 0,001nM bis 100nM in Abhängigkeit der drei Reportergene angegeben. Für ein Reportergen wurde die Durchschnittsaktivität der verschiedenen Hormone in der jeweiligen Konzentration berechnet. Die einzelne Hormonaktivität wurde anschließend auf diesen Mittelwert bezogen. Hormone mit einer höheren Aktivität als der Durchschnittsaktivität wurden mit roten und solche mit einer geringeren Aktivität mit grünen Punkten bewertet (siehe Legende in Abb. 3-11). Dies wurde für jede Konzentration und jedes Reportergen neu berechnet.

Aus allen Konzentrationen und allen drei Reportergenen konnten nun die Hormone anhand der Ähnlichkeit bezüglich des Profils aktivierter Reportergene eingeordnet werden. Die farbige Abstufung der Clusteranalyse diente einer einfachen visuellen Bewertung aller Ergebnisse. Der hierarchische „Stammbaum“ visualisierte die Ähnlichkeit der Expressionsprofile.

2.5. Negativkontrollen

Um eine androgenrezeptorunabhängige Aktivierung der Reportergene auszuschließen, wurden Negativkontrollen ohne Androgenrezeptor-Expressionsplasmid durchgeführt. Die Plasmidkonzentrationen für die Versuche sind in Tabelle 2-13 aufgeführt. Die Untersuchungen wurden für alle oben angegebenen Hormone in den Konzentrationen von 0,001nM bis 100nM und 0nM an allen drei Reportergenen durchgeführt.

		pSVAR0	pRL-SV40	pTZ19
MMTV-luc	2µg	0ng	5ng	18,0µg
pRE₂-TATA-luc	1µg	0ng	2ng	19,0µg
GRE-OCT-luc	4µg	0ng	2ng	16,0µg

Tab. 2-13: Versuchsbedingungen zum Ausschluss androgenrezeptorunabhängiger Aktivierung

2.6. Western-Blot zur Prüfung der Qualität der Transfektionen

Ein Western-Blot dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen, die mittels spezifischen Antikörpern auf einem Gel sichtbar gemacht werden. Der Nachweis der Androgenrezeptorexpression nach Transfektion auf Proteinebene erfolgte im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen.

2.6.1. Herstellung der Zellproteinlysate

Zur Durchführung eines Western-Blot wurden Zellproteinlysate nach Transfektion der Plasmide hergestellt. Zuerst wurden dafür 20ml DMEM^{10%-FCS} mit 60000 CHO-Zellen pro Milliliter in einer T75-Flasche der Firma Sarstedt für 24 Stunden bei 37°C angezchtet. Am zweiten Tag wurde die Transfektion entsprechend der zuvor ermittelten Versuchsbedingungen mittels der Kalzium-Phosphat-Methode durchgeführt. Hierzu wurden 1µg/ml pSVAR0, 5ng/ml pRL-SV40 und 18,9µg/ml pTZ19 verwandt. Als Negativkontrolle wurde ein Versuch ohne Androgenrezeptor-Expressionsplasmid aber mit 5ng/ml pRL-SV40 und 19,9µg/ml pTZ19 durchgeführt.

Nach weiteren 24 Stunden wurden die Protein-Lysate hergestellt. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und diese zweimal mit etwa 15ml PBS gewaschen. Der weitere

Versuchsablauf erfolgte auf Eis. Nach Hinzufügen von 1,0ml Lysispuffer A (siehe Tabelle 2-14) wurden die Zellen mit einem Zellscraper abgeschabt und die Suspension in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach kurzem vortexen der Zellsuspension wurde sie für 5min auf Eis gelagert und anschließend für 10min bei 1700facher Erdbeschleunigung und 4°C abzentrifugiert. Das Zellprotein im Überstand wurde in ein Nunc-Röhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	1,0 ml	Sigma-Aldrich
DEO (Desoxycholat)	0,5 g	Sigma-Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,08 g	Fluka
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 60mM	10 µl	Sigma-Aldrich
Bacitracin, 50mM	10 µl	Sigma-Aldrich

Tab. 2-14: Zusammensetzung des Lysispuffers A

2.6.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für den Blot wurden die entsprechenden Gele zur Auftrennung gegossen. Das 12%-ige Trenngel (siehe Tabelle 2-16) wurde mit 96%-igem Ethanol überschichtet und für eine Stunde zur Auspolymerisierung ruhen gelassen. Anschließend wurde das 4%-ige Sammelgel (siehe Tabelle 2-16) auf das gehärtete Trenngel gegossen und wiederum für 30min auspolymerisieren gelassen.

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃), 100mM	1,21 g	Sigma-Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	4 g	Fluka
Bromphenolblau	2 mg	Sigma-Aldrich
Glycerol (85%-ig)	23,6 ml	Sigma-Aldrich
Aqua dest.	100ml	

Tab. 2-15: Zusammensetzung des Laemmli-Puffers (pH 6,8)

30µl des oben hergestellten Zellysates werden mit 10µl von 2xSample-Buffer nach Laemmli („Proben-Puffer“, siehe Tabelle 2-15), verdünnt mit 100:1 DTT (DL-Dithiothreitol, 1M, Sigma-Aldrich), zusammengeführt. Diese Suspension wurde bei 100°C für 3min in einer PCR-Maschine denaturiert und anschließend abzentrifugiert. Die

benötigten Molekulargewichts-Marker wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mögliche Präzipitate durch Erwärmung für 1min bei 40°C in einer PCR-Maschine wieder gelöst.

Die fertigen Gele wurden in die Western-Blot-Kammer eingespannt und mit Elektrodenpuffer überschichtet. Die Taschen im Gel wurden mit einer Spritze mit Elektrodenpuffer gespült. Anschließend wurden die Taschen mit 10µl Marker beziehungsweise mit 30µl Suspension beladen. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug für das Sammelgel erst 20min bei 100V und danach 90min bei 170V für das Trenngel.

Substanz	Menge für 4%-iges Sammelgel	Menge für 12%-iges Trenngel	Bezugsquelle
Acrylamid-Rotiphorese	0,71 ml	5,2 ml	Bio-Rad
Staching-Puffer	1,1 ml		siehe Tabelle 2-17
Seperating-Puffer		2,7 ml	siehe Tabelle 2-18
Aqua dest.	3,5 ml	5,0 ml	
Temed (1,2-Bis(dimethylamino)ethan)	10 µl	10 µl	Sigma-Aldrich
APS, 10%-ig (Ammoniumperoxodisulfat)	60 µl	28,8 µl	Sigma-Aldrich

Tab. 2-16: Zusammensetzung des Sammel- und des Trenngels (Mengen für 2 kleine Gele)

Substanz	Menge	Bezugsquelle
Tris-Puffer (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	3,77 g = 0,625 M	Sigma-Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,25 g = 0,5 %	Fluka
Aqua dest.	50 ml	
pH 6,8; Lagerung bei 4°C		

Tab. 2-17: Zusammensetzung des Staching-Puffers

Substanz	Menge	Bezugsquelle
Tris-Puffer (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	22,6 g = 1,875 M	Sigma-Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,5 g = 0,5 %	Fluka
Aqua dest.	100 ml	
pH 8,8; Lagerung bei 4°C		

Tab. 2-18: Zusammensetzung des Seperating-Puffers

Der verwendete Molekulargewichtsmarker ist der RPN-800-Full-Range-Rainbow-Marker der Firma Amersham, der bei -18°C gelagert wurde.

Die Blot-Kammer wurde aus Schwämmen, Wathmannpapier (Gel-Blottingpapier, Schleicher & Schnell), Membran und Gel aufgebaut. In diesem Schritt wurden die aufgetrennten Proteine, die sich im Gel befinden, auf die Membran geblottet. Die gesamte Blot-Kammer wird mit Blot-Puffer (siehe Tabelle 2-19) gefüllt und anschließend auf Eis gestellt, der Blot für eine Stunde bei 100V laufen gelassen.

Nach Auftrennung der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran in einem geschlossenen Behälter über Nacht bei Raumtemperatur trocknen gelassen.

Am nächsten Morgen wurde die Membran für 20min in PBS-Tween (siehe Tabelle 2-20) mittels eines Rüttlers geschwenkt und anschließend für eine Stunde mit Blockingreagenz (Blockierungsreagenz = 3g Magermilchpulver in 60ml PBS-Tween gelöst) geblockt.

Substanz	Menge	Bezugsquelle
Tris-Puffer ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	20,0 g = 165 mM	Sigma-Aldrich
Glycin	112,5 g = 1,5mM	Merck
Aqua dest.	1,0 l	

Tab. 2-19: Zusammensetzung des Blot-Puffers (Lagerung bei 4°C)

Substanz	Menge	Bezugsquelle
PBS	100 ml	siehe Tabelle 2-5
Tween 20 (Polyoxyethensorbitanmonolaurat)	1 ml	Bio-Rad
Aqua dest.	900 ml	

Tab. 2-20: Zusammensetzung des PBS-Tween

Anschließend wurde 1ml Blockingreagenz (5%-ig) mit $4,5\mu\text{l}$ Anti-Androgenrezeptor-Antikörper PG-21 der Firma Biomol verdünnt und in dieser Lösung die Nitrozellulosemembran für eine weitere Stunde geschwenkt. Der untere Teil der Membran, auf dem das Aktin aufgetrennt wurde, wurde demgegenüber mit einer Verdünnung aus 1ml Blockingreagenz und $2\mu\text{l}$ Anti-Aktin-Antikörper der Firma Sigma-Aldrich überschichtet.

Danach wurden beide Teile der Membran vier mal für 15min mit PBS-Tween gewaschen, ehe der zweite Antikörper ($1\mu\text{l}$ IgG-Peroxidase-Konjugat in 4ml Blockinreagenz) zum Überschichten und Inkubieren eingesetzt wurde, wiederum für eine Stunde.

Anschließend wurden die Membranen wieder viermal für 15min in PBS-Tween gewaschen, für einige Minuten mit je 1,5ml Enhanced-Luminol-Reagenz und Oxidizing-Reagenz (Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus, PerkinElmer Life Sciences) inkubiert und anschließend in Frischhaltefolie eingewickelt.

Es kam zur Bindung der Antikörper an für sie spezifische Proteine. Entstehende Lichtsignale wurden abschließend in einer Dunkelkammer auf Fotopapier detektiert und damit die Proteine sichtbar gemacht.

2.7. Verzeichnis der Bezugsfirmen

Amersham	Braunschweig
Beckmann Photometer	München
Bio-Rad	Ismaningen
Boehringer	Mannheim
Calbiochem	La Jolla, CA, USA
Deutsche-Sammlung-von-Mikroorganismen- und-Zellkulturen GmbH	Braunschweig
Fluka	Buchs, Schweiz
Gibco/BRL	Grand Island, NY, USA
Hettich	Tuttlingen
Microsoft	Seattle, WA, USA
NEN-Life-Science-Products GmbH	Köln
Nunc	Roskilde, Dänemark
PAA-Laboratories GmbH	Linz, Österreich
PerkinElmer Life Sciences	Boston, MA, USA
Promega	Madison, WI, USA
Quiagen	Hilden
Sarstedt	Nümbrecht
Serva	Heidelberg
Schleicher & Schnell	Dassel
Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Stratagene	La Jolla, CA, USA
Wtw	Weilheim

Tab. 2-21: alphabetisches Verzeichnis der Bezugsfirmen und Angabe eines Firmensitzes

3. Ergebnisse

3.1. Kontrolle der Transfektion

Zur Prüfung des Versuchsaufbaus und der Qualität der Transfektion wurden die Western-Blots durchgeführt. Mit den Blots konnte nach Transfektion des Androgenrezeptor-Expressionsplasmid der Androgenrezeptor in den CHO-Zellen nachgewiesen werden.



Abb. 3-1: Ergebnis eines Western-Blots,

*oben: Darstellung des transfizierten AR (Bahn 2)
gegenüber Transfektion ohne AR (Bahn 1);
Belichtungszeit 30min.*

*unten: Darstellung korrespondierender Aktin-Banden;
Belichtungszeit 5min.*

In Abbildung 3-1 ist ein Ergebnis dieser Versuche dargestellt. Die Versuche mit und ohne Androgenrezeptor-Expressionsplasmid wurden in einem Blot nebeneinander aufgetragen. Bahn 1 gibt einen Versuch ohne Androgenrezeptor im Gegensatz zur Bahn 2 mit transfiziertem Expressionsplasmid wieder. In dieser Bahn liegt eine Bande, die mit etwa 110kDa in den Bereich des humanen Androgenrezeptors (110kDa) passt. In der entsprechenden Größenordnung in Bahn 1 ist keine Bande aufgetreten.

Im unteren Abschnitt der Abbildung 3-1 sind die Referenzbanden des Aktins aufgetreten, die der relativen Quantifizierung der AR-Menge und als Qualitätskontrolle dienen.

3.2. Aktivierung am MMTV-, GRE-OCT- und TATA-luc-Reportergen

3.2.1. MMTV-luc-Reportergen

Unter Verwendung des MMTV-luc-Plasmides als Reportergen zeigen alle acht Hormone mit ansteigender Konzentration von 0,001nM bis 100nM eine progrediente Aktivierung des Androgenrezeptors. Bei gleichen Hormonkonzentrationen variiert das Ausmaß der Aktivitäten der Hormone jedoch deutlich.

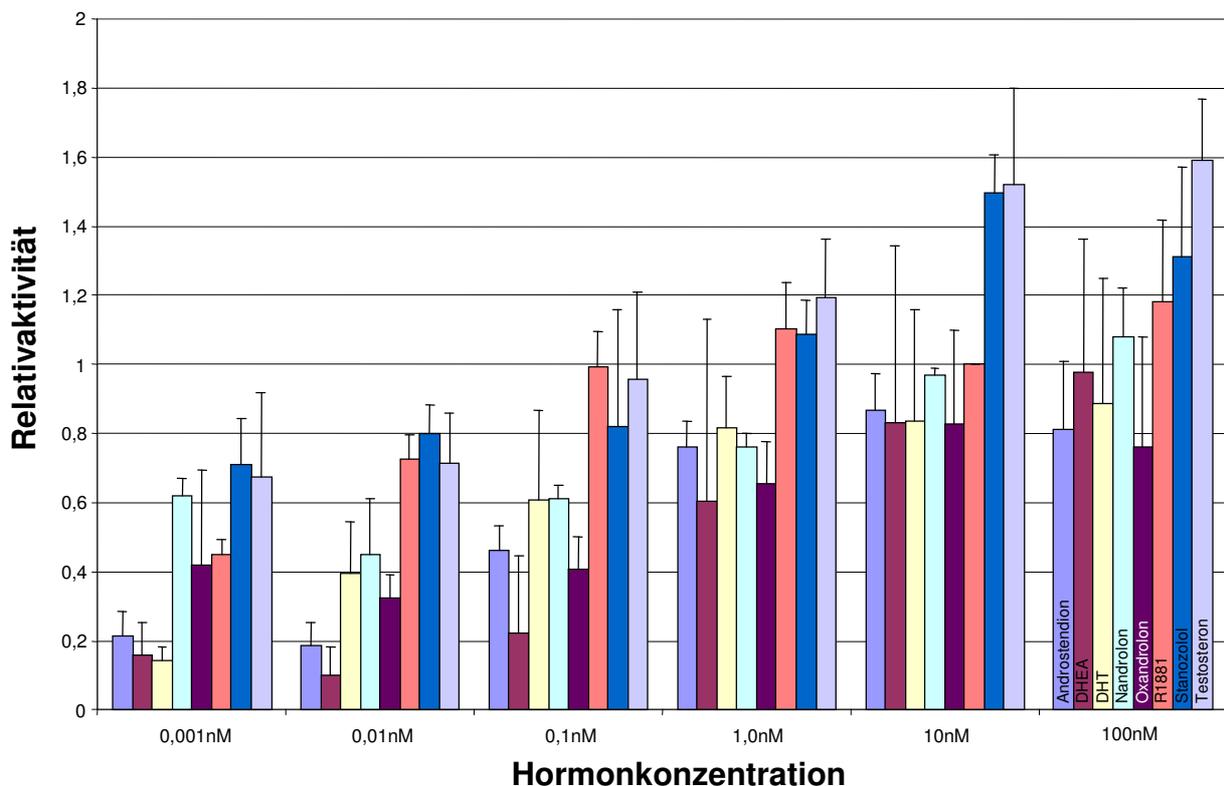


Abb. 3-2: Relativaktivität der Hormone in allen Konzentrationen am MMTV-luc-Reportergen; als Fehlerindikator die Standardabweichung aus drei Versuchen; farbige Zuordnung siehe 100nM

Androstendion und Dehydroepiandrosteron als physiologische Testosteron-Vorstufen zeigen bei niedrigen Konzentrationen relativ *geringe*, bei höheren Konzentrationen *durchschnittliche* Aktivität, bei Androstendion 0,21 (mit einer Standardabweichung von $\pm 0,07$) bei 0,001nM bis hin zu 0,81 ($\pm 0,20$) bei 100nM und DHEA mit 0,16 ($\pm 0,01$) bei 0,001nM und 0,98 ($\pm 0,38$) bei 100nM.

