

**Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität Lübeck
Kommissarische Direktorin: PD Dr. med. Ute Thyen**

Androgenresistenz unklarer Genese
-
**neue Erkenntnisse zur Bedeutung der
Androgenrezeptor- und 5 α - Reduktase II-
Transkription**

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

vorgelegt von
Julia Bassler
aus Hamburg

Lübeck 2004

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

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

Tag der mündlichen Prüfung : 18. 11. 2004

Zum Druck genehmigt, Lübeck den 18. 11. 2004

gez. Prof. Dr. med. Dominiak

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	5
1.1 normale und pathologische Geschlechtsentwicklung beim männlichen Embryo	5
1.2 Molekulare Grundlagen des Androgenrezeptors und der 5 α -Reduktase II.....	10
1.3 Fragestellung	14
2. Material und Methoden	17
2.1 Patienten	17
2.2 Materialien	21
2.2.1 Zellkultur.....	21
2.2.2 RNA-Isolation	22
2.2.3 cDNA-Synthese.....	22
2.2.4 PCR	23
2.2.5 Gele.....	25
2.2.6 Northern Blot	26
2.2.7 Geräte	27
2.3 Methoden	28
2.3.1 Zellkultur.....	28
2.3.2 RNA-Isolation	30
2.3.3 cDNA-Synthese.....	31
2.3.4 PCR	33
2.3.5 Gele.....	36
2.3.6 Densitometrische Analyse.....	37
2.3.7 Statistik.....	37
2.3.8 Northern Blot	38
3. Ergebnisse	40
3.1 AR- und 5R11-Transkription in GF von Patienten mit AIS	40
3.1.1 Transkription des Androgenrezeptors.....	40
3.1.2 Transkription der 5 α -Reduktase II	44
3.1.3 Weiterführende Untersuchungen an GHF des Patienten ARD 402-2....	47
3.1.3.1 Northern Blot	47
3.1.3.2 Promotorregion des AR-Gens	48

3.1.3.3 Western Blot.....	49
3.1.4 Korrelationen zwischen klinischen und experimentellen Funden	49
<u>3.2 AR- und 5RII-Transkription in GF von Patienten mit 17β-HSD III-Mutation...</u>	<u>51</u>
3.2.1 Transkription des Androgenrezeptors	51
3.2.2 Transkription der 5 α -Reduktase II	52
4. Diskussion	55
5. Zusammenfassung	79
6. Anhang.....	80
<u>6.1 Transkription des AR: Rohdaten</u>	<u>80</u>
<u>6.2 Transkription des AR: Beispiel-Gele mit Auswertung</u>	<u>81</u>
<u>6.3 Transkription der 5RII: Rohdaten</u>	<u>82</u>
<u>6.4 Transkription der 5RII: Beispiel-Gele mit Auswertung</u>	<u>83</u>
<u>6.5 Zusammenfassung aller Ergebnisse</u>	<u>84</u>
<u>6.6 Abkürzungen.....</u>	<u>85</u>
7. Literaturverzeichnis	86
8. Danksagung.....	97
9. Lebenslauf	98

1. EINLEITUNG

1.1 normale und pathologische Geschlechtsentwicklung beim männlichen Embryo

Die Entwicklung des Geschlechts eines Menschen ist ein komplexer Vorgang, der durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird. In der Bestimmung des Geschlechts können chromosomales, gonadales und phänotypisches Geschlecht voneinander unterschieden werden. Während der Verschmelzung von Eizelle und Samenzelle bei der Zeugung wird durch die Kombination der Geschlechtschromosomen das chromosomale Geschlecht des Embryos festgelegt. Die Kombination XY stellt das männliche, XX das weibliche Geschlecht dar. Die daraus folgende Entwicklung der Gonaden bezeichnet man als Geschlechtsdeterminierung.

Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung entstehen zunächst indifferente Gonadenanlagen. Weiterhin bildet sich aus dem Urnierengang der Wolffsche Gang und aus einer Epitheleinstülpung in der Urogenitalleiste der Müllersche Gang. Die Entwicklung des gonadalen Geschlechts geschieht innerhalb der ersten drei Monate der Embryonalentwicklung. Für die Bildung von Hoden aus den indifferenten Gonaden ist eine Aktivierungskaskade von gonosomalen und autosomalen Genen entscheidend. Eine Schlüsselrolle spielt das SRY-Gen auf dem Y-Chromosom. Es kodiert einen Transkriptionsfaktor für zahlreiche Differenzierungsgene, die die Bildung von Hodengewebe aus dem indifferenten Gonadengewebe veranlassen (Hiort et al., 2000). In den embryonalen Hoden entstehen nun Hodenstränge und Leydigische Zwischenzellen. Hier findet die Produktion der Hormone statt, die für die Ausdifferenzierung der Geschlechtsorgane nötig sind. Fehlt der Einfluß des SRY-Gens, z. B. beim weiblichen Embryo, bilden sich aus den indifferenten Gonaden Ovarien.

Ab dem dritten Embryonalmonat beginnt die Geschlechtsdifferenzierung, die durch hormonelle Einflüsse die Reifung der Geschlechtsorgane und damit das phänotypische Geschlecht bedingt. Sertolizellen, die späteren Stützzellen der Hodengänge, produzieren im embryonalen Hoden das Anti-Müller-Hormon AMH. AMH unterdrückt die Weiterentwicklung der Müllerschen Gänge zu Eileitern und

Uterus. Durch die Hormone hCG (humanes Choriongonadotropin) in der Embryonalzeit und später LH (Luteinisierendes Hormon) wird in den Leydigischen Zwischenzellen die Produktion von Testosteron stimuliert. Testosteron gehört zur Gruppe der Steroidhormone. Über mehrere Zwischenschritte wird aus der Ausgangssubstanz Cholesterin das Androgen Androstendion gebildet, welches durch das Enzym 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase III (17 β -HSD III) in Testosteron umgewandelt wird. Testosteron spielt bei der Virilisierung der internen Geschlechtsorgane eine Schlüsselrolle. Es läßt die Wolffschen Gänge zu Nebenhoden, Samenbläschen und Samenleiter heranreifen. Postpubertär ist es für Wachstum und Ausreifung der Spermien verantwortlich. Dihydrotestosteron (DHT), ein Metabolit des Testosterons, läßt die äußeren Genitalien reifen, indem es das Wachstum des Penis und des Skrotums und den Abstieg des Hodens, also die externe Virilisierung, induziert. DHT entsteht in den androgenabhängigen Zielzellen aus Testosteron durch das Enzym 5 α -Reduktase II. Testosteron und DHT binden intrazellulär an den Androgenrezeptor, wobei DHT eine höhere Affinität aufweist als Testosteron selbst. Der Hormon-Rezeptor-Komplex lagert sich im Zellkern an die DNA der Zielgene der Geschlechtsdifferenzierung und wirkt dort als Transkriptionsfaktor. Die zelluläre Androgenwirkung ist in Abb. 1 schematisch zusammengefaßt.

Fehlen Testosteron und DHT, degenerieren die Wolffschen Gänge und die Entstehung eines männlichen Phänotyps wird verhindert. Es bildet sich eine Vagina aus. Zusätzlich entwickeln sich durch Fehlen des AMH aus dem Müllerschen Gang Uterus und Eileiter, sodaß sich ein weiblicher Phänotyp bildet.

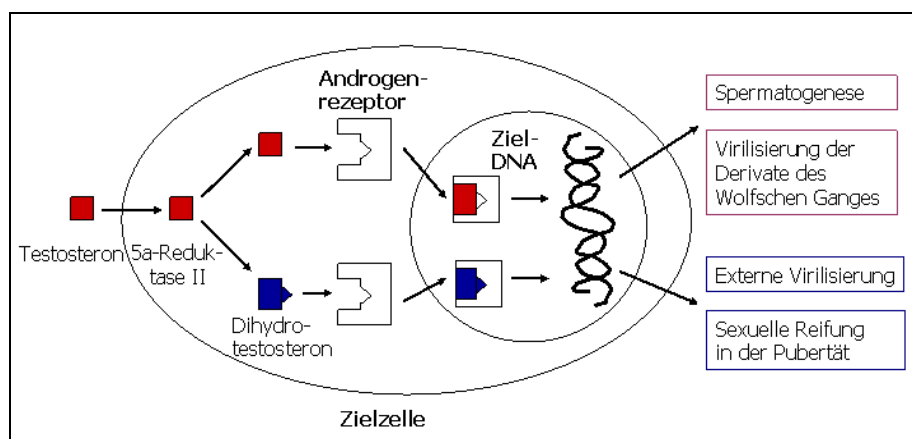


Abbildung 1: Wirkungsweise der Androgene über den AR beim männlichen Embryo, vereinfachte Darstellung (verändert nach Hiort, 1999b)

Störungen der Geschlechtsentwicklung bei männlichen Neugeborenen treten mit einer Häufigkeit von ca. 1 % auf (Hellwinkel, 1999), jedoch ist eine schwerwiegende Virilisierungsstörung seltener. Bei Geburt auffällige Virilisierungsstörungen haben eine Häufigkeit von ca. 0,012-0,017 % (Lanz, persönliche Kommunikation, Dissertation in Vorbereitung; Sax, 2002). Ursachen für intersexuelle Syndrome sind vielfältig und können auf jeder Stufe der Geschlechtsentwicklung auftreten.

Bei Gonadendysgenesien, z. B. durch 45,X0/46,XY-Mosaik oder Mutationen im SRY-Gen, werden keine differenzierten Hoden ausgebildet. Da bei intaktem Hoden die weitere Differenzierung unter hormoneller Kontrolle steht, können Störungen auf allen Ebenen der Androgensynthese zu Defekten führen. Bei frühen Syntheseschritten, wie dem 3 β -Hydroxydehydrogenase-Mangel, ist oft zusätzlich die Mineral- oder Glucocorticoidsynthese gestört. Bei späteren Schritten, wie der Umwandlung von Androstendion zu Testosteron durch das Enzym 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase III (17 β -HSD III), wird nur die Ausbildung der äußeren Geschlechtsorgane durch isolierten Mangel an Testosteron beeinträchtigt (Twosten et al., 2000). Bei diesen Defekten werden keine inneren weiblichen Geschlechtsorgane ausgebildet, da die Synthese des Anti-Müller-Hormons nicht betroffen ist.

Weiterhin kann bei normaler Androgensynthese eine Störung der Geschlechtsentwicklung durch eine Endorganresistenz verursacht werden. Obwohl hierbei Testosteron regelhaft gebildet wird und in die Zielzellen gelangt, kann es dort seine Wirkung nicht entfalten, da kein funktionsfähiger Rezeptor zur Wirkungsvermittlung vorliegt. Dieses Syndrom wird Androgenresistenzsyndrom (früher: Testikuläre Feminisierung) oder Androgen Insensitivity Syndrome (AIS) genannt. Phänotypisch kann es unterschiedliche Schweregrade annehmen. Je nach Virilisierungsgrad weisen die Patienten einen normal männlichen Phänotyp mit nur geringer Maskulinisierungsstörung und/oder Infertilität auf, haben ein intersexuelles Genitale von Mikrophallus mit Hypospadie bis Klitorishypertrophie (partielles Androgenresistenzsyndrom = PAIS) oder sie sind komplett feminisiert und wachsen als Mädchen heran (komplettes Androgenresistenzsyndrom = CAIS). Nach Sinnecker lassen sich die Phänotypen in Grad 1 (männlich) bis 5 (weiblich)

einteilen (Sinnecker et al., 1997). Die Klassifikation ist in Tab. 1 mit Beispielen in Abb. 2 ausführlich aufgeführt.

Typ	Phänotyp	Phänotyp / Funktion
1	männlich, PAIS	gestörte Spermatogenese und/oder gestörte Virilisierung in der Pubertät
2	vorwiegend männlich, PAIS	isolierte Hypospadie und/oder Mikropenis und höhergradige Hypospadie, Skrotum bipartitum
3	ambivalent, PAIS	klitorisähnlicher Mikrophallus, labienähnliches Skrotum bipartitum, perineoskrotale Hypospadie oder Sinus urogenitalis mit kurzer, blind endender Vagina
4	vorwiegend weiblich, PAIS	Klitorishypertrophie und/oder labiale Fusion, Sinus urogenitalis mit kurzer, blind endender Vagina
5	weiblich, CAIS	keine Virilisierungszeichen, in der Pubertät Virilisierung bei 5RII-Defekt, Feminisierung bei AR-Defekt

Tabelle 1: Klassifikation der Androgenresistenz-Grade nach Sinnecker (Sinnecker et al., 1997)

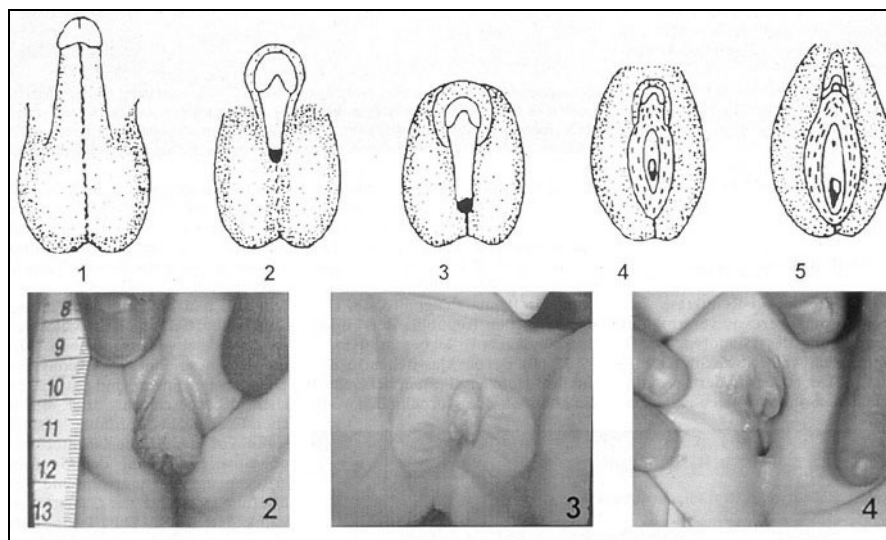


Abbildung 2: Klinische Darstellung der Schweregrade des AIS (aus Hiort et al., 1998)

AIS-Patienten weisen einen unauffälligen männlichen Karyotyp 46,XY auf. Sie haben Hoden, die meist in der Leiste oder den Labia majora liegen, aber keine ausreichend ausdifferenzierten Wolffschen Gänge. Da die AMH-Bildung nicht beeinträchtigt ist, bilden sie keine Müllerschen Strukturen wie Uterus und Eileiter aus. Der Testosteronspiegel im Blut ist normal oder erhöht, wodurch das AIS von Testosteronbiosynthese-Defekten differentialdiagnostisch abgegrenzt werden

kann. Zur Differenzierung vor der Pubertät dienen hormonelle Stimulationstests, da durch die Ruhephase der Keimdrüsen vor der Pubertät die Androgene auch bei gesunden Kindern sehr niedrig sind. Bei Stimulation durch hCG beobachtet man einen Anstieg der Testosteron- und DHT-Konzentration im Serum, der bei Androgensynthesestörungen ausbleibt. Ein weiteres diagnostisches Mittel ist der SHBG-Androgenresistenztest (Sinnecker et al., 1989). Nach Stimulation mit dem synthetischen Steroid Stanozolol wird ein Androgenrezeptor-vermittelter Abfall des Sexualhormonbindenden Globulins (SHBG) im Blut gemessen, sodaß die SHBG-Konzentration weniger als 62,1 % des Ausgangswertes beträgt. Bei Androgenrezeptordefekten ist der Abfall geringer, demnach liegt die SHBG-Konzentration über 62,1 % des Ausgangswertes. Normalerweise korreliert der SHBG-Test gut mit dem Phänotyp und erlaubt eine Abschätzung der Rezeptorrestfunktion. Die Spezifität ist hoch, die Sensitivität jedoch gering (Albers et al., 1997; Hiort, 1999a).

Defekte der 5α -Reduktase II, früher als Pseudovaginale Perineoskrotale Hypospadie bezeichnet, fallen auch unter das Androgenresistenzsyndrom. Hierbei ist die periphere Umwandlung von Testosteron zu DHT gestört, sodaß in den Zellen des äußeren Genitales eine ausreichende Virilisierung unterbleibt. Hier sind ebenfalls unterschiedliche Schweregrade, entsprechend denen des Androgenrezeptordefektes, bekannt. Die Ausbildung der inneren Genitalien ist durch die normale Testosteronwirkung unauffällig, davon abgesehen gleicht das Krankheitsbild dem der AR-Defekt-vermittelten Androgenresistenz. Erst in der Pubertät virilisieren diese Patienten durch die intakte Testosteronbildung, bilden jedoch keine Brustdrüse aus, wohingegen Patienten mit komplettem Androgenrezeptordefekt in der Pubertät feminisieren (Wilson et al., 1993; Hiort, 1999b). Endokrinologisch ist im Gegensatz zum Androgenresistenzsyndrom durch AR-Defekte der T/DHT-Quotient nach hCG-Stimulation bei ausgeprägten Störungen häufig erhöht. Bei geringen Virilisierungsdefiziten wurden bei den Patienten auch unauffällige T/DHT-Ratios von unter 16 gemessen (Hiort et al., 1996b; Sinnecker et al., 1997).

1.2 Molekulare Grundlagen des Androgenrezeptors und der 5 α -Reduktase II

Für die Vermittlung der Testosteronwirkung und die Pathophysiologie der Androgenresistenz sind auf molekularer Ebene der Androgenrezeptor und die 5 α -Reduktase II von besonderer Bedeutung.

Testosteron ist als lipophiles Molekül in der Lage, frei durch die Zellmembran der Zielzellen zu diffundieren, um dort seine Wirkung zu entfalten. In der Zelle bindet es an den Androgenrezeptor (AR), ein Protein, das zur Familie der Steroidhormonrezeptoren gehört. Der Hormon-Rezeptor-Komplex lagert sich im Zellkern an die DNA der Zielgene der Geschlechtsdifferenzierung und wirkt dort als Transkriptionsfaktor. In den Zielzellen liegt der Androgenrezeptor einfach phosphoryliert in inaktiver Form vor. Er ist mit rezeptorassoziierten Proteinen verbunden, unter anderem mit Heat Shock Proteinen wie HSP 90. Damit er als Transkriptionsfaktor wirken kann, müssen sich Testosteron oder DHT anlagern. Dadurch spalten sich die Heat Shock Proteine ab, was zu einer weiteren Phosphorylierung führt. Nun kann der Rezeptor die Kernmembran passieren und dimerisiert im Zellkern mit einem weiteren aktivierten AR. Das Dimer lagert sich an androgenresponsive Elemente (ARE) in den Promotoren der Zielgene und reguliert hier die Transkription.

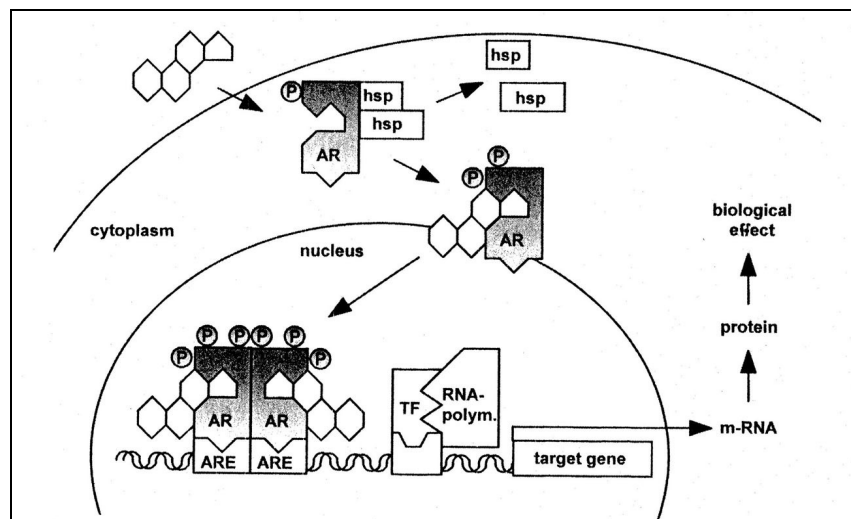


Abbildung 3: Androgen-Wirkungsvermittlung durch den Androgenrezeptor. P: Phosphorylierung, hsp: heat shock protein, TF: Transkriptionsfaktor, ARE: Androgen-responsive Elemente, RNA-Polym.: RNA-Polymerase (aus Hiort et al., 1998)

Der AR besitzt drei Abschnitte, die aminoterminalen Region, die die Transkriptionsaktivität moduliert (Simental et al., 1991), die DNA-Bindungsdomäne, die zwei Zinkfinger enthält, und die Hormonbindungsdomäne am carboxyterminalen Ende. Er ist 910-919 Aminosäuren lang (Trapman et al., 1988; Tilley et al., 1989). Das Gen des Androgenrezeptors liegt auf dem X-Chromosom im Abschnitt Xq11-12. Es ist ca. 90 kb lang und enthält 8 Exons. Exon 1 ist das längste Exon, es kodiert für die transaktivierende Region. Exon 2 und 3 kodieren für die DNA-Bindungsregion, und Exon 4 bis 8 enthalten die Informationen für die Hormonbindungsregion. Das RNA-Transkript ist 10,5 kb lang, wobei einen großen Teil hiervon 5'UTR und 3'UTR, also die untranslatierten Regionen, die Exon 1 bis 8 flankieren, ausmachen. Die von Exon 1 bis 8 kodierten Bereiche selbst sind nur 2,7 kb lang. Die Promotorregion des Androgenrezeptors ist z. T. im 5'UTR der mRNA enthalten. In ihr befinden sich zwei Transkriptionsinitiationsbereiche, AR-TIS1 und AR-TIS2. Außerdem wird sie durch einen Homopurin-Abschnitt und eine GC-Box charakterisiert (Faber et al., 1991; Faber et al., 1993).