Eine relativ *hohe* Aktivität am MMTV-luc-Reporter gen zeigt Testosteron mit einer Relativaktivität von 0,68 ($\pm 0,24$) bei 0,001nM und bei 100nM von 1,59 ($\pm 0,18$) an.

Eine durchweg *geringere* Aktivität als das synthetische Androgen R1881 zeigt das physiologische DHT mit einer Relativaktivität von 0,14 ($\pm 0,04$) bei 0,001nM und 0,89 ($\pm 0,36$) bei 100nM, R1881 mit 0,45 ($\pm 0,27$) bei 0,001nM und mit 1,18 ($\pm 0,24$) bei 100nM.

Die Relativaktivität von R1881 am MMTV-luc-Reporter gen erreicht dabei bereits bei 1nM ein Plateau ohne weitere signifikant stärkere Aktivität in höheren Konzentrationen.

Die Aktivität der anabolen Steroide liegt weitestgehend im Bereich der anderen Hormone mit der höchsten Aktivierung durch Stanozolol, 0,71 ($\pm 0,13$) bei 0,001nM und 1,31 ($\pm 0,26$) bei 100nM. Stanozolol zeigt damit eine *höhere* Aktivität bei Konzentrationen von ≥ 10 nM als R1881 und erreicht Werte, die mit denen von Testosteron vergleichbar sind.

Oxandrolon zeigt von den drei Anabolika eine relativ *geringe* Aktivität mit 0,42 ($\pm 0,27$) bei 0,001nM und 0,76 ($\pm 0,32$) bei 100nM und die Aktivität reicht bei Nandrolon von 0,62 ($\pm 0,05$) bei 0,001nM und 1,08 ($\pm 0,14$) bei 100nM.

Die ausführlichen Messergebnisse sind im Anhang in der Wertetabelle 6-1 wiedergegeben.

3.2.2. GRE-OCT-luc-Reporter gen

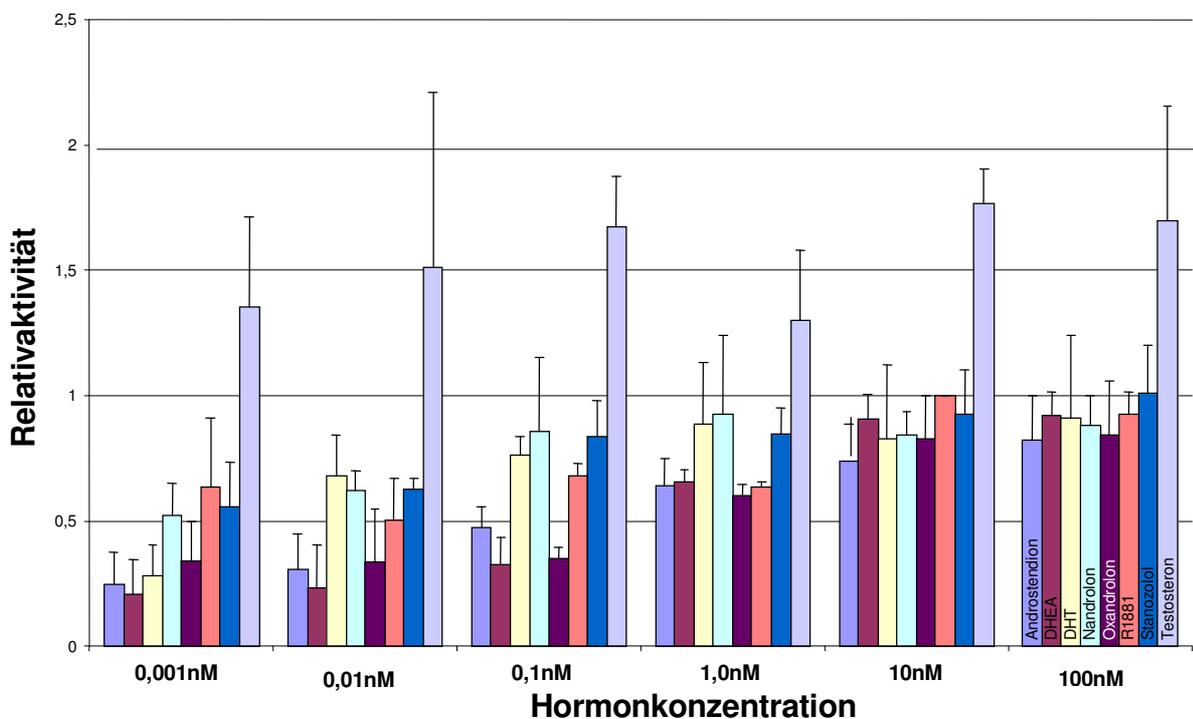


Abb. 3-3: Relativaktivität der Hormone in allen Konzentrationen am GRE-OCT-luc-Reporter gen; als Fehlerindikator die Standardabweichung aus drei Versuchen; farbige Zuordnung siehe 100nM

Abbildung 3-3 zeigt, dass bei dem GRE-OCT-luc-Reporter gen ebenfalls eine konzentrationsabhängige Aktivierung vorliegt. Diese liegt im überwiegenden Bereich in der Höhe der Aktivität des MMTV-luc-Reporter gens.

Testosteron hat ebenfalls wie am MMTV-luc-Reporter gen die *höchste* Aktivität mit 1,36 ($\pm 0,36$) bei 0,001nM und mit 1,70 ($\pm 0,46$) bei 100nM. Die anderen Steroide zeigen insgesamt eine deutlich geringere Aktivität.

Androstendion, mit einer Aktivität von 0,24 ($\pm 0,13$) bei 0,001nM bis zu 0,64 ($\pm 0,10$) bei 1,0nM, und DHEA, mit einer Aktivität von 0,21 ($\pm 0,14$) bei 0,001nM und 0,65 ($\pm 0,05$) bei 1,0nM zeigen auch bei diesem Reporter gen eine relativ *geringe* bei niedrigen Konzentrationen und darüber eine *durchschnittliche* Aktivität.

Bei den Androgenen DHT und R1881 und bei den Anabolika Stanozolol und Nandrolon liegen die gemessenen Relativaktivitäten in einem *vergleichbaren* Bereich, wobei nur DHT bei 0,001nM mit 0,28 ($\pm 0,12$) eine etwas *geringere* Aktivität als die anderen drei zeigt. Bei R1881 steigt die Aktivität von 0,64 ($\pm 0,27$) bei 0,001nM bis hin zu 0,93 ($\pm 0,09$) bei 100nM an.

Das Anabolikum Oxandrolon ruft bei Konzentrationen bis 1nM eine *ähnliche* Aktivität hervor wie Androstendion und DHEA. Die Aktivität von Oxandrolon steigt von 0,34 ($\pm 0,16$) bei 0,001nM bis hin zu 0,85 ($\pm 0,21$) bei 100nM an.

Bis auf Testosteron mit einer höheren Aktivität zeigen alle anderen verwendeten Steroide eine *vergleichbar* starke Aktivität bei Konzentrationen ≥ 10 nM.

Die ausführlichen Messergebnisse sind im Anhang in der Wertetabelle 6-2 angegeben.

3.2.3. pRE₂-TATA-luc-Reporter gen

Abbildung 3-4 zeigt die Relativaktivitäten am pRE₂-TATA-luc-Reporter gen. Mit ansteigender Hormonkonzentration kommt es zu einer progredienten Aktivität der verwendeten Hormone. Bei diesem Reporter gen zeigt sich eine deutlichere Variabilität zwischen den einzelnen Steroiden als bei den anderen Reporter genen.

Die androgenen Steroide Testosteron, DHT und R1881 rufen beim TATA-luc-Reporter gen die *stärkste* Aktivität hervor. Außerdem liegen die Relativaktivitäten dieser drei Steroide weitestgehend in dem selben Größenbereich. Testosteron hat bei 0,001nM eine Aktivität von

0,31 ($\pm 0,23$) und bei 100nM von 1,02 ($\pm 0,14$). DHT zeigt bei einer Konzentration von 0,001nM eine *geringere* Aktivität.

Vergleichbare Werte zeigt hierzu Nandrolon mit 0,07 ($\pm 0,03$) bei 0,001nM und 0,86 ($\pm 0,12$) bei 100nM.

Stanozolol ruft, interessanterweise, nahezu in allen Konzentrationen die signifikant *geringste* Aktivität hervor. Bei 0,001nM liegt sie bei 0,02 ($\pm 0,01$) und bei 100nM bei 0,40 ($\pm 0,27$). Die Aktivität ist signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$) *geringer* am TATA-luc- als an der anderen Reporter genen.

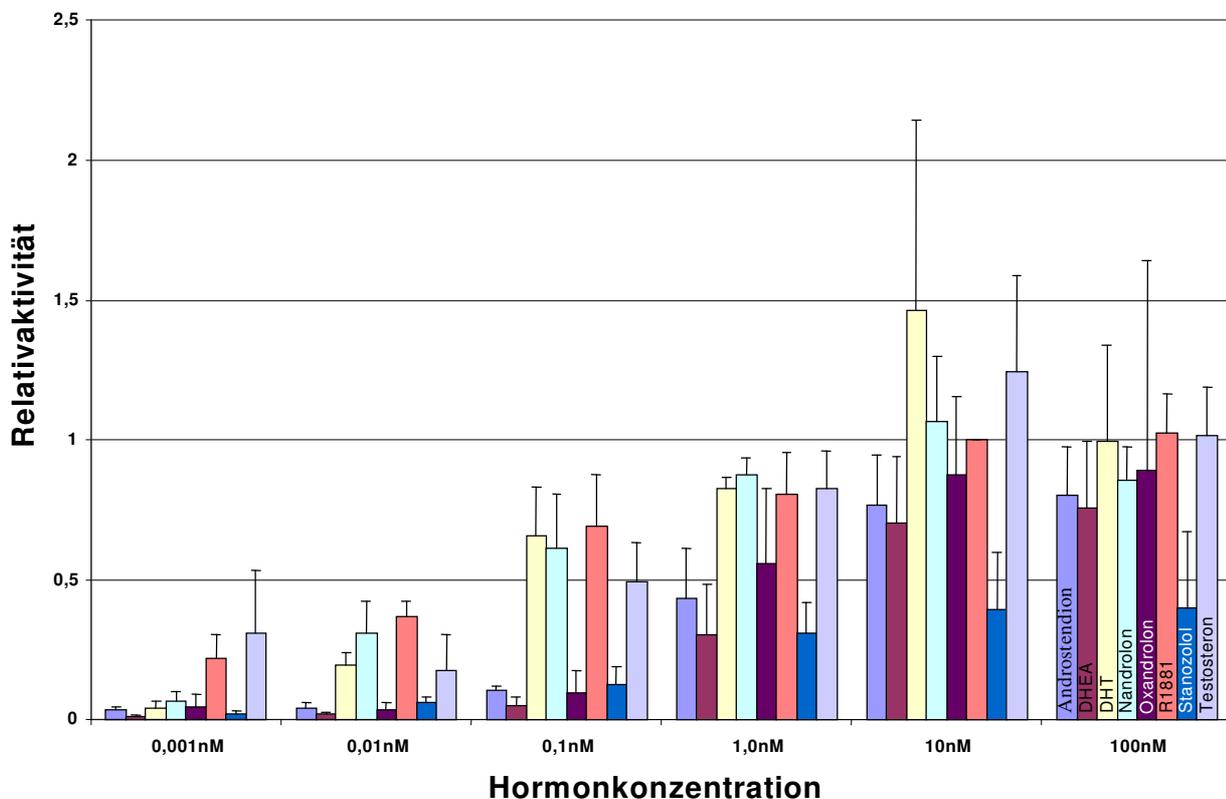


Abb. 3-4: Relativaktivität der Hormone in allen Konzentrationen unter Verwendung des pRE_2 -TATA-luc-Reportergens; als Fehlerindikator die Standardabweichung aus drei Versuchen; farbige Zuordnung siehe 100nM

In geringen Konzentrationen bis 1,0nM rufen auch DHEA, Androstendion und Oxandrolon *schwächere* Aktivitäten als an den anderen Reporter genen hervor. Bei Oxandrolon steigt die Aktivität von 0,04 ($\pm 0,05$) bei 0,001nM über 0,09 ($\pm 0,03$) bei 0,1nM bis zu vergleichbar hohen Werten bei 100nM mit 0,89 ($\pm 0,75$) an.

Die vollständigen Messergebnisse sind im Anhang in der Wertetabelle 6-3 aufgeführt.

3.3. Konzentrationsabhängige Reporterogenaktivierungsprofile

3.3.1. Hormonkonzentration 0,001nM

Die verwendeten Steroide besitzen bei einer Konzentration von 0,001nM eine durchweg *niedrigere* Aktivität am TATA- im Gegensatz zum MMTV- und GRE-OCT-Reportergen. Nach statistischer Auswertung mittels des T-Testes nach Student für unverbundene Stichproben erkennt man einen *hoch signifikanten* Unterschied (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$) bei Stanozolol und einen *sehr signifikanten* Unterschied ($p < 0,01$) bei Nandrolon. Bei DHT und Androstendion zeigt sich ein *signifikanter* Unterschied ($p < 0,05$) zwischen TATA-luc und MMTV-/GRE-OCT-luc.