Die Expression des AR in den Fibroblasten der externen Genitalien variiert interindividuell bei männlichen Individuen nur geringfügig. Unabhängig vom Alter wird der AR in gleichbleibender Menge transkribiert und in seiner Transkription nicht durch Androgene beeinflusst (Hellwinkel et al., 2000b).

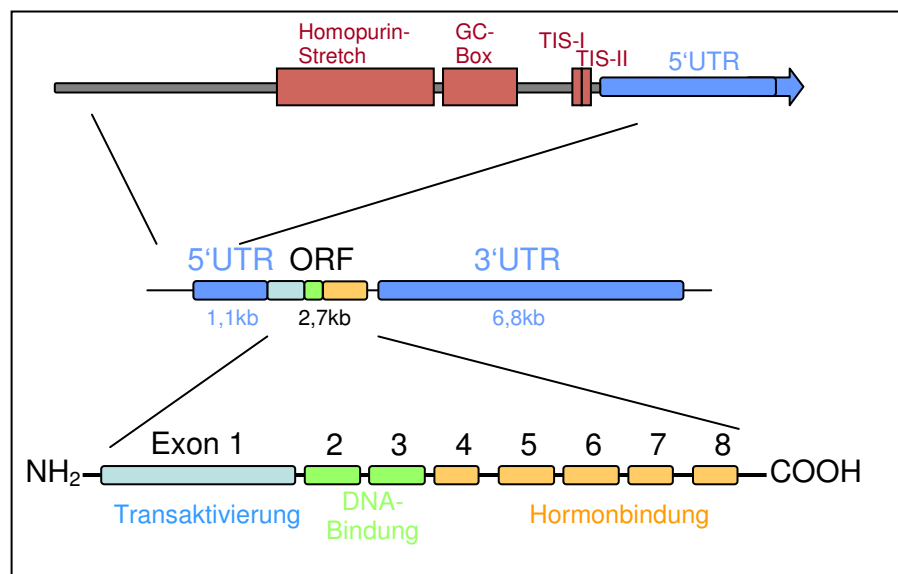


Abbildung 4: Androgenrezeptor-Gen mit Struktur der mRNA (Mitte), der Promotorregion (oben) und Funktionen der 8 Exons (unten)

Bei Androgenrezeptordefekten, die AIS verursachen, können unterschiedliche Bereiche des AR, wie z. B. die Ligandenbindungsstelle oder die DNA-Bindungsstelle, von Alterationen betroffen sein. So kann der AR seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht wahrnehmen. Die Zielgene werden nicht im Sinne der Androgenwirkung aktiviert oder deaktiviert. Im AR-Gen wurden in allen acht Exons Mutationen nachgewiesen, die für AIS verantwortlich sind (Gottlieb, 2003). Außerdem sind Deletionen bekannt, die nahezu in allen Fällen zu einem kompletten AIS führen, und Splicesite-Mutationen, häufig Intron-Mutationen, die zu aberranten Varianten des Transkripts führen. Bei den exonischen Mutationen handelt es sich meist um Punktmutationen, aus denen ein Basenaustausch resultiert. Non-Sense-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stopcodon und so zu einem Kettenabbruch führen, sind meist mit einem kompletten AIS vergesellschaftet. Mutationen, die nur zu einer Aminosäuresubstitution führen, wurden in allen Exons gefunden, sind aber in der Hormonbindungsregion am häufigsten. Sie beeinträchtigen sowohl qualitativ als auch quantitativ die DNA- und Ligandenbindung. Erfolgt eine Aminosäuresubstitution, ist das klinische Bild sehr vielfältig. Sowohl komplettes als auch partielles AIS treten auf. Sogar bei identischen Mutationen in verschiedenen Patienten wurden phänotypische Unterschiede beobachtet (Hiort et al., 1998; Boehmer et al., 2001). Das weist darauf hin, daß die verbliebene Restfunktion des Rezeptors nicht allein von der Mutation an sich abhängig ist. Die schlechte Genotyp-Phänotyp-Korrelation läßt sich in einigen Fällen durch somatische Mutationen in einem Teil der Körperzellen, sog. Mosaik, erklären, die zu Mischgeweben aus gesunden und betroffenen Zellen führen. In ihnen wird teils ein intakter AR, teils ein mutierter AR exprimiert (Holterhus et al., 1999). Aber auch bei in der Keimbahn mutiertem AR-Gen ist die Transkriptionsrate interindividuell nicht einheitlich. So wurden unterschiedliche Transkriptmengen bei Patienten mit identischen Mutationen gefunden (Hellwinkel et al., 2000a). Bei zwei verwandten Patienten mit identischer Mutation im AR-Gen und unterschiedlichen Phänotypen gewann der mutierte Rezeptor in Transaktivierungsuntersuchungen mit steigender Testosteronkonzentration seine Funktion zurück (Holterhus et al., 2000). Das könnte ein Hinweis für eine

Abhängigkeit des Phänotyps von einer embryonal verfügbaren Testosteronmenge sein.

Die 5α -Reduktase ist intrazellulär für die DHT-Synthese verantwortlich. Sie ist ein Enzym mit zwei Isoformen. Die 5α -Reduktase Typ 1 wird vor allem in den Haarfollikeln und in der Leber exprimiert (Russell et al., 1994). Die 5α -Reduktase Typ 2 (5RII) hingegen wird vorwiegend in den Zellen der äußeren Geschlechtsorgane gebildet. Dort reduziert das Enzym Testosteron zu Dihydrotestosteron (DHT) mittels $\text{NADPH} + \text{H}^+$. DHT weist eine höhere Affinität zum Androgenrezeptor auf als Testosteron selbst.

Das Gen für die 5RII, das SRD5A2-Gen, liegt auf Chromosom 2 im Abschnitt 2p23. Es enthält fünf Exons. Hiervon kodieren Exon 1 und 2 für die hormonbindende Domäne und Exon 3 bis 5 für die Coenzym-bindende Domäne, die $\text{NADPH} + \text{H}^+$ bindet.

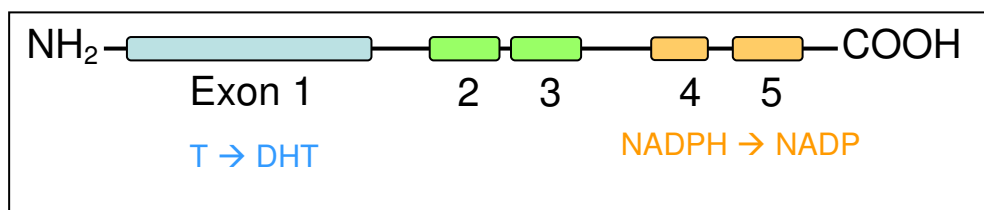


Abbildung 5: 5α -Reduktase II-Gen mit von den 5 Exons kodierten Proteinabschnitten

Im Gegensatz zum AR ist die Expression der 5α -Reduktase II sehr variabel. Interindividuell finden sich große Unterschiede in der Transkriptmenge. Generell sind jedoch bei Kleinkindern 5RII-Transkripte in den Genitalgeweben in deutlich größeren Mengen meßbar als bei Erwachsenen. Hellwinkel beobachtete bis zu 27-fache Unterschiede in der Transkriptmenge, mit Spitzenwerten im Kleinkindalter, die mit der Pubertät stark abfielen und sich bis zum Erwachsenenalter nicht mehr stark veränderten. Inkubation mit den Androgenen Testosteron und DHT führte nicht zur Veränderung der Transkriptionsrate (Hellwinkel et al., 2000b).

Auch beim Gen der 5α -Reduktase II sind Deletionen und Punktmutationen, die Androgenresistenz hervorrufen, sowohl in Splicesites als auch in allen Exons bekannt (Wilson et al., 1993). Es finden sich ebenfalls verfrühte Stopcodons und

einfache Aminosäuresubstitutionen. Auch bei diesen Mutationen findet sich keine schlüssige Genotyp-Phänotyp-Korrelation (Hiort, 1999a).

1.3 Fragestellung

Bei einigen Patienten, die ein Androgenresistenzsyndrom aufweisen, ist die molekulargenetische Ursache für die Störung nicht bekannt. Klinisch und endokrinologisch weisen sie alle Merkmale des AIS auf, molekularbiologisch kann allerdings kein Hinweis auf eine Mutation im AR-Gen oder 5RII-Gen gefunden werden. Hier kann die Erkrankung somit nicht auf eine strukturelle Störung der Androgenrezeptor- bzw. 5α -Reduktase II-DNA zurückgeführt werden. Die Ursache ist auf einer anderen Ebene zu suchen. So könnte statt der Gene selbst deren Expression sowohl auf der RNA-Ebene (Transkription) als auch auf der Proteinebene (Translation) auf vielerlei Weisen gestört sein. Bei intakter Testosteronbildung könnte eine unzureichende Expression des Androgenrezeptors eine zu geringe Rezeptormenge, um das hormonelle Signal zu übermitteln, in den Zellen bedingen. Testosteron würde somit nicht ausreichend zur Wirkung kommen. Ebenso könnte eine fehlerhafte Transkription oder Translation der 5α -Reduktase II dazu führen, daß von der intakten DNA eine unzureichende mRNA- oder Protein-Menge gebildet wird. Zur Transkription eines Gens sind außer dem Promotor und der unspezifischen RNA-Polymerase II weitere genspezifische Transkriptionsfaktoren notwendig. Bisher sind bei weitem nicht alle Transkriptionsfaktoren bekannt. Es ist daher auch denkbar, daß eine Störung im Bereich der Transkriptionsfaktoren oder in anderen rezeptorassoziierten Proteinen die Transkription beeinträchtigt.

In der vorliegenden Arbeit soll daher zunächst geklärt werden, inwiefern die Transkriptmenge des AR und der 5RII in Genitalhautfibroblasten (GHF) von AIS-Patienten ohne Mutation im AR- oder 5RII-Gen reduziert ist. Nach Kultivierung von Genitalhautfibroblasten und Isolation der RNA soll mit Hilfe von cDNA-Synthese und kompetitiver RT-PCR die AR- und 5RII-Transkriptmenge semiquantitativ im Vergleich zu Normalkontrollen gemessen werden.

Eine wichtige Rolle bei der Ausprägung des Androgenresistenzsyndroms spielt darüber hinaus die noch nicht vollständig geklärte Expressionskontrolle des AR und der 5RII. In verschiedenen Geweben wurden bei unterschiedlichen Tieren und dem Menschen androgengesteuerte Autoregulationsmechanismen der Transkription von AR und 5RII nachgewiesen (George et al., 1991). Für menschliche Genitalhautfibroblasten wurde allerdings kein Einfluß durch Androgene festgestellt (Hellwinkel et al., 2000b).

Dennoch gibt es Anzeichen für eine sensible Phase in der Embryonalzeit, in der Androgene einen regulierenden Einfluß auf die AR- und 5RII-Genexpression im Genitalbereich haben könnten. In der 18. bis 22. Gestationswoche wird der Androgenrezeptor im Stroma der äußeren Genitalien männlicher und weiblicher Embryos in ähnlicher Verteilung stark exprimiert (Kalloo et al., 1993). Später finden sich geschlechtsspezifische Expressionsmuster einer Reihe von Genen, die für Differenzierung und Morphologie verantwortlich sind (Holterhus et al., 2002). Diese scheinen durch Androgene geprägt zu sein, da sie auch bei normalen männlichen Individuen, Patienten mit PAIS und phänotypisch weiblichen Patienten mit CAIS unterschiedlich ausfallen (Holterhus et al., 2003a; Holterhus et al., 2003b). Da die Transkription des AR und diese Expressionsmuster postpartal androgenunabhängig sind, wird postuliert, daß pränatale Androgensignale während einer kurzen sensiblen Phase zu einer Programmierung langanhaltender androgenunabhängiger Transkriptionsprogramme in genitalen Zellen beitragen könnten. Dies könnte auch für die Transkription des AR und der 5RII gelten. Störende Einflüsse in diesem zeitlichen Abschnitt könnten dann durch Störung der Androgenrezeptor-Expression und damit der Geschlechtsdifferenzierung zum Bild des AIS führen. Ebenso könnten durch Fixierung von Expressionsraten und möglichen autoregulatorischen Einflüssen je nach Zeitpunkt der Störung identische Mutationen zu unterschiedlichen klinischen Ausprägungen des Krankheitsbilds führen und ein Hinweis auf die Ursache der schwachen Genotyp-Phänotyp-Korrelation des AIS sein.

Daher soll in einer weiteren Fragestellung dieser Arbeit untersucht werden, ob eventuelle temporäre Autoregulationsmechanismen die Expression des AR und der 5RII beeinflussen. Hierzu wird die Transkription des AR und der 5RII in GHF von

AIS-Patienten, die keine Mutation aufweisen, mit und ohne Testosteroninkubation verglichen. Zusätzlich wird die Transkription mit und ohne Testosteron in GHF von Patienten, die eine bekannte Mutation im HSD17B3-Gen haben, bestimmt. Bei diesen Patienten ist die Testosteronbiosynthese durch einen Defekt des Enzyms 17 β -HSD III gestört. Daher dürfte der postulierte Regulationsmechanismus bei ihnen nicht existieren und die Transkriptionsmuster des AR und der 5RII Rückschlüsse auf die Existenz und Art eines Autoregulationsmechanismus ermöglichen.

Zusammenfassend ergeben sich also folgende Fragen:

- 1) Ist die Transkription des Androgenrezeptors und der 5 α -Reduktase II bei Patienten mit klinischem AIS ohne Mutationsnachweis im Vergleich zu normalen Individuen verändert? Sind diese Veränderungen bei den Patienten einheitlich, sodaß sich hier die Ursache der Störung annehmen ließe?
- 2) Verändert die Inkubation mit Testosteron das Transkriptionsverhalten von AR und 5RII in Genitalhautfibroblasten dieser Patienten? Finden sich Hinweise auf Autoregulationsmechanismen?
- 3) Wird die Transkription des AR und der 5RII bei Patienten mit Mutation im 17 β -HSD III-Gen (HSD17B3-Gen) durch Inkubation mit Testosteron verändert? Finden sich hier Hinweise auf Autoregulationsmechanismen?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

Die zu untersuchenden Patienten stammen aus der Einsendekartei für molekulargenetische Analysen der DFG-Forschergruppe "Intersexualität – vom Gen zur Geschlechtsidentität" der Kinderklinik der Universität Lübeck. In dieser Kartei werden seit 1991 über 1300 Patienten aus Deutschland und Teilen Europas gesammelt und untersucht.

Für die Untersuchungen zur AR- und 5RII-Transkription in AIS-Patienten wurden 12 Patienten untersucht. Alle Patienten wiesen einen 46,XY-Karyotyp und klinisch ein AIS auf. Um die normale Testosteronsynthese zu überprüfen, wurden hCG-Stimulationstests durchgeführt. Als ausreichende Stimulation wurden mindestens doppelte Erhöhung (Ahmed et al., 1999) oder ein Anstieg auf mindestens 2,9 ng/ml (10 nmol/l, Feyaerts et al., 2002) angesehen. Um einen Androgenrezeptordefekt zu bestimmen, wurden in einigen Fällen SHBG-Tests durchgeführt, wobei Werte über 62,1 % pathologisch sind. Sonographisch wurde nach Rudimenten der Müllerschen Gänge, Uterus und Eileiter, gesucht. Molekularbiologisch wurde auf Mutationen im Androgenrezeptor-Gen und im 5 α -Reduktase II-Gen untersucht. Bei keinem der Patienten ließen sich Mutationen nachweisen. Die Sensitivität der Mutationsscreenings mittels SSCP-Analyse beträgt ca. 95 % (Hiort et al., 1994; Hiort et al., 1996a). Für die Untersuchungen zu Regulationsmechanismen der AR- und 5RII-Transkription wurden zusätzlich vier Patienten mit bekannten Mutationen im 17 β -HSD III-Gen herangezogen.

Als Patientenmaterial (dargestellt durch ARD-Nummern) dienten Genitalhautfibroblasten und gonadale Fibroblasten von eigenen und auswärtigen Patienten. Die Gewebeproben waren während Korrekturoperationen entnommen worden. Die Eltern der Patienten haben ihr Einverständnis zur Probenentnahme gegeben, und die Zustimmung der Ethikkommission zu dem Projekt liegt vor.

Als Normalkontrollen (dargestellt durch hVHF-Nummern, hVHF = humane Vorhautfibroblasten) dienten Genitalhautfibroblasten von ungefähr gleichaltrigen Patienten, die keine Geschlechtsdifferenzierungsstörung hatten.

Die Gewebeproben waren ihnen bei Operationen aus medizinischer (Phimose) oder kultureller Indikation entnommen worden.

Im Überblick sind die Daten zu Patienten und Normalkontrollen mit untersuchter Gewebeart und Alter der Gewebeentnahme in Tabelle 2 und 3 aufgeführt.

	AIS-Grad	zugew. Geschlecht	Müllersche Derivate	Mutation	Testosteron (ng/ml)		DHT (ng/ml)		SHBG-Test
					vor Stim.	nach Stim.	vor Stim.	nach Stim.	
ARD 37-2	III	m	-	-	0,08	0,97	0,13	0,45	50,90%
ARD 320-2	III	m	-	-		6,6		0,73	
ARD 345-2	II	m	-	-	<0,05		<0,01		
ARD 350-3	III	w	-	-	0,087	4,06	0,0667	0,4002	42,60%
ARD 389-2	III	m	-	-	<0,1	4,4			61,90%
ARD 402-2	V	w	-	-	0,398	2,97	0,09	0,3	
ARD 444-2	II	m	-	-					
ARD 529-2	II	m	-	-	0,29	2,262	0,0725	0,7337	
ARD 674-5	III	m	-	-	2,78				
ARD 714-4	II	m	-	-	0,053				
ARD 832-2	III	m	-	-	0,14	3,11			60,90%
ARD 150-2	IV	w	-	-	0,04	1,4	<0,01	0,15	55,60%
Androstendion(ng/ml)									
ARD 111-2	IV	w	-	17 β HSD Intron III	<0,0232	0,0609			62,10%
ARD 623-2	IV	w	-	17 β HSD Exon 3/5	1,84	1,77	2,49	5,23	
ARD 57-4	IV	w	-	17 β HSD Exon/Intron	0,1	0,4	0,8	1,9	54,20%
ARD 876-2	IV	w	-	17 β HSD Exon 3/5	0,19		0,75		

Tabelle 2: Klinische und molekularbiologische Befunde der untersuchten Patienten (Patienten durch ARD-Nummern gekennzeichnet) Zugew.: zugewiesen, m: männlich, w: weiblich, Stim.: Stimulation mit hCG

	Alter bei Operation	Gewebe	Normalkontrolle (NC)	Alter NC bei Operation
ARD 37-2	4 J.	GHF	hVHF 44-3	3 J. 9 Mo.
ARD 320-2	11 Mo.	GHF	hVHF 2-3	11 Mo.
ARD 345-2	4 J. 7 Mo.	GHF	hVHF 18-2	4 J. 8 Mo.
ARD 350-3	3 J. 9 Mo.	GHF	hVHF 44-3	3 J. 9 Mo.
ARD 389-2	2 J. 5 Mo.	GHF	hVHF 36-2	2 J. 7 Mo.
ARD 402-2	1 J.	GHF	hVHF 2-3	11 Mo.
ARD 444-2	4 J. 8 Mo.	GHF	hVHF 18-2	4 J. 8 Mo.
ARD 529-2	10 Mo.	GHF	hVHF 2-2	11 Mo.
ARD 674-5	5 Mo.	GHF	hVHF 1-5	8 Mo.
ARD 714-4	2 J. 10 Mo.	GHF	hVHF 35-2	2 J. 10 Mo.
ARD 832-2	8 J. 7 Mo.	GHF	hVHF 11-2	8 J. 10 Mo.
ARD 150-2	6 J. 5 Mo.	GoF	hVHF 34-2	6 J. 7 Mo.
ARD 111-2	9 J. 10 Mo.	GHF	hVHF 11-2	8 J. 10 Mo.
ARD 623-2	12 J. 3 Mo.	GHF	hVHF 51-3	12 J. 4 Mo.
ARD 57-4	10 J. 5 Mo.	GoF	hVHF 10-2	9 J. 2 Mo.
ARD 876-2	1,5 Mo.	GoF	hVHF 50-2	1 Mo.