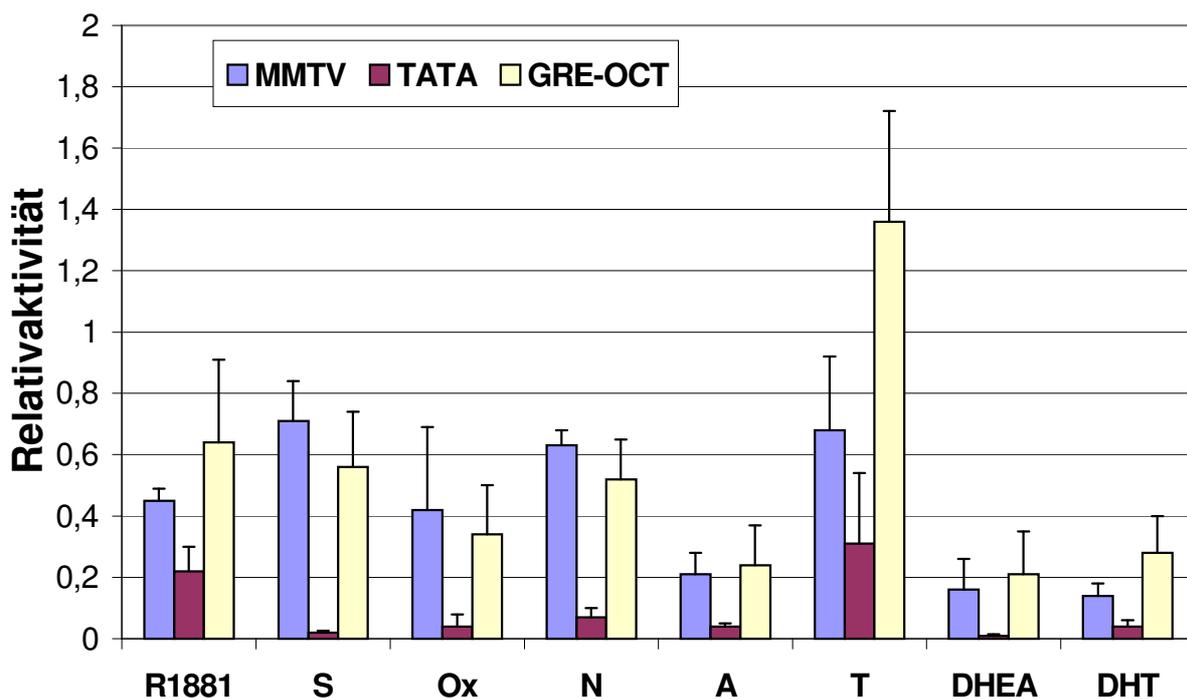


Abb. 3-5: Darstellung der Relativaktivität der Hormone mit einer Konzentration von 0,001nM in Abhängigkeit der Reporter gene; als Fehlerindikator Angabe der Standardabweichung aus drei Versuchen

Einen *signifikanten* Unterschied zwischen TATA- und MMTV-luc ($p < 0,05$) nicht aber zwischen TATA- und GRE-OCT-luc ($p < 0,10$) gibt es bei R1881. Oxandrolon zeigt dagegen

einen *signifikanten* Unterschied zwischen TATA- und GRE-OCT-luc. Bei DHEA liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit bei kleiner 0,10, somit liegt hier *kein signifikanter* Unterschied vor.

3.3.2. Hormonkonzentration 0,01nM

Die Aktivität am TATA-luc- im Vergleich zu den anderen Reportergenen erscheint insgesamt kleiner (Abb. 3-6). Diese Differenz ist bei Oxandrolon *sehr signifikant* und bei Stanozolol und interessanterweise auch bei Testosteron *signifikant*. Bei Androstendion zeigt sich ein *signifikanter* Unterschied zwischen TATA- und MMTV-luc und nicht zwischen TATA- und GRE-OCT-luc ($p < 0,10$). Ein *sehr signifikanter* Unterschied wird unter Verwendung von DHT zwischen TATA- und GRE-OCT-luc deutlich.

Bei R1881, Nandrolon und DHEA ist *kein signifikanter* Unterschied zu beobachten.

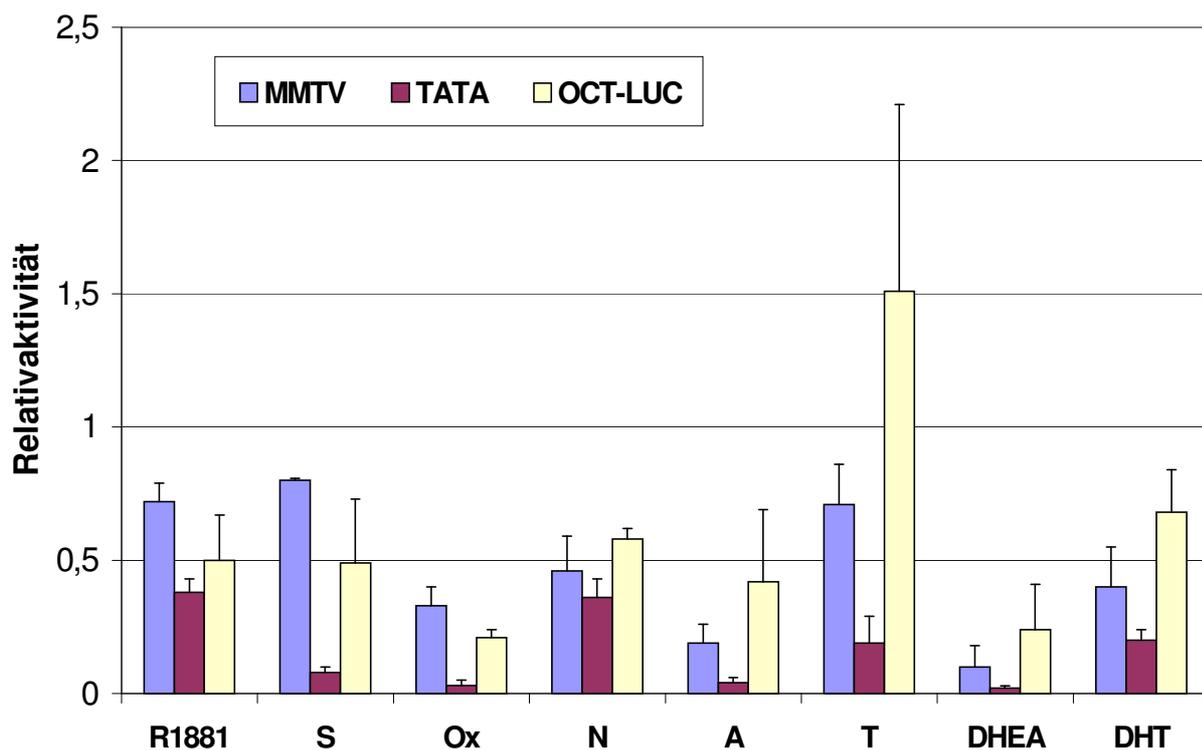


Abb. 3-6: Darstellung der Relativaktivität der Hormone mit einer Konzentration von 0,01nM in Abhängigkeit der Reportergene; als Fehlerindikator Angabe der Standardabweichung aus drei Versuchen

3.3.3. Hormonkonzentration 0,1nM

Signifikante Unterschiede zwischen den Relativaktivitäten bei Verwendung des TATA-luc gegenüber den anderen Reporter genen zeigen sich bei Stanozolol und bemerkenswerterweise bei Testosteron. Bei Androstendion ist der Unterschied zwischen GRE-OCT- und TATA-luc *sehr signifikant*, zwischen MMTV- und TATA-luc *hochsignifikant*.

Bei DHEA ergibt sich ein *signifikanter* Unterschied zwischen TATA-luc im Gegensatz zu MMTV-luc, bei TATA- und GRE-OCT-luc zeigt sich *kein signifikanter* Unterschied ($p < 0,10$). Demgegenüber besteht bei Oxandrolon ein *sehr signifikanter* Unterschied zwischen TATA- und GRE-OCT-luc.

Keinen signifikanten Unterschied gibt es zwischen den drei Reporter genen bei R1881, Nandrolon und DHT.

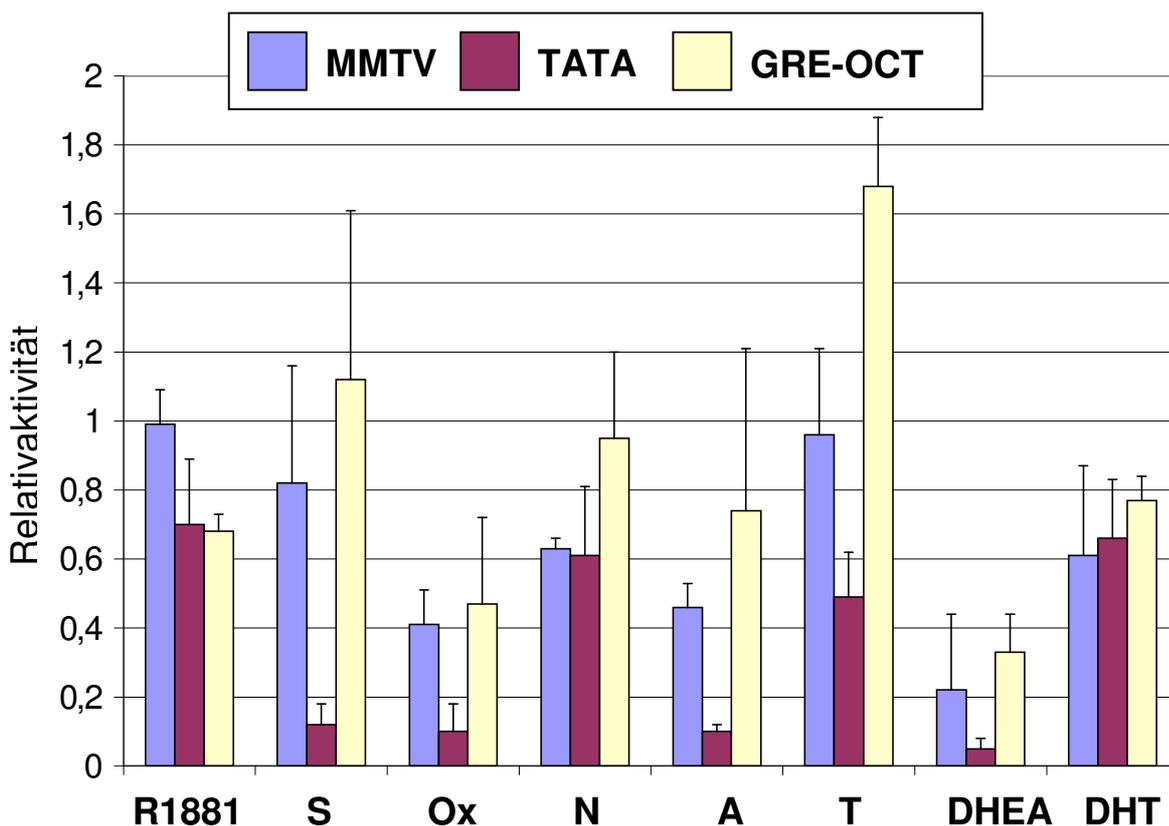


Abb. 3-7: Darstellung der Relativaktivität der Hormone mit einer Konzentration von 0,1nM in Abhängigkeit der Reporter gene; als Fehlerindikator Angabe der Standardabweichung aus drei Versuchen

3.3.4. Hormonkonzentration 1,0nM

Bei einer Konzentration von 1,0nM gibt es einen *sehr signifikanten* Unterschied zwischen der Relativaktivität unter Verwendung des TATA-luc- im Vergleich zu den GRE-OCT-/MMTV-luc-Reportergenen bei Stanozolol. Bei DHEA liegt zwischen GRE-OCT- und TATA-luc ein *signifikanter* Unterschied vor, zwischen MMTV- und TATA-luc zeigt sich *kein signifikanter* Unterschied.

Bei Untersuchung der übrigen Hormone zeigt sich insgesamt *kein* Unterschied in den Aktivitäten bei Verwendung der verschiedenen Reportergene.

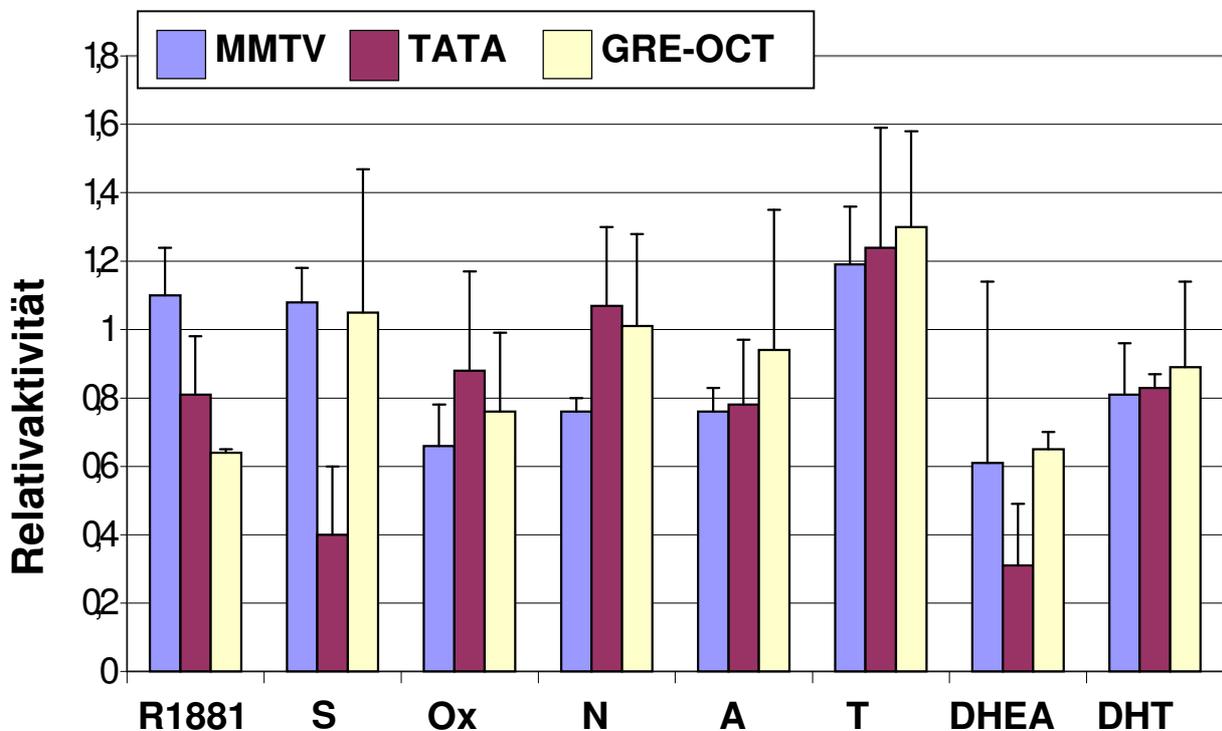


Abb. 3-8: Darstellung der Relativaktivität der Hormone mit einer Konzentration von 1,0nM in Abhängigkeit der Reportergene; als Fehlerindikator Angabe der Standardabweichung aus drei Versuchen

3.3.5. Hormonkonzentration 10nM

Die Ergebnisse der 10nM Konzentration ähneln den Ergebnissen bei 1,0nM. Der deutlichste Unterschied zwischen den Reportergenen liegt bei Stanozolol vor. Beim Vergleich zwischen

TATA- und MMTV-luc wird ein *sehr signifikanter*, zwischen TATA- und GRE-OCT-luc ein signifikanter Unterschied vor.

Bei den anderen verwendeten Hormonen gibt es ebenfalls *keinen signifikanten* Unterschied zwischen den einzelnen Reportergenen.