Tabelle 3: Patienten und zugeordnete Normalkontrollen, gekennzeichnet durch hVHF-Nummern. GHF: Genitalhautfibroblasten, GoF: Gonadale Fibroblasten, hVHF: humane Vorhautfibroblasten, J.: Jahre, Mo.: Monate

Besonderheiten bei einzelnen Patienten waren folgende:

- Die vier Patienten ARD 345-2, ARD 444-2, ARD 674-5 und ARD 714-4 erfüllten die Eingangskriterien nicht vollständig. Da bei ihnen in auswärtigen Krankenhäusern keine hCG-Stimulationstests durchgeführt worden waren, ist eine Testosteronsynthesestörung wie eine Mutation im 17 β -HSD III-Gen nicht auszuschließen. Klinisch stellte sich dann ein ähnliches Krankheitsbild dar, daß sich von der Androgenresistenz durch erhöhte Androstendion- und erniedrigte Testosteronspiegel und vermehrt weibliche Ausprägungen unter den Patienten unterscheidet (Twosten et al., 2000). Von Patient ARD 674-5 lag nur der Basalwert für Testosteron vor. Dieser war jedoch im normalen Bereich (2,78 ng/ml bei einem Alter von 5 Monaten), sodaß eine Testosteronsynthesestörung unwahrscheinlich ist. Patient ARD 444-2 hat einen Bruder, der unter demselben Krankheitsbild leidet. Eine erbliche Komponente ist also wahrscheinlich, schließt somit aber auch Testosteronbiosynthesestörungen nicht aus. Die Patienten ARD 345-2 und ARD 714-4 waren bei Untersuchung in einem Alter, in dem die Testosteron-Basalwerte so niedrig sind, daß sie nicht differentialdiagnostisch aussagefähig sind. Zur Beurteilung ist hier zusätzlich zu den Testosteron-Basalwerten (bei Patient ARD 345-2 <0,05 ng/dl bei einem Alter von 4 7/12 Jahren bzw. bei Patient 714-4 0,053 ng/ml bei einem Alter von 2 10/12 Jahren) ein hCG-Stimulationstest nötig, um eine Testosteronsynthesestörung auszuschließen. Weitere klinische Befunde waren ein VACTERL-Syndrom bei ARD 345-2 und proportionierter Kleinwuchs bei ARD 714-4. Bei diesen vier Patienten wurde im Verlauf zusätzlich ein Screening auf Mutationen im 17 β -HSD III-Gen mittels SSCP-Analyse durchgeführt. Bei dreien (ARD 345-2, ARD 444-2 und ARD 714-4) wurden keine Auffälligkeiten gefunden, bei ARD 674-5 fand sich eine auffällige Bande im Exon 11, die sich bei der Sequenzierung als heterozygoter Polymorphismus Gly289Ser herausstellte. Wegen der zu den Eingangskriterien passenden klinischen Befunde wurden die Patienten jedoch zunächst in die Studie integriert.
- Bei Patient 320-2 fehlt zum Stimulationswert der Basalwert. Eine Testosteronsynthesestörung kann aber relativ sicher ausgeschlossen werden,

da der alleinige stimulierte Wert eine hohe Testosteronproduktion nachweist. ARD 320-2 ist ein Zwilling, der zweite Zwilling ist gesund.

- Bei der Patientin ARD 402-2 lag zudem ein Androgenbindungsassay vor, der die Androgenbindungskapazität und Affinität der Rezeptorproteine darstellt. Es ließ sich keine spezifische Bindung nachweisen. Als Nebenbefund lag eine Hydronephrose vor.
- Weitere Zusatzbefunde waren Frühgeburtlichkeit (hypotrophes Frühgeborenes) und ein persistierendes Foramen Ovale bei ARD 389-2, eine Gaumenspalte bei ARD 529-2 und ein Turricephalus bei Frühgeburt 2 Monate vor dem Termin bei ARD 832-2.
- Alle fünf Patienten (ARD 37-2, ARD 150-2, ARD 350-3, ARD 389-2, ARD 832-2), bei denen SHBG-Tests durchgeführt worden waren, wiesen normale Testergebnisse auf. Die Sensitivität des Tests ist jedoch gering und falsch-negative Ergebnisse wurden bereits bei PAIS-Patienten und Patienten mit Mosaik-Mutationen im AR beschrieben (Albers et al., 1997; Hiort, 1999a). Auch bei diesen Patienten deuten die Testergebnisse auf eine atypische Form von Androgenresistenz hin.

Teilweise standen für die Untersuchungen nur gonadale statt Genitalhautfibroblasten zur Verfügung. Für Untersuchungen am Androgenrezeptor können diese Zellen jedoch verwendet werden, denn in der Transkription des AR zeigten sich bei den Patienten von Hellwinkel keine Unterschiede zwischen gonadalen Fibroblasten und Genitalhautfibroblasten (Hellwinkel et al., 2000a). In Androgenbindungsstudien wiesen gonadale Fibroblasten von AIS-Patienten dasselbe Verhalten auf wie Genitalhautfibroblasten von Patienten (Coulam et al., 1984). Aus der Auswertung von Untersuchungen zur 5 α -Reduktase II werden diese Zellen jedoch isoliert, da in normalen humanen Testes keine 5RII-mRNA nachgewiesen werden kann (Russell et al., 1994; Levine et al., 1996).

2.2.2 RNA-Isolation

RNEasy-Minikit Qiagen, Hilden, Deutschland

QIAshredder-Säulen Qiagen, Hilden, Deutschland

DEPC-H₂O

1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) auf 1 l Aqua bidest, 24 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend autoklaviert

10x MOPS (3-(N-Morpholino-)Propansulfonsäure-Puffer)

200 mM MOPS, 80 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA in DEPC-H₂O, pH 7,0

RNA-Sample Buffer

750 µl Formamid (desionisiert), 150 µl 10x MOPS-Puffer, 240 µl 37 % Formaldehyd, 100 µl Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, 100 µl DEPC-H₂O

2.2.3 cDNA-Synthese

Primer Eurogentech, Seraing, Belgien

hARE4a, hARE8a, 5RIIE4a, L7neua (Sequenzen siehe 2.2.4), mit DEPC-H₂O auf 20 pmol/µl verdünnt

Kompetitoren zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Olaf Hellwinkel

5x Reaktionspuffer Gibco BRL, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

DDT 100 mM Gibco BRL, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

dNTPs 100 mM	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
RNAse-Inhibitor 40 U/μl	Roche Boehringer-Mannheim, Mannheim, Deutschland
Superscript II RT Reverse Transcriptase 200 U/μl	Gibco BRL, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

2.2.4 PCR

Ampli-Taq DNA-Polymerase (5 U/μl) Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland

dNTP-Set (100 mM) Pharmacia, Freiburg, Deutschland

10x PCR-Puffer

500 mM KCl, 200 mM Tris (pH s. u.), 500 μg/ml BSA (bovines Serumalbumin), MgCl₂ (Konz. s. u.) in 1 ml Aqua bidest

10x TE-Puffer

10 ml 1M Tris pH 8,0 und 292 mg Na-freies EDTA auf 100 ml Aqua bidest. pH 7,5 mit HCl einstellen

Primer (nach Hellwinkel et al., 2000b) Eurogentech, Seraing, Belgien

hARE1s: 5'- TGG ATG GAT AGC TAC TCC GG -3'

hARE4a: 5'- ACT ACA CCT GGC TCA ATG GC -3'

hARE8a: 5'- GAG GAG TAG TCG AGA GTT ATA A -3'

hAREPROM1s: 5'- TCT CCA AAG CCA CTA GGC AG -3'

hAREPROM1a:	5'- TGT ACA GCA CTG GAC G -3'
hAREPROM2s:	5'- GGA GCC AGC TTG CTG GGA GAG -3'
hAREPROM2a:	5'- ACC GAA GAG GAA AGG GCA GCT C -3'
5RIIE1SIIs:	5'- ACG TGC CTT CCT TCG CGG TG -3'
5RIIE4a:	5'- GTG GCC AGG GCA TAG CCG AT -3'
L7neus:	5'- GGA ACC ATG GAG GGT GTA GA -3'
L7neua:	5'- GAA AAA TAA TCA TGG TAG AC -3'

Kompositprimer zur Kompetitorherstellung

T7-hARE1s:

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GTG GAT GGA TAG CTA CTC CGG -3'

hARE3a-4aComp:

5'- ACT ACA CCT GGC TCA ATG GCC CAG AGT CAT CCC TGA TTA A -3'

T7-5RIIE1SIIs:

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG CTG CCT TCC TTC GCG GTG -3'

5RIIE2a-4aComp:

5'- GTG GCC AGG GCA TAG CCG ATC TGT GTA CCA CCC ATC AGG G -3'

2.2.5 Gele

Agarose	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich, Irvine, Großbritannien
PAA Polyacrylamid-Gebrauchslösung Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Irvine, Großbritannien
TEMED (N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Irvine, Großbritannien
ϕ 174-Phage-Marker (Hae III-verdaut)	New England Biolabs, Schwalbach im Taunus, Deutschland
pBR 322-Marker (Msp I-verdaut)	New England Biolabs, Schwalbach im Taunus, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Aldrich-Irvine, Großbritannien
Silbernitrat	Caesar & Loretz, Hilden, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Hamburg, Deutschland
10x TBE-Puffer	
436 g Tris(Base), 223 g Borsäure (pH 8,3), 37,2 g Na ₂ -EDTA in 4 l Aqua bidest	
2x DNA-Ladepuffer für Agarose-Gele	
50 % Glycerin, 0,02 % Bromphenolblau, 10 mM Tris(NO ₃) (pH 8,0), 0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat), 3 mM EDTA in Aqua bidest	

6x DNA-Ladepuffer für PAA-Gele

0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin in Aqua bidest

Blue Stop Puffer

95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol, mit Aqua bidest bis 100 %

2.2.6 Northern Blot

SDS (Natriumdodecylsulfat)

Sigma, Aldrich-Irvine, Großbritannien

AR-RNA-Sonde (DIG-markiert)

zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat.
Olaf Hellwinkel

Aktin-DNA-Sonde (DIG-markiert)

zur Verfügung gestellt vom pathologischen
Institut der Universität Lübeck

DIG-Blockingreagenz

Roche Boehringer-Mannheim, Mannheim,
Deutschland

DIG Easy Hyb Hybridisierungspuffer

Roche Boehringer-Mannheim, Mannheim,
Deutschland

Anti-Digoxigenin-AP

Roche Boehringer-Mannheim, Mannheim,
Deutschland

CDP-Star

Roche Boehringer-Mannheim, Mannheim,
Deutschland

Northern Blot Denaturierlösung

50 mM NaOH und 1,5 M NaCl in DEPC-H₂O

Northern Blot Neutralisierlösung

0,5 M Tris(HCl) (pH 7,4) und 1,5 M NaCl in DEPC-H₂O

20x SSC-Lösung

3 M NaCl und 0,3 M NaCitrat in DEPC-H₂O, 2x filtriert, pH 7,0 eingestellt und autoklaviert

Maleinsäurepuffer Boe I

0,1 M Maleinsäure und 0,15 M NaCl in DEPC-H₂O, sterilfiltriert und autoklaviert

10x Blocking Puffer (10x Boe II)

10 % DIG-Blockingreagenz-Pulver in Maleinsäurepuffer (Boe I) aufgelöst

Detektionspuffer Boe III

100 mM Tris(HCl) (pH 9,5) und 100 mM NaCl in H₂O bidest autoklaviert

2.2.7 Geräte

Zellkulturbank Nuaire	Nuaire Biological Safety Cabinets, Plymouth, USA
Zentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer DNA/RNA-calculator	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
UV-Lampe MacroVue UV-25	Pharmacia(Hoefler), Freiburg, Deutschland
Thermocycler PTC 200 DNA-engine	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Vakuumblotter TransVac TE 80	Hoefler Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultur

Es wurde darauf geachtet, daß Patienten- und zugehörige Kontroll-Zellkultur eine ähnliche und möglichst niedrige Passagenanzahl hatten, damit die Ergebnisse untereinander vergleichbar blieben. Es wurde bereits gezeigt, daß bis in die achte Passage keine Veränderungen in der AR- und 5RII-Transkription meßbar sind (Hellwinkel, unveröffentlichte Beobachtung).