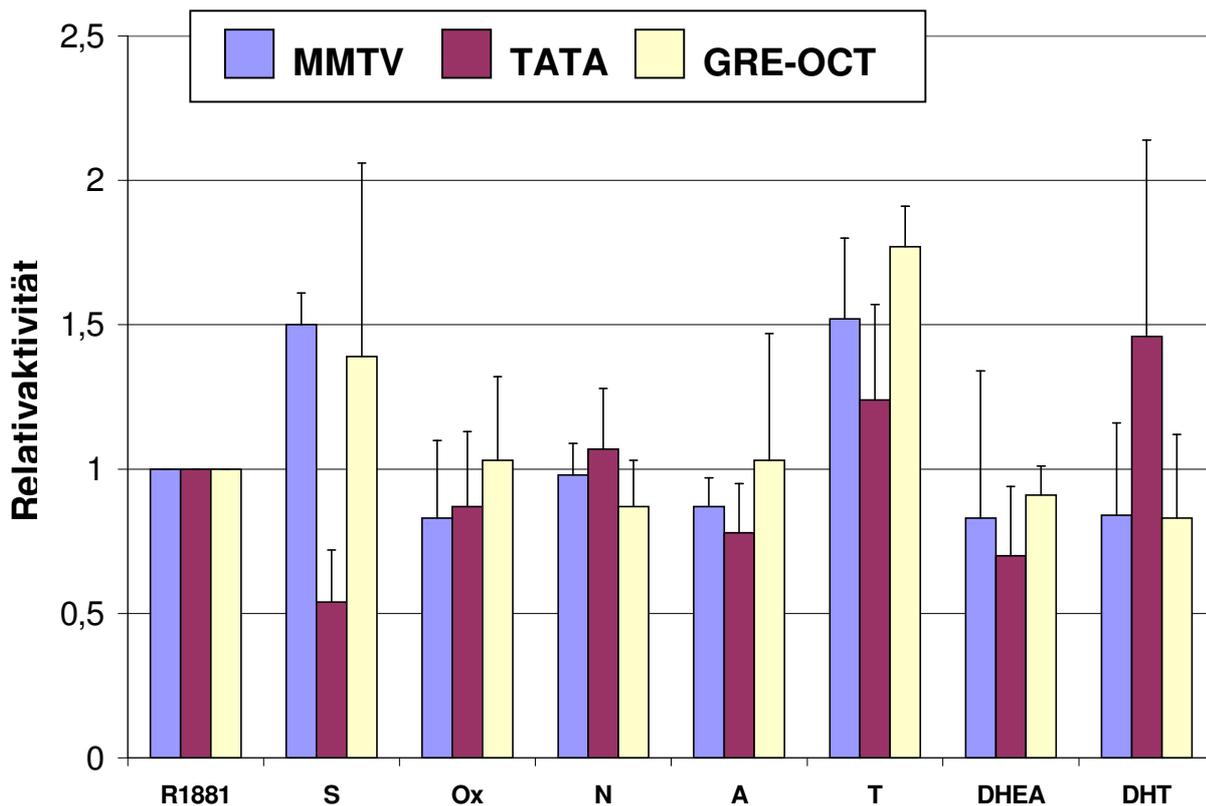


Abb. 3-9: Darstellung der Relativaktivität der Hormone mit einer Konzentration von 10nM in Abhängigkeit der Reportergene; als Fehlerindikator Angabe der Standardabweichung aus drei Versuchen

3.3.6. Hormonkonzentration 100nM

Stanozolol als Ligand am Androgenrezeptor hat einen *signifikanten* Aktivitätsunterschied zwischen TATA-luc im Gegensatz zu MMTV- und GRE-OCT-luc.

Zusätzlich wird ein *signifikanter* Unterschied bei Testosteron zwischen TATA- und MMTV-luc deutlich.

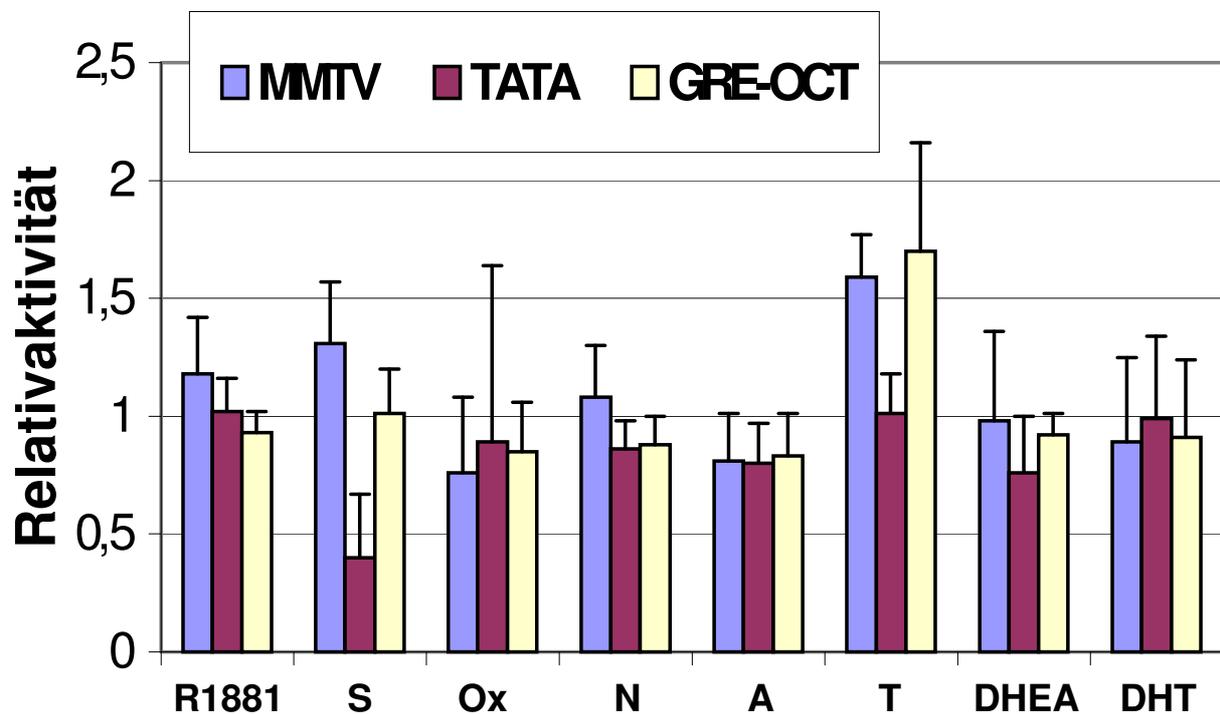


Abb. 3-10: Darstellung der Relativaktivität der Hormone mit einer Konzentration von 100nM in Abhängigkeit der Reportergene; als Fehlerindikator Angabe der Standardabweichung aus drei Versuchen

Die anderen Steroide zeigen in dieser Konzentration *keinen signifikanten* Unterschied zwischen den Aktivitäten unter Verwendung der verschiedenen Reportergene.

3.4. Hierarchische Clusteranalyse der Reportergenaktivitäten

Durch die hierarchische Clusteranalyse können komplexe Daten von Genexpressionsprofilen dargestellt werden. Dabei werden die Hormone anhand ihres Aktivitätsmusters an den verschiedenen Reportergenen untersucht und solche mit einem ähnlichen Genexpressionsprofil nebeneinander gestellt.

Die Reportergenaktivierungsprofile im vorliegenden Versuch führen zu einer Unterteilung der verwendeten Steroide in zwei Gruppen, die anhand des Stammbaumes visualisiert werden

konnten. Am deutlichsten ist der Unterschied der Expressionsprofile der einzelnen Hormone am TATA-luc-Reportergen.

Die physiologischen Androgene Testosteron und Dihydrotestosteron, das synthetische Androgen R1881 und das noch stark virilisierende Anabolikum Nandrolon bilden eine Gruppe mit einer durchschnittlich *hohen* Aktivität (rote Punkte).

Innerhalb dieser Gruppe zeigen DHT, Nandrolon und R1881 ein ähnliches Aktivitätsprofil an allen drei Reportergenen. Testosteron wird aufgrund seiner hohen Aktivität am GRE-OCT- und MMTV-luc-Reportergen innerhalb dieser Hauptgruppe extra bewertet.

Am TATA-luc-Reportergen ist die Aktivität der Hormone dieser Gruppe durchschnittlich hoch.

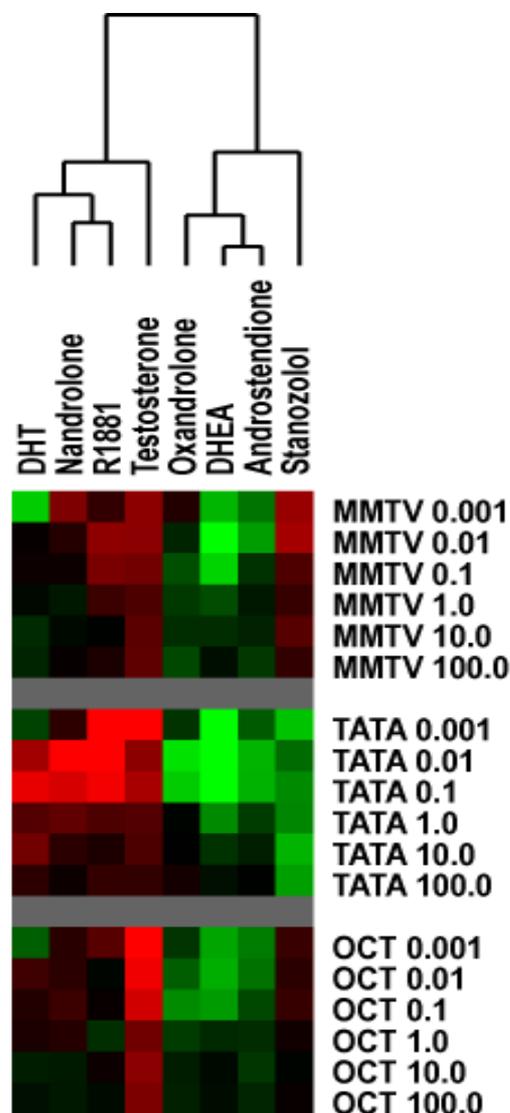


Abb. 3-11: Hierarchische Clusteranalyse der Aktivitätsprofile der Hormone an den Reportergenen (Erläuterung siehe Text)
Die Legende zeigt die farbliche Zuordnung der Aktivität gegenüber der Durchschnittsaktivität an.



Die Anabolika Stanozolol und Oxandrolon und die Testosteron-Vorstufen Androstendion und Dehydroepiandrosteron bilden die zweite Hauptgruppe. Diese Steroide zeigen ein durchschnittlich *geringes* Aktivitätsprofil (grüne Punkte).

Besonders ähnlich werden DHEA, Androstendion und Oxandrolon bewertet, die an allen Reportergeräten eine geringe Aktivität hervorrufen. Demgegenüber wird Stanozolol durch die relativ hohe Aktivität am MMTV- und GRE-OCT-luc-Reportergeräten bezogen auf DHEA, Androstendion und Oxandrolon separat innerhalb der Hauptgruppe eingeteilt.

Am TATA-luc-Reportergeräten ist das Aktivitätsprofil der vier Steroide dieser Gruppe durchschnittlich gering.

3.5. Negativkontrollen

Eine androgenrezeptorunabhängige Aktivierung wurde in den Versuchen ohne Androgenrezeptor-Expressionplasmid untersucht. Abbildung 3-12 zeigt die Ergebnisse der Versuche von Testosteron am MMTV-luc-Reportergeräten.

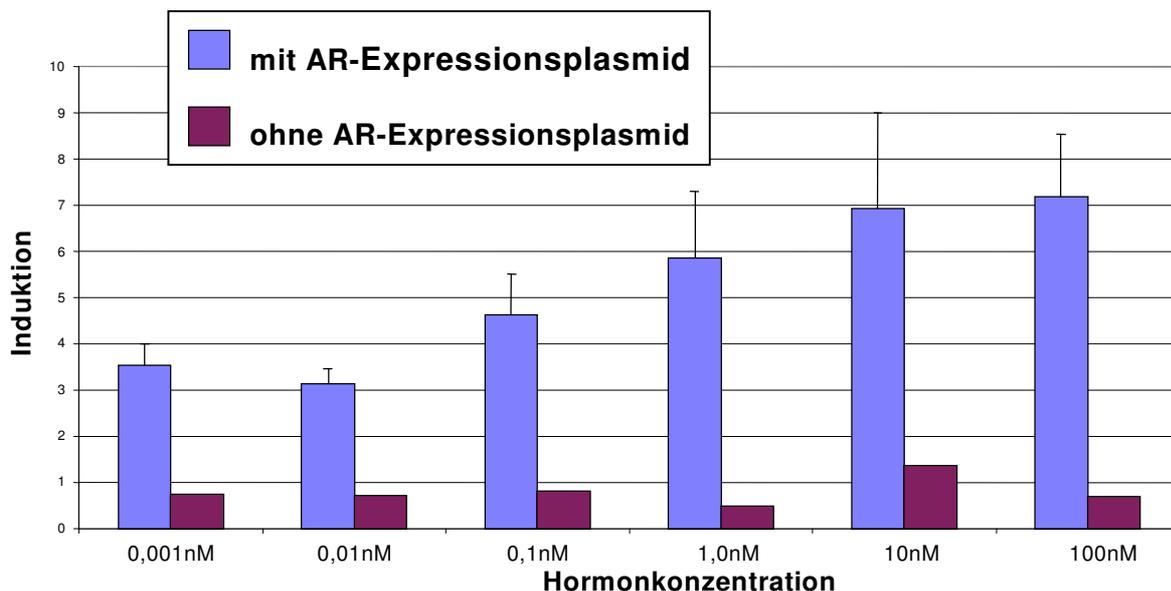


Abb. 3-12: Darstellung der Induktion von Testosteron in Abhängigkeit der Konzentration mit und ohne Androgenrezeptor-Expressionplasmid; Messung am MMTV-luc-Reportergeräten; Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen

Mit dem Androgenrezeptor im Versuchsansatz resultiert eine konzentrationsabhängige Aktivierung. Die Induktion steigt von 3,54 (±0,46) bei 0,001nM Testosteron bis zu 7,19 (±1,36) bei 100nM. Im Gegensatz dazu kommt es bei Abwesenheit eines AR-

Expressionsplasmides zu keiner relevanten Reporterinduktion. Das Gleiche gilt für die beiden anderen Reportergene (TATA-luc und GRE-OCT-luc) und alle daran untersuchten Hormone. In Abbildung 3-13 sind die Ergebnisse von Stanozolol am GRE-OCT-luc-Reporter gen dargestellt.

Die Messergebnisse sind in den Wertetabellen 6-4, 6-5 und 6-6 aufgeführt.

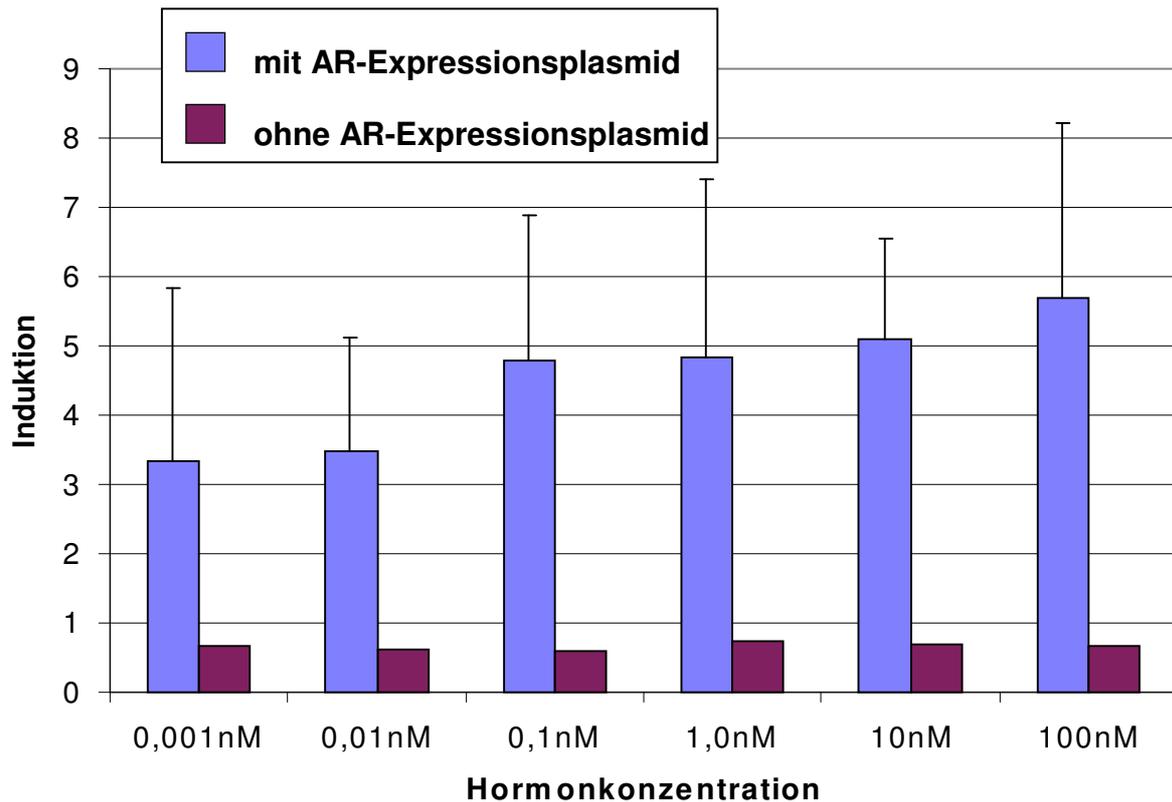


Abb. 3-13: Darstellung der Stanozolol-induzierten Induktion in Abhängigkeit der Konzentration mit und ohne Androgenrezeptor-Expressionsplasmid; Messung am GRE-OCT-luc-Reporter gen; Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen

3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die Transfektion des Androgenrezeptor-Expressionsplasmides exprimieren die CHO-Zellen den Androgenrezeptor.