Auftauen und Aussaat der Zellen

Alle Arbeiten an Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank der Sicherheitsklasse II durchgeführt. Die Zellen wurden in 1,5 ml Füttermedium mit 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Pro Patient bzw. Kontrollindividuum wurde ein Kryoröhrchen mit Zellen entnommen. Die Zellen wurden aufgetaut, in 9 ml DMEM Füttermedium aufgenommen und 8 min bei 1200 U/min zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Zell-Pellet wurde in DMEM-Füttermedium aufgenommen und auf drei 75 cm³-Zellkulturflaschen mit jeweils 10 ml DMEM als Nährmedium ausgesät. Zwei Flaschen wurden für die späteren Experimente herangezogen. Die Zellen der letzten Flasche wurden wieder eingefroren.

Die Bebrütung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C in 21 % O₂- und 4 % CO₂-haltiger Luft.

Füttern der Zellen und Passagierung (Trypsinieren)

Alle zwei bis drei Tage wurde das Wachstum der Zellen beurteilt und das Füttermedium ausgetauscht. Hierzu wurden Wachstumsdichte und Morphologie der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Das alte Medium wurde aspiriert und 10 ml neues DMEM-Füttermedium hinzugefügt.

In einigen Fällen waren Passagierungen nötig, um zwischen Patienten und Normalkontrollen gleiche Bedingungen (Passagenzahl, Wachstumsdauer) zu erreichen. Zellkulturflaschen, deren Zellen zu 100 % konfluent waren, d.h. deren

gesamter Boden mit Zellen bewachsen war, wurden trypsinisiert. Hierzu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 25 ml PBS gewaschen. Nach dem Entfernen des PBS wurden 2 ml Trypsin hinzugefügt und auf den Zellen gleichmäßig verteilt. Das Trypsin bewirkte ein Ablösen der Zellen vom Flaschenboden, da es Interzellularbrücken spaltet. Nach Ablösung der Zellen wurde die Reaktion durch Zugabe von 8 ml DMEM gestoppt. Die Zellsuspension wurde aufgenommen und 8 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in 10 ml DMEM resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Dieser Vorgang wird als Passagierung bezeichnet.

Inkubation mit Testosteron

Sobald die Zellen angewachsen waren und ca. 50 % Konfluenz erreicht hatten, wurde jeweils eine der drei Flaschen pro Patient bzw. Normalkontrolle mit 100 nM Testosteron inkubiert.

Zunächst wurden die Zellen 48 h in steroidfreiem DCC-FCS-haltigem DMEM-Füttermedium präinkubiert. DCC absorbiert im FCS befindliche Steroide. Dadurch war zu Inkubationsbeginn garantiert, daß das Medium frei von endogenem Testosteron war. Alle Zellen wurden ab diesem Zeitpunkt mit steroidfreiem Medium gefüttert. Die Versuchsreihen wurden jeweils mit 100 nM Testosteron supplementiert bzw. ohne Testosteron im Füttermedium inkubiert. Nach 48-72 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und die RNA isoliert.

Einfrieren und Aufbewahrung von Zellen

Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit PBS gewaschen und danach trypsinisiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 1,5 ml DMEM mit 10 % DMSO (Einfriermedium) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Zellen wurden 1 h auf Eis und danach 24 h im Vorgefrierbehälter bei -70 °C vorgekühlt, bevor sie in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert wurden.

2.3.2 RNA-Isolation

Alle Arbeiten mit RNA wurden unter RNase-armen Bedingungen durchgeführt.

Bei 100 % Konfluenz wurden die Zellen lysiert und die RNA isoliert. Hierzu wurden die Zellen mit 25 ml PBS gewaschen. Die RNA-Isolation erfolgte mittels des RNEasy-Kits von Qiagen. Im Folgenden wird eine kurze Beschreibung des Vorgangs gegeben.

Zuerst wurde je 600 µl Lysepuffer mit Mercapto-Ethanol pro Flaschen mit einem Zellschaber gründlich verteilt. Die Lysate wurden anschließend in Qiashreder-Säulen gegeben und bei 13.000 U/min geschert. Dann wurde das Lysat auf RNEasy-Säulen appliziert und nach dem RNEasy-Handbuch mittels verschiedener Puffer bei 10.000 U/min gereinigt. Die RNA blieb währenddessen durch Ethanol an die Filtermembran der Säule gebunden. Zuletzt wurde die RNA mit 60 µl 80 °C heißem RNasefreiem Wasser aus dem Filter eluiert.

RNA-Quantität und Qualität

Die Konzentration der isolierten RNA wurde anhand der optischen Dichte (OD) bei 260 nm photometrisch gemessen und das Verhältnis der ODs bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt. Dies stellt einen Wert für die Reinheit der RNA dar. Eine Ratio von 1,4 bis 1,7 gibt einen zufriedenstellenden Reinheitsgrad wieder.

Die Gesamtkonzentration der RNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$OD \times K \times VF = X \text{ µg RNA/ ml Ausgangslösung,}$$

wobei K die spezifische Konstante für RNA, hier 40, und VF den Verdünnungsfaktor, hier 20, darstellt.

Zur qualitativen Beurteilung wurde die RNA auf einem 5-prozentigen RNA-Agarose-Gel optisch überprüft. Hierzu wurden je 3 µl RNA mit 12 µl Sample Buffer und 0,75 µl Ethidiumbromid versetzt, bei 65 °C für 15 min denaturiert und dann auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Das Gel wurde aus 52 ml DEPC-Wasser mit 0,9 g Agarose, 6 ml 10x MOPS und 3 ml Formaldehyd hergestellt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS. Die RNA wurde bei ca. 60 V für 1 h größenfraktioniert. Das Ergebnis der Elektrophorese wurde unter UV-Licht beurteilt und photographiert. Um einen Verdau durch RNAsen auszuschließen, mußten prominente 28S-rRNA- und 18S-

rRNA-Banden auf dem Gel zu sehen sein. Die 28S-rRNA-Bande sollte dabei stärker sein als die 18S-rRNA-Bande. Die mRNA befindet sich hauptsächlich zwischen diesen Banden. Ein zusätzliches Qualitätsmerkmal stellte eine sichtbare 45S-rRNA-Bande dar (s. Abb. 6).

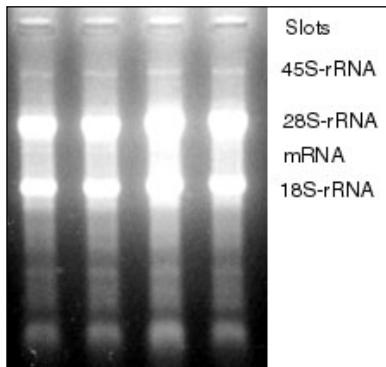


Abbildung 6: RNA-Agarose-Gel mit qualitativ hochwertiger RNA (hier v. l. n. r. Material der Patienten ARD 389-2 +T, ARD 389-2 -T, hVHF 36-2 +T, hVHF 36-2 -T)

2.3.3 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese werden durch das Enzym Reverse Transkriptase aus der isolierten mRNA komplementäre DNA-Kopien synthetisiert. Mittels der spezifischen Primer wurde nur die zu untersuchende RNA revers transkribiert. Spezifische Kompetitoren wurden hinzugefügt, um eine semiquantitative Untersuchung durchführen zu können. Diese Kompetitoren sind RNA-Standards in bekannter Konzentration, welche jeweils dieselbe Sequenz aufweisen wie die zu untersuchenden Amplifikate und in der PCR dasselbe Amplifikationsverhalten vorweisen (Siebert, 1993b). Die Kompetitoren sind lediglich um einige Basenpaare deletiert, um bei der Elektrophorese vom Ziel-PCR-Produkt, dem Target, unterschieden werden zu können (s. Abb. 8). Durch den Vergleich der Bandenstärken lassen sich Rückschlüsse auf die Menge des Ziel-Transkripts ziehen.

Zur Herstellung der Kompetitoren wurde mit Hilfe von Kompositprimern aus geeigneter Target-cDNA des AR- bzw. 5RII-Gens durch PCR Amplifikate erzeugt, die am 3'-Ende eine artifizielle Deletion und am 5'-Ende eine T7-RNA-Polymerase-

Erkennungssequenz enthielten. Der 3'-Kompositprimer besaß eine veränderte Komplementär-Sequenz, in der Teile verschiedener Exons kombiniert waren. Dadurch entstand ein verkürztes PCR-Produkt, das dennoch von dem bei der RT-PCR eingesetzten Antisense-Primer erkannt werden konnte (s. Abb. 7). Die T7-Erkennungssequenz am 5'-Ende des Produkts diente der In-Vitro-Transkription mit T7-RNA-Polymerase, um die Kompetitoren in RNA umzuschreiben (Celi et al., 1993; Edelstein et al., 1994; Hellwinkel, 1999; Hellwinkel et al., 2000b).

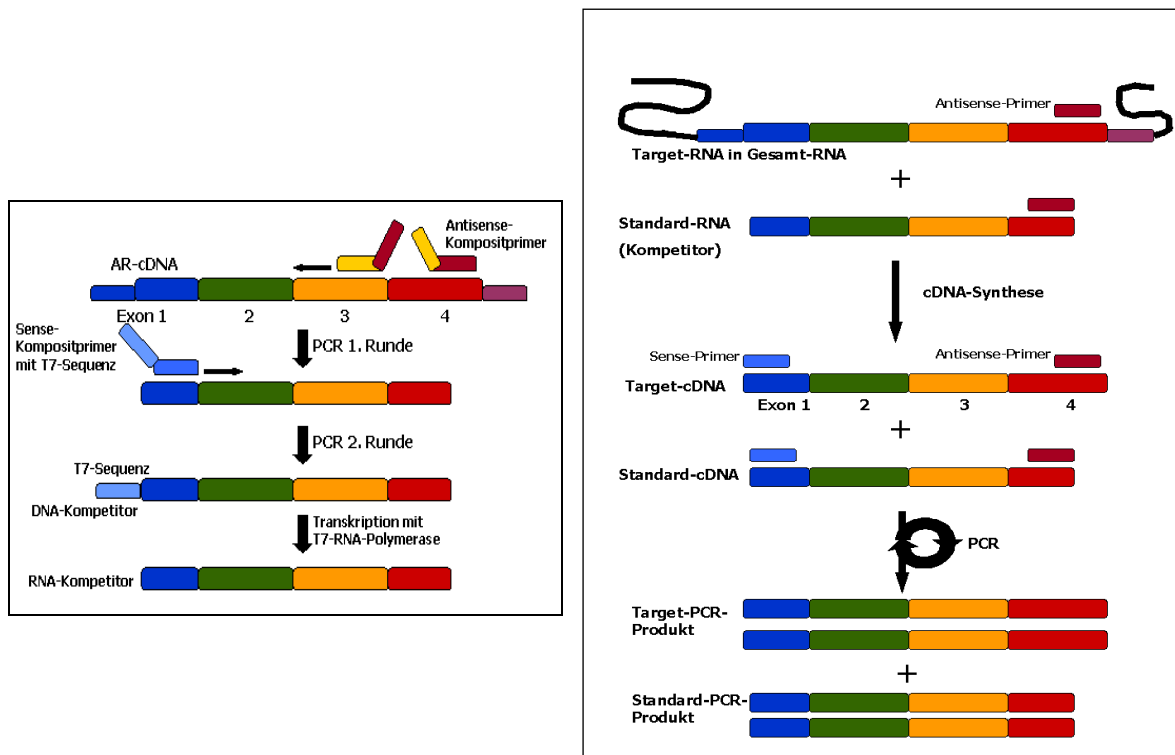


Abbildung 7 und 8: Prinzip der Kompetitor-Konstruktion am Beispiel des AR-Transkripts in Abb. 7 und Funktionsweise der kompetitiven RT-PCR in Abb. 8 (verändert nach Hellwinkel, 1999). Das Kompetitor-konstrukt wird durch artifizielle Deletion im AR-Gen hergestellt und durch Einfügen einer T7-RNA-Polymerase-Erkennungsstelle in RNA umgeschrieben. Nach der kompetitiven RT-PCR weist es aufgrund seiner Länge ein vom Target unterscheidbares Laufverhalten auf.

Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde in einen cDNA-Synthese-Ansatz gegeben. Pro RNA-Probe wurden drei cDNA-Synthesen mit Kompetitor und eine ohne Kompetitor zur Kontrolle durchgeführt. Als weitere Kontrolle diente die RT-PCR des Proteins L7. L7 ist ein ribosomales Haushaltsgen, das in allen Zellen in gleicher Menge exprimiert wird.

Je 1 μl Antisense-Primer hARE4a, 5RIIE4a und L7neua sowie die AR- und 5RII-Kompetitoren in unterschiedlichen Konzentrationen wurden zu den Ansätzen hinzugegeben und für 5 min auf 70 °C erhitzt, um die RNA zu denaturieren. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt. Je 2 μl DTT, 2 μl dNTPs, 4 μl Reaktionspuffer (5x Sample Buffer) und 0,25 μl RNase-Inhibitor wurden zu den Ansätzen gegeben. Die Reaktionsgemische wurden auf 37 °C erhitzt und nach zwei Minuten 1 μl 1:5 verdünnte Reverse Transkriptase, entsprechend 40 U, hinzugefügt. Nach einer Stunde bei 37 °C wurde die cDNA-Synthese beendet.

Beim Androgenrezeptor wurde, von den Spezialuntersuchungen abgesehen, in allen Fällen eine einheitliche Konkretorkonzentration gewählt, 0,2 aMol/ μg RNA, da die Konzentration der AR-mRNA beim Gesunden üblicherweise nicht stark variiert (Hellwinkel et al., 2000b). Bei ARD 37-2 und der dazugehörigen Normalkontrolle mußte mit 0,5 μg RNA gearbeitet werden, da die isolierten RNA-Gesamt mengen zu niedrig waren. Bei diesem Ansatz wurde eine Konkretorkonzentration von 0,4 aMol/ μg RNA verwendet. Bei der 5 α -Reduktase II schwankt die Konzentration im Laufe des Lebens und auch interindividuell sehr stark (Hellwinkel, 1999). Daher wurden entsprechend des Alters der Patienten in den meisten Fällen drei unterschiedliche Konkretorkonzentrationen gewählt, von 0,02 bis 0,2 aMol/ μg RNA.

2.3.4 PCR

Es wurden Reaktionslösungen aus je 1 μl cDNA, 5 μl 2 mM dNTPs, 5 μl 10x PCR-Puffer, je 1 μl (20 pmol) Sense- und Antisense-Primer und 0,2 μl (1 U) Taq-Polymerase hergestellt und mit Aqua bidest auf 50 μl aufgefüllt. Für die PCR des Androgenrezeptor-Promotors wurde statt der cDNA 1 μl DNA aus Leukozyten mit einer Konzentration von 100 ng/ μl verwendet.

Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

PCR-Bedingungen						
Transkript	Transkriptlänge	Kompetitor-Länge	Primer	Annealing-temperatur	Zyklen	Puffer
AR	Exon 1 (Np +1653) - Exon 4 (Np +2845) 479 bp	324 bp	hARE 1s/ hARE 4a	60 °C	34	pH 9,0/ MgCl ₂ 10 mM
AR	Exon 1 (Np +1653) - Exon 8 (Np +4377) 1268 bp		hARE 1s/ hARE 8a	60 °C	34	pH 9,0/ MgCl ₂ 10 mM
5RII	Exon 1 (Np +170) - Exon 4 (Np +623) 454 bp	278 bp	5RIIE1SIIIs/ 5RIIE4a	66 °C 64 °C 65 °C 65 °C	31	pH 8,7/ MgCl ₂ 7,5 mM pH 8,6/ MgCl ₂ 10 mM pH 9,0/ MgCl ₂ 15 mM pH 8,7/ MgCl ₂ 10 mM pH 8,8/ MgCl ₂ 7,5 mM
L7	Np +5 - Np +816 812 bp		L7 neu s/ L7 neu a	56 °C	24	pH 9,0/ MgCl ₂ 10 mM pH 8,6/ MgCl ₂ 15 mM
AR Prom S1	Np -153 - Np +123 276 bp		ARProm 1a/s	60 °C	30	pH 8,6/ MgCl ₂ 20 mM
AR Prom S2	Np +23 - Np +237 214 bp		ARProm 2a/s	60 °C	30	pH 8,4/ MgCl ₂ 15 mM

Tabelle 4: PCR-Bedingungen. Np: Nukleotidpaar, bp: Basenpaar, AR Prom S1/2: AR Promotorregion Segment 1/2

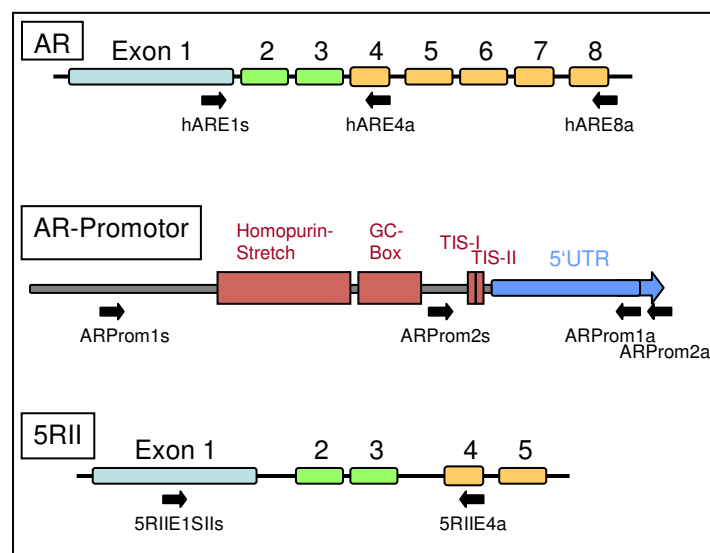


Abbildung 9: Anlagerungsstellen der PCR-Primer (s. Tabelle 4) der AR- und 5RII-cDNA und der AR-Promotor-DNA

Die PCR-Routine lief für die AR-, 5RII- und L7-PCRs unter folgenden Bedingungen:

- 5 min 94 °C
- 1,5 min Annealing-Temperatur (s. Tabelle 4)
- 2 min 72 °C

dann die in Tabelle 4 angegebene Zyklenzahl mit jeweils

- 1,25 min 94 °C
- 1,5 min Annealing-Temperatur
- 5 min 72 °C

Bei den PCRs über die Androgenrezeptor-Promotorregion waren die Bedingungen folgende:

5 min	98 °C
30 sec	60 °C
2 min	72 °C

dann 30 Zyklen mit jeweils

1 min	96 °C
30 sec	60 °C
1,5 min	72 °C

Anschließend wurden die PCR-Produkte bei 4 °C aufbewahrt.

Um die Effizienz und Einheitlichkeit der cDNA-Synthese zu überprüfen, wurden von der L7-cDNA die PCR-Produkte nach 24 Zyklen ausgewertet. Bis zu dieser Zyklusanzahl steigen die Produktmengen exponentiell an, wohingegen sich die Produktmenge im weiteren Verlauf asymptotisch einem Plateau nähert (Hellwinkel, 1999). Nach 24 Zyklen kann kontrolliert werden, ob die RNA-Konzentrationen im RT-Ansatz vergleichbar sind (s. Beispiel in Abb. 10).

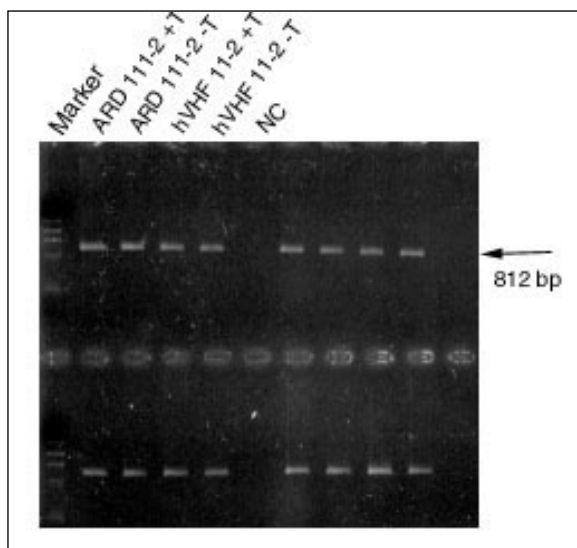


Abbildung 10: Agarose-Gel einer L7-PCR, vier PCR-Durchgänge des gleichen Patienten und Normalkontrolle, v. l. n. r.: Patient +T, Patient -T, Normalkontrolle +T, Normalkontrolle -T, NC: Negativkontrolle. Die L7-Banden zeigen identische Stärken und damit identische Ausgangs-RNA-Mengen in den Reaktionsansätzen.

2.3.5 Gele

Agarose-Gele

Zur Auswertung der PCR wurden die Produkte auf 2-prozentigen Agarose-Gelen in 1x TBE bei 70-100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Je 5 µl Ladepuffer wurde mit 10 µl PCR-Produkt vermischt. Als Marker diente ϕ 174, als Laufpuffer 1x TBE. Die Gele wurden nach der Elektrophorese 15 min in Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml Ethidiumbromid in H₂O) gefärbt und unter UV-Licht bewertet und photographiert.