Dieser wird durch alle verwendeten Hormone aktiviert. Die Aktivität ist abhängig von der Hormonkonzentration und vom Reporter gen. Mit ansteigender Ligandenkonzentration resultiert eine progrediente Aktivierung des Androgenrezeptors.

Der Vergleich der verschiedenen Reportergene untereinander zeigt, dass bei Verwendung des selben Hormons an verschiedenen Reportergenen eine unterschiedliche Aktivität hervorgerufen wird.

Die Steroide lassen sich anhand des spezifischen Profiles aktivierter Reportergene in zwei Gruppen einteilen: die Anabolika Stanazolol und Oxandrolon und die Testosteron-Vorläufer Androstendion und Dehydroepiandrosteron in der einen Gruppe, im Gegensatz zu den Androgenen DHT, Testosteron und R1881 und ebenfalls das anabole Steroid Nandrolon mit einer relativ starken virilisierenden Restwirkung.

Stanozolol zeigt eine *durchschnittliche bis hohe* Aktivität am MMTV- und GRE-OCT-luc- jedoch eine *geringe* Aktivität unter Verwendung des TATA-luc-Reportergens.

Zum Ausschluss einer androgenrezeptorunabhängigen Aktivierung, wurden Transfektionen ohne Androgenrezeptor-Expressionsplasmid durchgeführt. Die Negativkontrollen zeigten keine Reporterinduktion in Abwesenheit des Expressionsplasmides.

4. Diskussion

4.1. Aussagekraft des verwendeten Zellkulturmodelles

Der Mechanismus der unterschiedlichen Wirkungen virilisierender, anaboler und adrenaler Androgene in-vivo konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob diese unterschiedlichen biologischen Wirkungen grundsätzlich durch unterschiedliche, liganden-spezifische Aktivierungsprofile des Androgenrezeptors auf Zielgenebene verursacht sein könnten. Um ein solches, bisher nicht bekanntes biologisches Prinzip der Androgenwirkung auf Zielgenebene experimentell erfassen zu können, wurde ein vereinfachtes in-vitro Modell als Versuchsaufbau entwickelt.

Es wurden Transaktivierungsuntersuchungen mit CHO-Zellen und drei strukturell unterschiedlichen Reportergenen - MMTV-, GRE-OCT- und pRE₂-TATA-luc – durchgeführt. Obwohl diese Reportergene sich deutlich im molekularen Aufbau ihrer Promoterregion unterscheiden, sind sie jeweils eindeutig androgen reguliert. Die verwendeten Reportergene können daher ein theoretisches Modell als Annäherung für natürliche androgene Zielgene mit unterschiedlicher Promoterregion darstellen.

Als Steroidhormonrezeptor wurde der humane Androgenrezeptor verwendet, der mittels Transfektion des Androgenrezeptor-Expressionplasmides in die CHO-Zellen integriert wurde. Über Transaktivierung konnte die ligandenspezifische Aktivität an den Reportergenen quantitativ erfasst werden.

Trotz allem geben die Ergebnisse aus diesem einfachen Modell *Hinweise* auf mögliche in-vivo Mechanismen der Hormonregulation.

Anhand des vorliegenden Versuchsaufbaues konnte gezeigt werden, dass alle acht verwendeten Steroide zu einer spezifischen Androgenrezeptoraktivierung geführt haben. Dieses war für viele der verwendeten Substanzen bislang noch nicht experimentell gezeigt worden (Stanozolol, Oxandrolon, DHEA, Androstendion).

Um einen Einfluss anderer Steroidhormonrezeptoren auszuschließen, wurden Negativkontrollen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass in den Versuchen ohne Androgenrezeptor-Expressionsplasmid durch alleinige Transfektion des Reportergen-

plasmids keine relevante Aktivität hervorgerufen wurde. Diese Resultate wurden für alle Hormone an allen drei Reporter genen erzielt.

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass im angewendeten Versuchsaufbau ein relevanter Einfluss anderer Steroidhormonrezeptoren außer dem Androgenrezeptor nicht vorliegt, die gemessenen Effekte demnach spezifisch durch den Androgenrezeptor ausgelöst wurden.

Bezüglich einer konkreten Relevanz der Ergebnisse muss bedacht werden, dass das verwendete vereinfachte Modell nur bedingt die in-vivo Verhältnisse reflektieren kann. Gewebespezifische Verteilungsmuster von Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Metabolisationsenzyme von Hormonen wurden beispielsweise nicht berücksichtigt, da nur CHO-Zellen verwendet wurden.

In einigen Arbeiten wurde beschrieben [16,39], dass in CHO-Zellen die 5 α -Reduktase zumindest in einer geringen Konzentration vorkommt. Damit müsste eine geringfügig veränderte, ligandenkonzentrationsabhängige Aktivität durch Testosteron erzielt werden als in Zellen ohne 5 α -Reduktase. Testosteron würde zu DHT metabolisiert und hätte dadurch ein differentielles Wirkprofil.

Der Versuchsaufbau als einfaches Modell natürlicher Verhältnisse zeigt jedoch Hinweise auf die Existenz bisher nicht bekannter Aspekte in der zellulären Wirkung androgener und anaboler Steroide, die analog auch in-vivo eine Rolle spielen könnten.

Die differentiellen Wirkungen von androgenen und anabolen Steroiden, die klinisch beobachtet werden, könnten somit durch eine hormonspezifische Interaktion des Liganden mit dem Androgenrezeptor und dementsprechend durch eine spezifische Aktivierung unterschiedlicher Zielgene erklärt werden.

Die große Streubreite der in-vivo gewonnenen Erkenntnisse lässt weitergehende Faktoren bezüglich der unterschiedlichen Wirkungen virilisierender, anaboler und adrenaler Androgene vermuten. Hierzu zählen neben zellspezifischen Verhältnissen und differentiellen Interaktionen mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren, die auch aus den Ergebnissen dieser Arbeit vermutet werden müssen, gewebe – und zellspezifische Verteilungsmuster der natürlichen Liganden und ihrer Metabolite in-vivo, die in in-vitro-Versuchen nur sehr bedingt imitiert werden können.

4.2. Differentielles Profil aktivierter Reportergene

Die gemessenen Reporteraktivitäten in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration am jeweiligen Promoter wurden durch eine nicht-supervidierte, hierarchische Clusternalyse kategorisiert. Bei solch einer Analyse wird keine Hypothese aufgrund möglicherweise bekannter Gemeinsamkeiten eingesetzter Hormone durch den Untersucher vorgegeben. Diese Methode wurde aus der funktionellen Genomik adaptiert [19,38] und basiert statistisch auf der Pearson Korrelation.

Auf diese Weise kam es zur Darstellung unterschiedlicher Aktivierungsprofile der drei Promoter für die einzelnen, eingesetzten Liganden. Darüber hinaus zeigte sich in dieser Analyse, dass bestimmte Steroidhormone ähnliche Aktivierungsprofile aufwiesen und sich dadurch von anderen Steroiden unterscheiden ließen.

Die physiologischen Androgene Testosteron und DHT und das synthetische Androgen R1881 zeigten ein ähnliches Profil und wurden interessanterweise der selben Gruppe zugeordnet. Diese Tatsache korreliert sehr schön mit ihrer gemeinsamen, virilisierenden Wirkung *in vivo*.

Innerhalb dieser Gruppe ruft Testosteron am GRE-OCT-luc-Reporter eine bis zu zweimal so starke und am MMTV-luc-Reporter eine leicht höhere Aktivität gegenüber DHT hervor.

Unterstützt werden die Ergebnisse durch Kemppainen et al. [45]. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Aktivität von DHT und Testosteron am MMTV-luc-Reporter in CV1-Zellen. Es zeigte sich, dass DHT bei Konzentrationen bis 0,1nM eine geringere Aktivität hervorrief als Testosteron in den gleichen Konzentrationen.

Demgegenüber konnte die Arbeitsgruppe Deslypere et al. [16] bei Konzentrationen bis 0,1nM eine bis zu 10fach höhere Aktivität durch DHT als durch Testosteron am MMTV-luc-Reporter zeigen. Dies könnte durch den stabileren Ligand-Rezeptor-Komplex durch DHT am Androgenrezeptor erklärt werden, der von Zhou et al. [95] gezeigt werden konnte.

Die Variabilität der androgeninduzierten Aktivität, wie sie in der Literatur gefunden wurde, könnte zumindest teilweise durch zell- und versuchsspezifische Unterschiede hervorgerufen sein. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass unter physiologischen Konditionen die Interaktionen zwischen Liganden, Rezeptoren, HRE's

und Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichen Relationen zueinander stehen können, die nicht vollständig durch Versuchsmodelle kopiert werden können.

Die hier vorgestellten eigenen Ergebnisse erweitern die Beobachtungen der zitierten Arbeiten. Sie zeigen, dass die Auswirkungen verschiedener Liganden in ihrer Interaktion mit dem Androgenrezeptor an differierenden Zielgenen unterschiedlich sein können.

Am TATA-luc-Reporter gen hat DHT eine in etwa gleich hohe Aktivität wie Testosteron. Bei 0,1 und 10nM ruft DHT eine geringfügig höhere Aktivität als Testosteron hervor, bei 0,01 und 1,0nM zeigt Testosteron demgegenüber eine stärkere Aktivität als DHT.

Die untersuchten anabolen Steroide Stanozolol, Nandrolon und Oxandrolon wiesen ebenfalls spezifische Aktivierungsprofile auf. Nandrolon zeigt ein Aktivitätsmuster ähnlich den Androgenen Testosteron, DHT und R1881. Interessanterweise ist Nandrolon das Anabolikum mit der höchsten androgenen Restwirkung im Vergleich mit den anderen verwendeten Anabolika. Dies könnte eine Erklärung für ein „androgenes“ Aktivitätsprofil von Nandrolon im untersuchten Modell sein, wobei nochmals darauf hingewiesen werden sollte, dass es sich nicht um konkrete, tatsächliche Zielgene des Androgenrezeptors handelt.

Die beiden anderen Anabolika Stanozolol und Oxandrolon wurden demgegenüber durch die Clusteranalyse in die zweite Gruppe eingeordnet. Oxandrolon ruft bei allen drei Reporter genen eine relativ geringe Aktivität hervor. Ein ähnliches Aktivitätsprofil haben die Testosteron-Vorstufen Androstendion und DHEA.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass DHEA und Androstendion potente Aktivatoren des Androgenrezeptors sind und reporter genspezifische Aktivierungsprofile hervorrufen.

Obwohl die Testosteron-Vorstufen ein ähnliches Aktivitätsmuster wie die anabolen Steroide zeigen, kann daraus nicht direkt geschlossen werden, dass das hier genannte Modell androge und anabole Steroide eindeutig unterscheiden kann. Dies wird bestätigt durch die Arbeitsgruppe Rasmussen et al. [72], die gezeigt haben, dass Androstendion nur geringe anabole Effekte in-vivo hervorruft.

Die in-vitro Ergebnisse von DHEA und Androstendion mit der gezeigten spezifischen Androgenrezeptoraktivierung in Verbindung mit in-vivo Erkenntnissen (z.B. partielle Virilisierung und Differenzierung des Wolff'schen Ganges bei 17 β -HSD-Defekt) zeigen,

dass diese Vorstufen als lokale Faktoren in die androgenabhängige Morphogenese der männlichen Sexualdifferenzierung eingebunden sein könnten.

Aus in-vitro Versuchen ist bekannt, dass die Wirkungen der Steroidhormone über HRE's der DNA vermittelt werden. Die Effekte sind spezifisch für einzelne Rezeptoren [13,68,75,89]. Durch die jeweiligen Rezeptoren resultieren unterschiedliche Wirkungen am selben HRE.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass unterschiedliche biologische Wirkungen in-vivo durch liganden-spezifische Interaktionen des Hormon-Rezeptor-Komplexes mit spezifischen Zielgenen der DNA vermittelt werden könnten.

4.3. Alternative Möglichkeiten für die differentielle Wirkungsvermittlung von anabolen und virilisierenden Androgenen

Ellis et al. [21] beschrieben eine zumindest partielle Interaktion des anabolen Steroides Stanazolol mit dem Progesteronrezeptor. Der gleiche Wirkungsmechanismus und ein ähnlicher Aufbau der verschiedenen Rezeptoren in der Steroidhormonrezeptorsuperfamilie legen zudem Interaktionen mit anderen Rezeptoren dieser Gruppe nahe.

Eine Interaktion des Androgenrezeptors mit dem Glukokortikoidrezeptor konnte von Chen et al. nachgewiesen werden [12]. Sie postulierten einen direkten Einfluss in der Regulation der Transkription durch den jeweiligen Rezeptor.

Durch die Negativkontrollen im vorgestellten Experiment konnte ein relevanter Einfluss durch andere Steroidhormonrezeptoren in diesem Modell nicht nachgewiesen werden.

Der von Abu-Shakra und Nachtmann beschriebene rezeptorunabhängige Mechanismus [1] oder die von Boada et al. [7] untersuchten sekundären Bindungskomplexe für 17α -alkylierte-Steroide, z.B. Stanazolol, die in Mikrosomen von Lebergewebe und Mamma-Karzinom-Zellen nachgewiesen worden sind [7,51], wurden in den durchgeführten Versuchen nicht erfasst. In den Negativkontrollen hätte Stanazolol zum Beispiel eine höhere Induktion erzielen müssen als die anderen Steroide.

Für eine genauere Untersuchung müsste weiterhin das Verteilungsmuster dieser Bindungsproteine in den verschiedenen Zelltypen bekannt sein.

Durch die Gewebeverteilung der 5α -Reduktase liegen die physiologischen Androgene Testosteron und DHT in einer gewebespezifischen, unterschiedlich hohen Konzentration vor. Daraus können hormonspezifische Wirkungen in differentiellem Ausmaß hervorgerufen werden. Nach Hsiao et al. [39] war die 5α -Reduktase in geringen Mengen in den im Versuchsaufbau verwendeten CHO-Zellen vorhanden. Durch 5α -Reduktase-Hemmer resultierte in ihren Versuchen eine leicht verringerte Aktivität unter Verwendung von Testosteron, was dadurch erklärt wurde, dass Testosteron nicht mehr zum aktiveren DHT metabolisiert werden konnte.

Insgesamt sind die Ergebnisse über die Aktivität von Testosteron und DHT in verschiedenen Arbeiten [45,95] uneinheitlich.

Die Auswirkungen eines intrazellulären Metabolismus der anderen verwendeten Steroide auf die Transaktivierung ist bisher noch nicht endgültig geklärt.

Möglicherweise sind die in Abschnitt 1.6. beschriebenen spezifischen Konformationswechsel [54,66,90] des Ligand-Rezeptor-Komplexes mit eine Ursache für die spezifische Interaktion des Hormon-Rezeptor-Komplexes mit Zielsequenzen der DNA, wie sie in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten.

4.4. Einfluss von Transkriptionsfaktoren

Steroidhormone wirken über ihren Hormonrezeptor regulierend auf die Transkription. Meistens kommt es zu einer Interaktion des Ligand-Rezeptor-DNA-Komplexes mit Transkriptionsfaktoren. Hierbei handelt es sich um Proteine, die die Interaktionen und Wirkungen der Hormone zusätzlich modulieren [6,67] und die Transkription beeinflussen. Transkriptionsfaktoren können über eine Brückenfunktion zwischen dem Rezeptor und der DNA [43] oder über einer Modifikation des Chromatins, woraus sowohl eine stärkere Bindung des Rezeptors oder anderer Transkriptionsfaktoren resultieren kann, die Transkription regulieren. Diese Proteine können aktivierend oder hemmend wirken [6,42,47,68,75].

Durch Interaktion der Cofaktoren mit dem Rezeptor kann eine Konformationsänderung der Liganden-Bindungsdomäne des Rezeptorproteins resultieren.

Aus diesen Ergebnissen könnte eine ligandenspezifische Transkriptionsaktivierung durch Wechselwirkung mit unterschiedlichen Cofaktoren postuliert werden.

Die in diesem Versuchsaufbau gewählten Reportergene unterscheiden sich neben den verschiedenen HRE's in ihren Bindungsmöglichkeiten für Transkriptionsfaktoren. An das MMTV-luc-Reportergen konnten zum Beispiel die Transkriptionsfaktoren NF-1 oder Oct1 binden [67]; an das GRE-OCT-luc-Reportergen der Sp1-Faktor. Das TATA-luc-Reportergen besaß demgegenüber keine Möglichkeit der Bindung von Transkriptionsfaktoren in Nähe der HRE's.

Durch die unterschiedliche Struktur der Reportergene kann postuliert werden, dass spezifische Transkriptionsfaktoren die gemessenen Ergebnisse mit beeinflussen. Durch ligandenspezifische Konformationen des Hormon-Rezeptor-Komplexes könnten die Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren variieren, wobei spezifische Interaktionen mit HRE's resultieren können.

Da die Expression von Transkriptionsfaktoren zellspezifisch [37,47] ist, müssten außerdem zell- bzw. gewebespezifische Wirkungen der einzelnen Rezeptoren und Hormone in ihrer Interaktion mit entsprechenden Zielsequenzen angenommen werden.

5. Zusammenfassung

Androgene regulieren die Ausprägung des männlichen Phänotypes. Dabei können virilisierende und anabole Effekte unterschieden werden. Physiologische und synthetische Steroide können anhand ihrer unterschiedlichen biologischen Wirkungen in überwiegend virilisierend oder anabol unterteilt werden. In standardisierten in-vivo Untersuchungen bei der Ratte führten virilisierende Androgene zu einer Gewichtszunahme des Musculus levator ani, anabole Steroide zu einer verstärkten Stickstoffretention.

Nach Bindung der Liganden an den Androgenrezeptor resultiert eine Interaktion mit Zielgenen der DNA, den hormonresponsiblen Elementen (HRE), durch die die Transkription bestimmter DNA-Abschnitte reguliert wird.

Die Ursachen der differentiellen biologischen Wirkungen in-vivo durch strukturell unterschiedliche Androgene konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden. In dieser Arbeit sollten experimentell untersucht werden, ob strukturell unterschiedliche Androgene mit differierenden biologischen Wirkungen verschiedene Profile aktivierter Zielgene bewirken könnten.

In Zellkulturversuchen mit Chinesischen-Hamstero-Var-Zellen wurden mit Hilfe eines Reporterassays die Aktivitätsprofile von acht Steroidhormonen an drei strukturell unterschiedlichen Reporter genen, als theoretisches Modell unterschiedlicher natürlicher Zielgene, untersucht. Die benötigten Plasmide wurden mittels Transfektion in die Zellen integriert. Es wurden drei unabhängige Versuche in Triplikaten mit allen Hormonen in Konzentrationen von 0,001nM bis 100nM an jedem Reporter gen durchgeführt.

Anhand ihres Aktivitätsprofiles wurden die Hormone in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Aktivierungsprofilen unterteilt werden. Testosteron, DHT, R1881 und Nandrolon mit einer relativ starken Aktivität an allen drei Reporter genen und Stanozolol, Oxandrolon, Androstendion und DHEA mit einer relativ geringen Aktivität vor allem am TATA-luc-Reporter gen.

Diese Ergebnisse lassen mehrere Schlussfolgerungen zu: Alle verwendeten Hormone sind potente Aktivoren des Androgenrezeptors, insbesondere auch die andrenalen Vorstufen und die Anabolika. Darüber hinaus konnte erstmals experimentell gezeigt werden, dass strukturell unterschiedliche Androgene über den Androgenrezeptor ein differentielles Profil von Zielgenen aktivieren. Unterschiedliche biologische Wirkungen verschiedener Androgene in-vivo könnten somit zumindest teilweise durch ligandenspezifische Profile aktivierter Zielgene bedingt sein.

6. Wertetabellen

<u>MMTV-luc</u>					
Androstendion			Oxandrolon		
Lig.-Konz.	MW	SD	Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,21345152	0,07186823	0,001nM	0,42031225	0,2747802
0,01nM	0,18819578	0,06603678	0,01nM	0,32508828	0,06771114
0,1nM	0,4624159	0,07033351	0,1nM	0,40609793	0,09653566
1,0nM	0,7616639	0,07220843	1,0nM	0,65522717	0,12006777
10nM	0,86698574	0,10479169	10nM	0,82689703	0,27183049
100nM	0,81136294	0,199641	100nM	0,76166621	0,31570017
DHEA			R1881		
Lig.-Konz.	MW	SD	Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,15847068	0,09641744	0,001nM	0,45005175	0,04431493
0,01nM	0,10071958	0,08372971	0,01nM	0,72427786	0,07068078
0,1nM	0,22246642	0,22353341	0,1nM	0,99443411	0,10002123
1,0nM	0,60383596	0,52758531	1,0nM	1,10265225	0,13571338
10nM	0,83179313	0,51046534	10nM	1	0
100nM	0,9786919	0,38360404	100nM	1,1810523	0,23529933
DHT			Stanozolol		
Lig.-Konz.	MW	SD	Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,14299482	0,03927128	0,001nM	0,71130874	0,13067628
0,01nM	0,39579615	0,14758334	0,01nM	0,79979313	0,08187829
0,1nM	0,60951796	0,25664417	0,1nM	0,81841993	0,33999115
1,0nM	0,81472344	0,15066397	1,0nM	1,08683128	0,09923798
10nM	0,83694999	0,32025986	10nM	1,49603102	0,10966733
100nM	0,88749533	0,36090052	100nM	1,31134025	0,26087577
Nandrolon			Testosteron		
Lig.-Konz.	MW	SD	Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,62383563	0,05483295	0,001nM	0,67601948	0,24158849
0,01nM	0,44953268	0,15687365	0,01nM	0,71267766	0,14711983
0,1nM	0,61296734	0,04054732	0,1nM	0,95909103	0,25040984
1,0nM	0,76363287	0,04374582	1,0nM	1,19191676	0,17232249
10nM	0,96704856	0,02105663	10nM	1,52025249	0,28092316
100nM	1,08004864	0,14495205	100nM	1,59233889	0,17684375

Tab. 6-1: Relativaktivität der Hormone am MMTV-luc-Reporter gen

(Lig.Konz. = Liganden-Konzentration;

MW = Mittelwert aus drei Versuchen;

SD = Standardabweichung aus drei Versuchen)

GRE-OCT-luc

Androstendion

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,24811515	0,12635778
0,01nM	0,30829141	0,14291968
0,1nM	0,47529824	0,0809801
1,0nM	0,64385596	0,10402832
10nM	0,73983354	0,14649939
100nM	0,82579848	0,17667915

Oxandrolon

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,34362301	0,15566775
0,01nM	0,33812477	0,21227663
0,1nM	0,3505231	0,0436664
1,0nM	0,60129922	0,04366646
10nM	0,82907916	0,17209145
100nM	0,84512022	0,21444599

DHEA

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,20677023	0,13939644
0,01nM	0,2352377	0,17022176
0,1nM	0,32727399	0,10611988
1,0nM	0,65465016	0,05070019
10nM	0,90712579	0,09839727
100nM	0,92364307	0,09254987

R1881

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,63773257	0,27389932
0,01nM	0,5019709	0,16782847
0,1nM	0,68007355	0,04894913
1,0nM	0,63836595	0,01603304
10nM	1	0
100nM	0,92863181	0,08680809

DHT

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,2833071	0,12186798
0,01nM	0,68026639	0,16322036
0,1nM	0,76515504	0,07422114
1,0nM	0,88538052	0,24585828
10nM	0,82715541	0,29492242
100nM	0,91151283	0,33068457

Stanozolol

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,55721736	0,17720885
0,01nM	0,62450028	0,04633253
0,1nM	0,83979721	0,14098431
1,0nM	0,84682912	0,10257945
10nM	0,92781902	0,17549979
100nM	1,01221849	0,18735983

Nandrolon

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,52128872	0,12939633
0,01nM	0,62119081	0,07866333
0,1nM	0,85611423	0,29426052
1,0nM	0,92789172	0,31299534
10nM	0,84152161	0,09634441
100nM	0,87985842	0,121378

Testosteron

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	1,35558331	0,35796377
0,01nM	1,50967806	0,69982501
0,1nM	1,67535505	0,20114364
1,0nM	1,30089688	0,27816812
10nM	1,76776918	0,13734568
100nM	1,70018237	0,45544648

Tab. 6-2: Relativaktivität der Hormone am GRE-OCT-luc-Reportergen

(Lig.Konz. = Liganden-Konzentration;

MW = Mittelwert aus drei Versuchen;

SD = Standardabweichung aus drei Versuchen)

TATA-luc

Androstendion

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,03640959	0,01167534
0,01nM	0,04187001	0,01991374
0,1nM	0,10446263	0,0155829
1,0nM	0,4353806	0,17858862
10nM	0,76822473	0,17878246
100nM	0,80235449	0,17444382

Oxandrolon

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,04367912	0,04844527
0,01nM	0,03395588	0,02821054
0,1nM	0,09329847	0,08216934
1,0nM	0,55733175	0,27065237
10nM	0,87424542	0,28214052
100nM	0,89093295	0,74878887

DHEA

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,01214044	0,00463362
0,01nM	0,01864489	0,00854824
0,1nM	0,05140277	0,02732419
1,0nM	0,30619281	0,17590027
10nM	0,70237522	0,23972771
100nM	0,75745126	0,23779183

R1881

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,21987459	0,08419465
0,01nM	0,37114134	0,05300544
0,1nM	0,69054292	0,18414464
1,0nM	0,80394705	0,15227456
10nM	1	0
100nM	1,02341808	0,14210768

DHT

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,04066044	0,02397826
0,01nM	0,19521508	0,04339562
0,1nM	0,65782571	0,1743878
1,0nM	0,82554584	0,04114264
10nM	1,46467356	0,67748453
100nM	0,99290609	0,34568122

Stanozolol

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,02286506	0,00622102
0,01nM	0,05820979	0,02379349
0,1nM	0,12510409	0,06321324
1,0nM	0,31087001	0,10782822
10nM	0,39273742	0,20436843
100nM	0,39780054	0,27323032

Nandrolon

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,06706767	0,0337613
0,01nM	0,31012648	0,11530203
0,1nM	0,61128407	0,19559254
1,0nM	0,87449978	0,06006908
10nM	1,06630818	0,23267415
100nM	0,85854535	0,11681815

Testosteron

Lig.-Konz.	MW	SD
0,001nM	0,30826612	0,2263106
0,01nM	0,17726264	0,12486347
0,1nM	0,49511435	0,13716731
1,0nM	0,82815279	0,13067135
10nM	1,24191263	0,34643821
100nM	1,01323094	0,17355759

Tab. 6-3: Relativaktivität der Hormone am pRE₂-TATA-luc-Reporterger

(Lig.Konz. = Liganden-Konzentration;

MW = Mittelwert aus drei Versuchen;

SD = Standardabweichung aus drei Versuchen)

MMTV-luc

Androstendion

Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	1,79315698	0,64543509	0,64005656
0,01nM	1,63236127	0,69991021	0,57122836
0,1nM	3,8046993	0,49482156	0,86994463
1,0nM	6,30451484	0,83663917	0,86729523
10nM	7,12073346	0,55591799	0,92192967
100nM	6,81368812	0,66362085	0,90260475

DHEA

Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	1,3228703	1,10139551	0,16741988
0,01nM	0,8143491	0,63877309	0,21560288
0,1nM	1,9495945	0,55385883	0,71591075
1,0nM	5,29220151	1,34395634	0,74604967
10nM	7,47827796	0,71195645	0,90479674
100nM	8,60207752	0,8328458	0,90318085

DHT

Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	1,13470713	0,99056656	0,12702887
0,01nM	2,98427762	0,4302348	0,85583285
0,1nM	5,20437379	0,41126604	0,92097684
1,0nM	6,95507773	0,96037286	0,86191774
10nM	7,21772408	1,03113635	0,8571383
100nM	7,59127513	1,2013286	0,84174877

Nandrolon

Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	3,73643904	0,43660572	0,88314925
0,01nM	3,51061771	0,56217531	0,83986428
0,1nM	4,26695719	0,8010893	0,81225748
1,0nM	5,32538014	0,80873699	0,84813535
10nM	6,29061465	0,99275647	0,8421845
100nM	7,35449427	0,67173087	0,90866389

Oxandrolon

Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	3,76760861	0,64101149	0,82986251
0,01nM	2,72783023	1,05549198	0,61306537
0,1nM	3,59864483	0,77429875	0,78483602
1,0nM	5,94352763	0,42035412	0,92927531
10nM	7,61478105	0,4546409	0,94029495
100nM	6,79346947	0,41195794	0,93935971

R1881			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	4,75551098	0,55615296	0,88305085
0,01nM	5,65275178	0,65303662	0,88447456
0,1nM	7,21736702	0,40843132	0,94340993
1,0nM	8,54479932	0,42467401	0,95030029
10nM	7,24178513	0,40933187	0,94347639
100nM	9,84919906	0,43395158	0,95594042
Stanozolol			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	4,71975799	0,6425807	0,86385304
0,01nM	4,9713307	0,482495	0,9029445
0,1nM	4,55000908	1,15592309	0,74595148
1,0nM	6,57931412	0,52362642	0,92041322
10nM	9,48089692	0,51038412	0,94616711
100nM	8,16004766	0,84477643	0,89647408
Testosteron			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	3,54386937	0,74457188	0,78989861
0,01nM	3,14484496	0,71531516	0,77254359
0,1nM	4,63840306	0,81153571	0,82503985
1,0nM	5,85921921	0,49636747	0,91528437
10nM	6,94296977	1,37712922	0,80165127
100nM	7,18521617	0,70698279	0,90160591

Tab. 6-4: Messergebnisse der Negativkontrollen, Angabe aller Hormone unter Verwendung des MMTV-luc-Reportergens

(Lig.-Konz. = Liganden-Konzentration;

Induktion = Gesamtinduktion mit AR-Expressionplasmid;

Neg.-Induk. = Induktion ohne AR-Expressionsplasmid;

AR-Induk. = prozentualer Anteil der Neg.-Induk. an der Gesamtinduktion
 $= I - \text{Neg.Induk} / \text{Induktion}$)

<u>GRE-OCT-luc</u>			
Androstendion			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	1,18836532	0,61512529	0,48237694
0,01nM	1,39802945	0,70835912	0,49331602
0,1nM	2,23870196	0,60545635	0,72955027
1,0nM	2,92501715	0,59767988	0,7956662
10nM	3,43860613	0,70476346	0,79504385
100nM	3,76272958	0,76296238	0,79723167
DHEA			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	0,91762407	0,8264543	0,09935416
0,01nM	1,02812394	0,66652858	0,35170406
0,1nM	1,52265307	0,91416282	0,39962501
1,0nM	3,35434212	0,74531201	0,7778068
10nM	4,36939964	0,82900017	0,81027138
100nM	4,63295238	0,64843025	0,86003952

DHT			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	1,24491826	0,60909753	0,51073292
0,01nM	3,14105168	0,58404759	0,81405986
0,1nM	3,90619286	0,53118414	0,86401487
1,0nM	4,77435565	0,52763772	0,88948504
10nM	3,90930353	0,49410183	0,87360873
100nM	4,40398375	0,61054028	0,86136636
Nandrolon			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	2,42866919	0,62418407	0,74299338
0,01nM	2,99717803	0,61424535	0,79505877
0,1nM	3,80585873	0,5501505	0,85544642
1,0nM	4,14431031	0,54637455	0,86816273
10nM	3,88672885	0,45438404	0,88309345
100nM	3,99403514	0,46930849	0,88249766
Oxandrolon			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	1,73641084	0,42139997	0,75731551
0,01nM	1,65316884	0,44459938	0,73106233
0,1nM	1,50398849	0,50511951	0,66414669
1,0nM	2,77397728	0,48253661	0,82604882
10nM	4,04142801	0,4529899	0,88791341
100nM	3,994654	0,42271542	0,89417972
R1881			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	2,89490456	0,40025178	0,86173921
0,01nM	2,32255175	0,40677229	0,82485975
0,1nM	3,38846516	0,8330259	0,75415834
1,0nM	2,92688113	0,91471443	0,68747811
10nM	4,69627563	0,79184154	0,83138947
100nM	4,43221203	0,83069415	0,81257798
Stanozolol			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	3,33481922	0,66561163	0,80040548
0,01nM	3,46444623	0,62466221	0,81969349
0,1nM	4,77908894	0,58623295	0,87733374
1,0nM	4,82498311	0,72907802	0,84889522
10nM	5,09541489	0,69827252	0,86296062
100nM	5,67984897	0,67439937	0,88126456
Testosteron			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	5,51875531	0,57413836	0,89596597
0,01nM	6,43591464	0,56521801	0,91217752
0,1nM	6,99052135	0,48010063	0,9313212
1,0nM	5,15248115	0,51813246	0,8994402
10nM	7,36262172	0,4944181	0,93284755
100nM	6,77712871	0,49398289	0,9271103

Tab. 6-5: Messergebnisse der Negativkontrollen, Angabe aller Hormone unter Verwendung des GRE-OCT-luc-Reportergens (Erläuterung siehe Tab. 6-4)

TATA-luc

Androstendion

Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	1,8040973	0,67836197	0,62398814
0,01nM	1,95952947	0,52173986	0,73374228
0,1nM	4,98012212	0,60836358	0,87784163
1,0nM	20,1791258	0,5384449	0,97331674
10nM	38,777832	0,53795348	0,98612729
100nM	39,315186	0,57193989	0,98545244

DHEA

Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	3,59198103	0,57431043	0,84011318
0,01nM	5,4641322	0,70694836	0,8706202
0,1nM	16,5968736	0,77868202	0,95308261
1,0nM	86,8259717	0,78134333	0,99100104
10nM	153,523386	0,81339474	0,99470182
100nM	234,72353	0,70523155	0,99699548

DHT

Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	9,35567054	0,61829341	0,93391244
0,01nM	47,4761113	0,84242449	0,98225582
0,1nM	358,28761	0,7159007	0,99800188
1,0nM	551,618527	0,66516719	0,99879415
10nM	1044,45775	1,07417173	0,99897155
100nM	828,30842	1,00123025	0,99879123

Nandrolon

Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	1,41299577	3,89714437	0
0,01nM	7,03037763	3,18010539	0,54766222
0,1nM	15,6252108	3,05061636	0,80476319
1,0nM	22,9648129	3,66053087	0,84060263
10nM	33,1250034	2,71539362	0,91802586
100nM	20,6389303	2,57299427	0,87533296

Oxandrolon

Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	1,44070062	1,58063534	0
0,01nM	1,29321773	1,67140567	0
0,1nM	4,13371016	1,74424395	0,57804397
1,0nM	29,987814	2,16656895	0,92775169
10nM	47,0242054	3,09726419	0,93413468
100nM	32,6140051	3,49639951	0,89279454

R1881

Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	7,69554543	3,43535776	0,55359139
0,01nM	13,3064342	3,87563796	0,70873955
0,1nM	26,3418001	3,89412156	0,8521695
1,0nM	30,5456802	3,90461167	0,8721714
10nM	37,2861104	1,64354763	0,95592065
100nM	36,2662502	1,67303003	0,95386813

Stanozolol			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	0,82471103	1,77753245	0
0,01nM	2,55990965	1,75416429	0,31475539
0,1nM	3,4559514	1,42107862	0,58880249
1,0nM	11,5494728	1,4238205	0,87671987
10nM	10,3342239	2,61566888	0,74689257
100nM	9,51935545	2,53142134	0,73407639
Testosteron			
Lig.-Konz.	Induktion	Neg.-Induk.	AR-Induk.
0,001nM	28,1309405	2,26977352	0,91931398
0,01nM	15,1915532	2,01232233	0,86753676
0,1nM	56,0474381	1,57695909	0,97186385
1,0nM	101,287904	1,97382144	0,98051276
10nM	149,429157	2,49129887	0,98332789
100nM	131,591944	1,93866822	0,98526758

Tab. 6-6: Messergebnisse der Negativkontrollen, Angabe aller Hormone unter Verwendung des pRE₂-TATA-luc-Reportergens (Erläuterung siehe Tab. 6-4)

7. Literatur

- [1] Abu-Shakra SR, Nachtman FC: *Anabolic Steroids Induce Skeletal Muscle Injury and Immediate Early Gene Expression through a Receptor-Independent Mechanism*. Ann NY Acad Sci 761: 395-399 (1995)
- [2] Andersson S, Moghrabi N: *Physiology and molecular genetics of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases*. Steroids 62(1): 143-147 (1997)
- [3] Aumais JP, Lee HS, Lin R, White JH: *Selective interaction of hsp90 with an estrogen receptor ligand-binding domain containing a point mutation*. J Biol Chem 272(18): 12229-12235 (1997)
- [4] Barbulescu K, Geserick C, Schuttke I, Schleuning WD, Haendler B: *New androgen response elements in the murine pem promoter mediate selective transactivation*. Mol Endocrinol 15(10): 1803-1816 (2001)
- [5] Bauer ER, Daxenberger A, Petri T, Sauerwein H, Meyer HH: *Characterisation of the affinity of different anabolics and synthetic hormones to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progestin receptor*. APMIS 108(12): 838-846 (2000)
- [6] Beitel LK: *Androgen Receptor-Interacting Proteins*.
<http://www.mcgill.ca/androgendb/InterprotT.htm> (2002)
- [7] Boada LD, Fernandez L, Zumbado M, Luzardo OP, Chirino R, Diaz-Chico BN: *Identification of a specific binding site for the anabolic steroid stanozolol in male rat liver microsomes*. J Pharmacol Exp Ther 279(3): 1123-1129 (1996)
- [8] Boada LD, Zumbade M, Torres S, Lopez A, Diaz-Chico BN, Cabrera JJ, Luzardo OP: *Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects exerted by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adult male rats*. Arch Toxicol 73(8-9): 465-472 (1999)

- [9] Boyadjiev NP, Georgieva KN, Massaldjieva RI, Gueorguiev SI: *Reversible hypogonadism and azoospermia as a result of anabolic-androgenic steroid use in a bodybuilder with personality disorder. A case report.* J Sports Med Phys Fitness 40(3): 271-274 (2000)
- [10] Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Steketeer K, Berrevoets CA, Trapman J: *Mechanisms of androgen receptor activation and function.* J Steroid Biochem Molecular Biol 69: 307-313 (1999)
- [11] Can S, Zhu YS, Cai LQ, Ling Q, Katz MD, Akgun S, Shackleton CH, Imperato-McGinley J: *The identification of 5alpha-reductase-2 and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 gene defects in male pseudohermaphrodites from a Turkish kindred.* J Clin Endocrinol Metab 83(2): 560-569 (1998)
- [12] Chen S, Wang J, Yu G, Liu W, Pearce D: *Androgen and Glucocorticoid Receptor Heterodimer Formation.* J Biol Chem 272: 14087-14092 (1997)
- [13] Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W: *Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation.* J Steroid Biochem Mol Biol 76(1-5): 23-30 (2001)
- [14] Cooke BA, Ashford L, Abayasekara DR, Choi M: *The role of chloride ions in the regulation of steroidogenesis in rat Leydig cells and adrenal cells.* J Steroid Biochem Mol Biol 69(1-6): 359-365 (1999)
- [15] Dai JL, Burnstein KL: *Two androgen response elements in the androgen receptor coding region are required for cell-specific up-regulation of receptor messenger RNA.* Mol Endocrinol 10(12): 1582-1594 (1996)
- [16] Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ: *Testosterone and 5alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene.* Mol Cell Endocrinol 88(1-3): 15-22 (1992)

- [17] Doesburg P, Kuil CW, Berrevoets CA, Stekete K, Faber PW, Mulder E, Brinkmann AO, Trapman J: *Functional in vivo interaction between the amino-terminal, transactivation domain and the ligand binding domain of the androgen receptor.* Biochemistry 36(5): 1052-1064 (1997)
- [18] Ebeling P, Koivisto VA: *Physiological importance of dehydroepiandrosterone.* Lancet 343(8911): 1479-1481 (1994)
- [19] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: *Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.* Proc Natl Acad Sci 95: 14863-14868 (1998)
- [20] Eisenberg E, Gordan GS: *The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic effect.* J Pharmacol Exp Ther 99: 38-40 (1950)
- [21] Ellis AJ, Cawston TE, Mackie EJ: *The differential effects of stanozolol on human skin and synovial fibroblasts in vitro: DNA synthesis and receptor binding.* Agents Actions 41: 37-43 (1994)
- [22] Falanga V, Greenberg AS, Zhou L, Ochoa SM, Roberts AB, Falabella A, Yamaguchi Y: *Stimulation of collagen synthesis by the anabolic steroid stanozolol.* J Invest Dermatol 111(6): 1193-1197 (1998)
- [23] Fang Y, Fliss AE, Robins DM, Caplan AJ: *Hsp90 Regulates Androgen Receptor Hormone Binding Affinity in Vivo.* J Biol Chem 271: 28697-28702 (1996)
- [24] Ferry A, Noirez P, Page CL, Salah IB, Daegelen D, Rieu M: *Effects of anabolic/androgenic steroids on regenerating skeletal muscles in the rat.* Acta Physiol Scand 166(2): 105-110 (1999)
- [25] Fiegel G, Kulhanek F: *Nebenwirkungen von Anabolika.* Gynäkol Prax 2: 393-399 (1990)

- [26] George FW: *Androgen Metabolism in the Prostate of the Finasteride-Treated, Adult Rat: A Possible Explanation for the Differential Action of Testosterone and 5 α -Dihydrotestosterone during Development of the Male Urogenital Tract.* Endocrinology 138: 871-877 (1997)
- [27] Gerber HP, Seipel K, Georgiev O, Höfferer M, Hug M, Rusconi S, Schaffner W: *Transcriptional Activation Modulated by Homopolymeric Glutamine and Proline Stretches.* Science 263: 808-811 (1994)
- [28] Glueck CJ, Glueck HI, Stroop D, Speirs J, Hamer T, Tracy T: *Endogenous testosterone, fibrinolysis, and coronary heart disease risk in hyperlipidemic men.* J Lab Clin Med 122: 412-420 (1993)
- [29] Gonzales MI, Robins DM: *Oct-1 preferentially interacts with androgen receptor in a DNA-dependent manner that facilitates recruitment of SRC-1.* J Biol Chem 276(9): 6420-6428 (2001)
- [30] Haelens A, Verrijdt G, Callewaert L, Christiaens V, Schauwaers K, Peeters B, Rombauts W, Claessens F: *DNA recognition by the androgen receptor: evidence for an alternative DNA-dependent dimerization, and an active role of sequences flanking the response element on transactivation.* Biochem J 369(Pt1): 141-151 (2003)
- [31] Haldankar R, Kopchick JJ, Ridgway D: *Stable production of a human growth hormone antagonist from CHO cells adapted to serum-free suspension culture.* Biotechnol Prog 15(3): 336-346 (1999)
- [32] Ham J, Thomson A, Needham M, Webb P, Parker M: *Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus.* Nucleic Acids Res 16(12): 5263-5276 (1988)
- [33] Hebbar PB, Archer TK: *Nuclear factor 1 is required for both hormone-dependent chromatin remodeling and transcriptional activation of the mouse mammary tumor virus promoter.* Mol Cell Biol 23(3): 887-898 (2003)

- [34] Hiort O, Holterhus PM: *The molecular basis of male sexual differentiation*. Eur J Endocrinol 142: 101-110 (2000)
- [35] Hiort O, Holterhus PM, Nitsche EM: *Physiology and pathophysiology of androgen action*. Baillieres Clin Endocrinol Metab 12(1): 115-132 (1998)
- [36] Hiort O, Holterhus PM, Sinnecker GHG, Kruse K: *Androgenresistenzsyndrome – Klinische und molekulare Grundlagen*. Dt Ärztebl 96: A-686-692 (1999)
- [37] Ho KC, Marschke KB, Tan J, Power SG, Wilson EM, French FS: *A complex response element in intron 1 of the androgen-regulated 20-kDa protein gene displays cell type-dependent androgen receptor specificity*. J Biol Chem 268(36): 27226-27235 (1993)
- [38] Holterhus PM, Hiort O, Demeter J, Brown PO, Brooks JD: *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 (2003)
- [39] Hsiao PW, Thin TH, Lin DL, Chang C: *Differential regulation of testosterone vs. 5 α -dihydrotestosterone by selective androgen response elements*. Mol Cell Biochem 206: 169-175 (2000)
- [40] Issa S, Schnabel D, Feix M, Wolf L, Schaefer HE, Russell DW, Schweikert HU: *Human osteoblast-like cells express predominantly steroid 5 α -reductase type 1*. J Clin Endocrinol Metab 87(12): 5401-5407 (2002)
- [41] Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson Jr J, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO: *The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum*. Science 283(5398): 83-87 (1999)
- [42] Jenster G: *Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update*. Mol Cell Endocrinol 143(1-2): 1-7 (1998)

- [43] Jenster G, Spencer TE, Burcin MM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: *Steroid receptor induction of gene transcription: a two-step model*. Proc Natl Acad Sci USA 94(15): 7879-7884 (1997)
- [44] Kempainen JA, Lane MV, Sar M, Wilson EM: *Androgen Receptor Phosphorylation, Turnover, Nuclear Transport, and Transcriptional Activation*. J Biol Chem 267: 968-974 (1992)
- [45] Kempainen JA, Langley E, Wong CI, Bobseine K, Kelce WR, Wilson EM: *Distinguishing androgen receptor agonists and antagonists: distinct mechanisms of activation by medroxyprogesterone acetate and dihydrotestosterone*. Mol Endocrinol 13(3): 440-454 (1999)
- [46] Korkia P, Stimson GV: *Indications of prevalence, practice and effects of anabolic steroid use in Great Britain*. Int J Sports Med 18(7): 557-562 (1997)
- [47] Kotaja N, Aittomaki S, Silvennoinen O, Palvimo JJ, Janne OA: *ARIP3 (androgen receptor-interacting protein 3) and other PIAS (protein inhibitor of activated STAT) proteins differ in their ability to modulate steroid receptor-dependent transcriptional activation*. Mol Endocrinol 14(12): 1986-2000 (2000)
- [48] Kuhn CM: *Anabolic steroids*. Recent Prog Horm Res 57: 411-434 (2002)
- [49] Lampit M, Hochberg Z: *Androgen therapy in constitutional delay of growth*. Horm Res 59(6): 270-275 (2003)
- [50] Lane NE, Kelman A: *A review of anabolic therapies for osteoporosis*. Arthritis Res Ther 5(5): 214-222 (2003)
- [51] Luzardo OP, Machin RP, Diaz-Chico BN, Fernandez L: *Photoaffinity labeling identification of a specific binding protein for the anabolic steroids stanozolol and danazol: an oligomeric protein regulated by age, pituitary hormones, and ethinyl estradiol*. Endocrinology 141(9): 3377-3387 (2000)

- [52] Mahendroo MS, Cala KM, Landrum DP, Russell DW: *Fetal death in mice lacking 5alpha-reductase type 1 caused by estrogen excess*. Mol Endocrinol 11(7): 917-927 (1997)
- [53] Manieri C, Bisceglie C, Tagliabue M, Fornengo R, Zumpano E: *Hormonal control of sexual behavior in males and endocrinologic causes of sexual dysfunction*. Minerva Endocrinol 22(2): 37-43 (1997)
- [54] Matias PM, Donner P, Coelho R, Thomaz M, Peixoto C, Macedo S, Otto N, Joschko S, Scholz P, Wegg A, Bäsler S, Schäfer M, Egner U, Carrondo MA: *Structural Evidence for Ligand Specificity in the Binding Domain of the Human Androgen Receptor*. J Biol Chem 275(34): 26164-26171 (2000)
- [55] McPhaul MJ: *Molecular defects of the androgen receptor*. J Ster Biochem Mol Biol 69: 315-322 (1999)
- [56] Melvin VS, Edwards DP: *Coregulatory proteins in steroid hormone receptor action: the role of chromatin high mobility group proteins HMG-1 and -2*. Steroids 64(9): 576-586 (1999)
- [57] Mendonca BB, Inacio M, Arnhold IJ, Costa EM, Bloise W, Martin RM, Denes FT, Andersson S, Lindqvist A, Wilson JD: *Male pseudohermaphroditism due to 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. Diagnosis, psychological evaluation and management*. Medicine (Baltimore) 79(5): 299-309 (2000)
- [58] Necela BM, Cidlowski JA: *Crystallization of the human glucocorticoid receptor ligand binding domain: a step towards selective glucocorticoids*. Trends Pharmacol Sci 24(2): 58-61 (2003)
- [59] Nelson CC, Hendy SC, Shukin RJ, Cheng H, Bruchovsky N, Koop BF, Rennie PS: *Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements*. Mol Endocrinol 13(12): 2090-2107 (1999)

- [60] Newell JG, Davies M, Bateson AN: *The use of site-directed mutagenesis, transient transfection, and radioligand binding. A method for the characterization of receptor-ligand interactions.* Mol Biotechnol 14(1): 25-45 (2000)
- [61] Okuno M, Arimoto E, Ikenobu Y, Nishihara T, Imagawa M: *Dual DNA-binding specificity of peroxisome-proliferator-activated receptor gamma controlled by heterodimer formation with retinoid X receptor alpha.* Biochem J 353(Pt2): 193-198 (2001)
- [62] Overbeek GA: *Anabole Steroide.*
In: Overbeek GA: *Anabole Steroide – Chemie und Pharmakologie.* Springer-Verlag, Berlin, 37-56 (1966)
- [63] Overbeek GA: *Methoden zur Untersuchung anaboler Steroide.*
In: Overbeek GA: *Anabole Steroide – Chemie und Pharmakologie.* Springer-Verlag, Berlin, 24-36 (1966)
- [64] Papadimitriou A, Preece MA, Rolland-Cachera MF, Stanhope R: *The anabolic steroid oxandrolone increases muscle mass in prepubertal boys with constitutional delay of growth.* J Pediatr Endocrinol 14(6): 725-727 (2001)
- [65] Paris F, Servant N, Terouanne B, Sultan C: *Evaluation of androgenic bioactivity in human serum by recombinant cell line: preliminary results.* Mol Cell Endocrinol 198(1-2): 123-129 (2002)
- [66] Poujol N, Wurtz JM, Tahiri B, Lumbroso S, Nicolas JC, Moras D, Sultan C: *Specific Recognition of Androgens by Their Nuclear Receptor.* J Bio Chem 275(31): 24022-24031 (2000)
- [67] Préfontaine GG, Lemieux M, Giffin W, Schild-Poulter C, Pope L, LaCasse E, Walker P, Haché RJG: *Recruitment of Octamer Transcription Factors to DNA by Glucocorticoid Receptor.* Mol Cell Biol 18(6): 3416-3430 (1998)

- [68] Préfontaine GG, Walther R, Giffin W, Lemieux ME, Pope L, Haché RJG: *Selective Binding of Steroid Hormone Receptors to Octamer Transcription Factors Determines Transcriptional Synergism at the Mouse Mammary Tumor Virus Promoter*. J Biol Chem 274(38): 26713-26719 (1999)
- [69] Promega®: *Description*.
In: *Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Technical Manual*. Madison, WI, USA, No. 040: 1-4 (1999)
- [70] Promega®: *Features of the pRL-SV40 Vector*.
In: *pRL-SV40 Vector, Technical Bulletin*. Madison, WI, USA, No. 239: 1-3 (1996)
- [71] van Puymbroeck M, Kuilman ME, Maas RF, Witkamp RF, Leyssens L, Vanderzande D, Gelan J, Raus J: *In vitro liver models are important tools to monitor the abuse of anabolic steroids in cattle*. Analyst 123: 2453-2456 (1998)
- [72] Rasmussen BB, Volpi E, Gore DC, Wolfe RR: *Androstendione does not stimulate muscle protein anabolism in young healthy men*. J Clin Endocrinol Metab 85 (1): 55-59 (2000)
- [73] Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D: *Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid*. Nature 378(6558): 681-689 (1995)
- [74] Revenga F, Aguilar C, Gonzales R, Paricio JF, Sanz P, Santos I: *Cryofibrinogenaemia with a good response to stanozolol*. Clin Exp Dermatol 25(8): 621-623 (2000)
- [75] Robins DM, Scheller A, Adler AJ: *Specific Steroid Response from a Nonspecific DNA Element*. J Steroid Biochem Molec Biol 49(4-6): 251-255 (1994)
- [76] van Roijen JH, Ooms MP, Weber RF, Brinkmann AO, Grootegoed JA, Vreeburg JT: *Comparison of the response of rat testis and accessory sex organs to treatment with testosterone and the synthetic androgen methyltrienolone (R1881)*. J Androl 18(1): 51-61 (1997)

- [77] Rosell CE: *The effect of anabolic-androgenic steroids on aromatase activity and androgen receptor binding in the rat preoptic area.* Brain Res 792(2): 271-276 (1998)
- [78] Sato T, Sonoda T, Itami S, Takayasu S: *Predominance of type I 5alpha-reductase in apocrine sweat glands of patients with excessive or abnormal odour derived from apocrine sweats (osmidrosis).* Br J Dermatol 139(5): 806-810 (1998)
- [79] Schoenmakers E, Verrijdt G, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W, Claessens F: *Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses.* J Biol Chem 275(16): 12290-12297 (2000)
- [80] Shang Y, Myers M, Brown M: *Formation of the androgen receptor transcription complex.* Mol Cell 9(3): 601-610 (2002)
- [81] Sheffield-Moore M: *Androgens and the control of skeletal muscle protein synthesis.* Ann Med 32(3): 181-186 (2000)
- [82] Sheffield-Moore M, Urban RJ, Wolf SE, Jiang J, Catlin DH, Herndon DN, Wolfe RR, Ferrando AA: *Short-term oxandrolone administration stimulates net muscle protein synthesis in young men.* J Clin Endocrinol Metab 84(8): 2705-2711 (1999)
- [83] Sinnecker GH, Hiort O, Dibbelt L, Albers N, Dorr HG, Hauss H, Heinrich U, Hemminghaus M, Hoepffner W, Holder M, Schnabel D, Kruse K: *Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency.* Am J Med Genet 63(1): 223-230 (1996)
- [84] Solyom J, Kontor E, Glaz E, Szilagyi A, Halvax L, Csermely T, Homoki J: *17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase defect: female phenotype with 46,XY karyotype.* Oerv Hetil 137(15): 807-810 (1996)
- [85] Steers WD: *5alpha-reductase activity in the prostate.* Urology 58(6 Suppl. 1): 17-24 (2001)

- [86] Tóth M, Zakár T: *Relative binding affinities of testosterone, 19-nortestosterone and their 5 α -reduced derivatives to the androgen receptor and to other androgen-binding-proteins: A suggested role of 5 α -reductive steroid metabolism in the dissociation of „myotropic“ and „androgenic“ activities of 19-nortestosterone.* J steroid Biochem 17: 653-660 (1982)
- [87] Twosten W, Holterhus PM, Sippell WG, Morlot M, Schumacher H, Schenk B, Hiort O: *Clinical, endocrine and molecular genetic findings in patients with 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency.* Horm Res 53(1): 26-31 (2000)
- [88] Ulibarri C, Yahr P: *Effects of androgens and estrogens on sexual differentiation of sex behavior, scent marking, and the sexually dimorphic area of the gerbil hypothalamus.* Horm Behav 30(2): 107-130 (1996)
- [89] Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W, Claessens F: *Change of specificity mutations in androgen-selective enhancers. Evidence for a role of differential DNA binding by the androgen receptor.* J Biol Chem 275(16): 12298-12305 (2000)
- [90] Waller CL, Juma BW, Gray LE Jr, Kelce WR: *Three-dimensional quantitative structure-activity relationships for androgen receptor ligands.* Toxicol Appl Pharmacol 137(2): 219-227 (1996)
- [91] Winkler UH: *Effects of androgens on haemostasis.* Maturitas 24(3): 147-155 (1996)
- [92] Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H: *A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors.* Nat Struct Biol 3(1): 87-94 (1996)
- [93] Xu M, Modarress KJ, Meeker JE, Simons SS: *Steroid-induced conformational changes of rat glucocorticoid receptor cause altered trypsin cleavage of the putative helix 6 in the ligand binding domain.* Mol Cell Endocrinol 155(1-2): 85-100 (1999)

- [94] Yin D, Gao W, Kearbey JD, Xu H, Chung K, He Y, Marhefka CA, Veverka KA, Miller DD, Dalton JT: *Pharmacodynamics of selective androgen receptor modulators*. J Pharmacol Exp Ther 304(3): 1334-1340 (2003)
- [95] Zhou ZX, Lane MV, Kemppainen JA, French FS, Wilson EM: *Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability*. Mol Endocrinol 9(2): 208-218 (1995)
- [96] Zhou ZX, Sar M, Simental JA, Lane MV, Wilson EM: *A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH₂-terminal and carboxyl-terminal sequences*. J Biol Chem 269(18): 13115-13123 (1994)

8. Anhang

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Paul-Martin Holterhus für die freundliche Überlassung des Themas. Mit hilfreichen und wichtigen Hinweisen stand er mir stets zur Seite.

Meinem Doktorvater und Leiter der Arbeitsgruppe für Pädiatrische Endokrinologie Herrn Prof. Dr. Olaf Hiort danke ich für die Bereitstellung der Materialien. Seine Bemühungen und Hilfestellungen waren für mich immer eine große Unterstützung.

Paul-Martin und Olaf, euch beiden danke ich für die Möglichkeiten, die Ihr mir aufgezeigt und nutzen geholfen habt, dies waren interessante und unvergessene Augenblicke für mich.

Den vielen Mitgliedern der Arbeitsgruppe gilt mein besonderer Dank für die Einführung in die verschiedenen experimentellen Techniken. Allen voran Frau Nicole Homburg, die mich bei auftretenden Fragen sehr hilfreich unterstützte.

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

Meinen Eltern möchte ich für die fortwährende Unterstützung und Zuversicht in meinen bisherigen Werdegang besonders danken.

Ein ganz wichtiger Dank gilt dir, liebe Birte, du hast mir während der ganzen Zeit mit viel Geduld, Rücksichtnahme und unendlich vielen anderen Dingen zur Seite gestanden.

Dies alles hat sehr viel zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Stefan Piefke

Persönliche Angaben

geboren am: 28.10.1975
Geburtsort: Braunschweig

Schulbildung

1982 - 1986 Grundschule Lehndorf-Ort in Braunschweig
1986 - 1988 Orientierungsstufe Alt-Lehndorf in Braunschweig
1988 - 1995 Hoffmann-von-Fallersleben-Gymnasium in Braunschweig
Juni 1995 Abitur

Zivildienst

1995 - 1996 in der Kinderklinik des Städtischen Klinikums Braunschweig

Hochschulausbildung

1996 - 2003 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Sep. 1998 Ärztliche Vorprüfung
Sep. 1999 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 – 2003 Praktisches Jahr in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Westküstenklinikums Heide, in der Medizinische Klinik I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und in der Klinik für Kinderchirurgie und Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Juni 2003 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Arzt im Praktikum

seit Juli 2003 in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Westküstenklinikums Heide

wissenschaftliche Arbeit

- 2000 – 2001 experimentelle Untersuchungen
- Juli 2001 Stipendium der European-Society-for-Paediatic-Endocrinology zur Teilnahme am 40th, 6th Joint Meeting mit der Lawson-Wilkins-Pediatric-Endocrine-Society in Montréal, Kanada

Veröffentlichungen

- Juli 2001 Vortrag auf dem 40th, 6th Joint Meeting Lawson-Wilkins-Pediatric-Endocrine-Society / European-Society-for-Paediatic-Endocrinology in Montréal, Kanada
Piefke S, Holterhus PM, Homburg N, Hiort O: *Anabolic and virilizing androgens show distinctive activation profiles of 3 structurally different androgen responsive promoters*. Pediatric Research Suppl 49(6): 20A (2001)
- Feb. 2002 Vortrag auf dem 46. Kongress der Deutschen-Gesellschaft-für-Endokrinologie in Göttingen
Piefke S, Holterhus PM, Homburg N, Hiort O: *Testosteronvorstufen sind potente Aktivatoren androgen-regulierter Promotoren mit spezifischen Aktivierungsprofilen*. Exp Clin Endocrinol Diab Suppl 1 110: S8 (2002)
- Nov. 2002 Originalarbeit von Holterhus PM, Piefke S, Hiort O: *Anabolic steroids, testosterone-precursors and virilizing androgens induce distinct activation profiles of androgen responsive promoter constructs*. J Steroid Biochem Mol Biol, Vol. 82(4-5): 269-275