Polyacrylamid (PAA)-Gel

Die 5-prozentigen PAA-Gele wurden aus 30 ml Rotiphorese Gel 30, 7,5 ml Glycerin, 15 ml 10x TBE-Puffer, 1 ml APS und 96,5 ml Aqua bidest kalt angerührt. 70 µl TEMED dienten zum Starten der Polymerisation. Nach 1 h Aushärten und 30 min Vorlauf mit Ladepuffer wurden jeweils 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl Ladepuffer versetzt auf das PAA-Gel aufgetragen. Als Marker diente pBR322, als Laufpuffer 1x TBE. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte über 3-4 h bei 40 W.

Single strand conformation polymorphism (SSCP)-Gel

SSCP ist eine Methode zum Auffinden von Punktmutationen in der DNA. Das Prinzip beruht darauf, daß DNA-Einzelstränge sich unterschiedlich schnell im elektrischen Feld bewegen, da sie eine für ihre Sequenz typische Konformation einnehmen. Ein Basenaustausch führt zu einer veränderten Tertiärstruktur und daher zu einer anderen Laufgeschwindigkeit.

Für das SSCP-Gel wurden die PCR-Produkte der ARProm1/2-PCRs verwandt. Das Gel besteht aus einem nicht-denaturierten PAA-Gel mit 10 % Glycerin. Vor dem Beladen des Gels wurden 10 µl Probe mit 8 µl Blue Stop Puffer gemischt und die DNA durch Denaturieren bei 96 °C für 10 min in Einzelstränge aufgetrennt. Als Marker diente hierbei ϕ 174, als Laufpuffer 1x TBE. Das Gel lief bei 8 W ca. 17 h (Hiort et al., 1994).

Färben der PAA-Gele

Die PAA-Gele (inkl. SSCP-Gel) wurden nach dem Lauf in einer Silberlösung gefärbt. Hierzu wurden die Gele zunächst 5 min in 10 % Ethanol fixiert, danach 3 min in 1 % HNO₃ äquilibriert, und nach zweimaligem kurzen Waschen in Aqua bidest 30 min in Silbernitratlösung (2,02 g AgNO₃/l H₂O) gefärbt. Danach wurden die Gele erneut 2x kurz mit Aqua bidest gewaschen und mit Entwickler (29,6 g Na₂CO₃ + 540 µl 37 % Formaldehyd/l H₂O) versetzt. Waren die Banden sichtbar, wurden die Gele zum Stoppen der Reaktion kurz in 10 % Essigsäure, dann je 5 min in 50 mM EDTA (pH 8,0) und Aqua bidest geschwenkt und schließlich zur Aufbewahrung in Folie eingeschweißt.

2.3.6 Densitometrische Analyse

Die PAA-Gele wurden eingescannt und die gefärbten Banden computerdensitometrisch ausgewertet (ImageMaster 1d, Pharmacia Biotech). Das Programm mißt die optische Dichte (OD) der einzelnen Banden. Die optische Dichte der Banden von Ziel-RT-PCR-Produkt (Target T)- und Kompetitor-RT-PCR-Produkt (Standard S) wurden im Verhältnis zueinander gesetzt und in einer dimensionslosen Zahl A(T/S) nach folgender Formel angegeben:

$$OD_T / OD_S = A(T/S)$$

A(T/S) gibt die relative AR- bzw. 5RII-mRNA-Menge an. Somit lassen sich unterschiedliche Proben durch den Kompetitor semiquantitativ untereinander vergleichen (Hellwinkel, 1999).

2.3.7 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Statistica (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA) vorgenommen. Für die Analysen wurden der Wilcoxon-Test für zwei abhängige nichtparametrische Stichproben, der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige nichtparametrische Stichproben und der Kruskal-Wallis-Test für

mehr als zwei unabhängige nichtparametrische Stichproben verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf $\alpha = 0,05$ festgesetzt.

2.3.8 Northern Blot

Blotten

Alle Schritte erfolgten unter RNasearmen Bedingungen.

Wie unter 2.3.2 beschrieben, wurde zunächst ein Agarose-RNA-Gel hergestellt. Je 4 μg RNA wurden aufgetragen und aufgetrennt. Das Ergebnis wurde unter UV-Licht photographisch dokumentiert. Danach wurde das Gel zunächst 5-10 min in Denaturierlösung und dann 30 min in Neutralisierlösung inkubiert. Schließlich erfolgte die Äquilibration des Gels in 20x SSC für 10 min.

Im Vakuumblotter wurden die RNA-Fragmente in 20x SSC über 2-3 h mit einem Sog von ca. 10 mmHg aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylon-Membran "gezogen" (blotten). Um die RNA auf der Membran zu fixieren, wurde die Membran nach dem Blotten zunächst im UV-Crosslinker bestrahlt und dann bei 50 °C für 15-30 min getrocknet.

Hybridisierung

Der Blot wurde in einem Falconröhrchen mit 10 ml Dig-Easy-Hyb Hybridisierlösung 2 h bei 68 °C drehend prähybridisiert. Anschließend wurde der Blot in 5 ml neuer, auf 68 °C vorgewärmter Hybridisierlösung mit 3 μl AR-RNA-Sonde in einer Konzentration von 20 ng/ μl 16 h hybridisiert.

Nach Ablauf der Hybridisierung wurde der Blot zweimal 5-10 min in 2x SSC/0,1 % SDS-Lösung bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgte das stringente Waschen mit niedriger Salzkonzentration, bei dem unspezifisch gebundene Sonden gelöst wurden. Hierzu wurde der Blot zweimal 15 min mit 0,1x SSC/0,1 % SDS-Lösung bei 68 °C gewaschen.

Detektion

Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur vorgenommen. Vor der Detektion wurde der Blot zur Äquilibration in Maleinsäurepuffer Boe I geschwenkt, dann wurde er 30 min in 1x Blockingpuffer Boe II geschwenkt, um unspezifische Bindestellen der nachfolgenden Antikörper-Inkubation abzublocken.

Anschließend wurde der Blot mit dem Detektionsreagenz Anti-Dig-AP (0,75 µl in 5 ml 1x Boe II) eine Stunde inkubiert. Danach wurde er zweimal mit Boe I 15 min gewaschen und zweimal 3 min mit Detektionspuffer Boe III inkubiert, um auf die gewünschten Bedingungen zu äquilibrieren.

Nun wurde der Blot in einem Hybridisierungsbeutel mit 500 µl CDP-Star eine Stunde inkubiert. Auf einem Röntgenfilm wurde danach das Chemilumineszenz-Signal der Androgenrezeptor-RNA dargestellt. Der Blot wurde je nach Signalstärke 30 sec bis 10 min exponiert.

Rehybridisierung mit Aktin-Sonde

Um Konzentrationsunterschiede der geblotteten Gesamt-RNAs festzustellen, wurde der Blot mit einer Aktin-DNA-Sonde hybridisiert. Aktin-RNA dient als Kontrolle, da es in allen Zellen in derselben Konzentration vorhanden ist.

Hierfür wurde der Blot 10 min in 2x SSC gewaschen. Alle weiteren Schritte ab der Prähybridisierung erfolgten wie oben beschrieben, allerdings erfolgten Hybridisierung und stringentes Waschen bei 42 °C statt bei 68 °C.

3. ERGEBNISSE

3.1 AR- und 5RII-Transkription in GF von Patienten mit AIS

3.1.1 Transkription des Androgenrezeptors

Um die Transkription des Androgenrezeptors zu messen, wurden kompetitive RT-PCRs durchgeführt. Nach jeweils drei PCR-Durchgängen ergaben sich bei der densitometrischen Analyse die in Abb. 11 dargestellten Ergebnisse. Bei allen Patienten zeigten die Target-Banden eine korrekte Länge. Die Rohdaten und zwei PAA-Gele mit densitometrischer Analyse als Beispiel der Ergebnisse sind in Tabelle 11 und Abb. 31 bis 34 im Anhang aufgeführt. In den folgenden Beschreibungen sind mit genitalen Fibroblasten sowohl Genitalhautfibroblasten als auch gonadale Fibroblasten, in Tabellen zu unterst aufgelistet, bezeichnet.

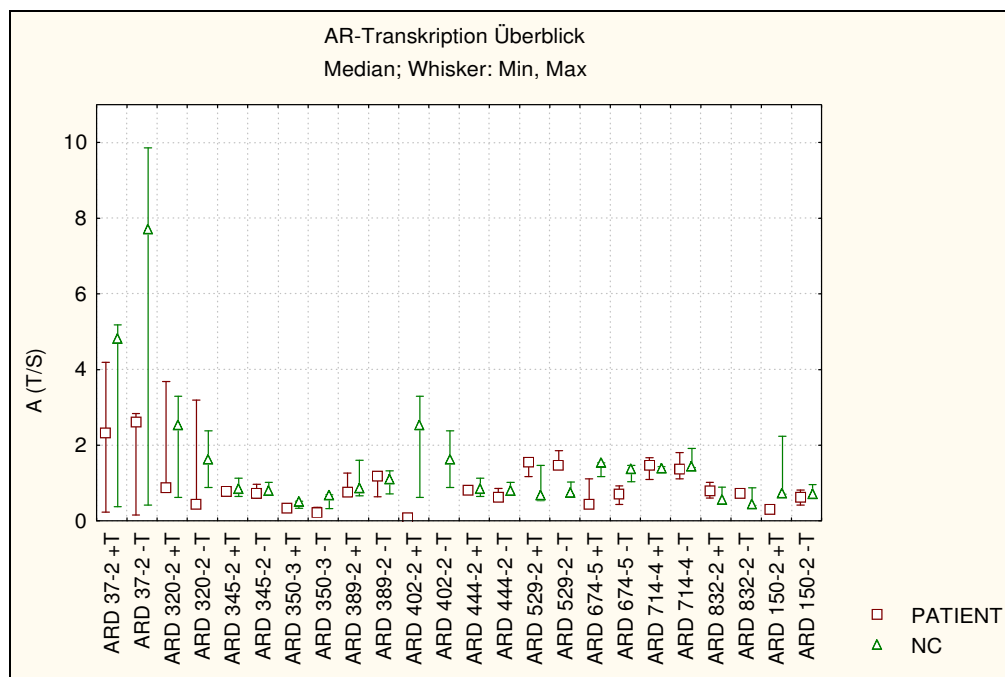


Abbildung 11: graphische Darstellung der Transkription des Androgenrezeptor-Gens nach 3 PCRs in A(T/S)-Werten. Durch die Symbole sind die Mediane gekennzeichnet, die Spannweite umfaßt das Minimum und Maximum. +T: mit Testosteroninkubation, -T: ohne Testosteroninkubation, NC: Normalkontrolle

Vergleich der Transkription der ARD- mit hVHF-Zellen

Die Transkription des AR in den genitalen Fibroblasten der Patienten wurde mit der gleichaltriger Normalkontrollen verglichen. Dabei wurde die Transkription in Normalkontrollen als 100 % festgelegt.

Tendenziell war in Patienten-Zellen die Transkription des Androgenrezeptors verringert, aber Wilcoxon-Tests zeigten, daß der Unterschied zwischen Patienten und Normalkontrollen nicht signifikant war. Bei sieben Patienten war die Transkription des AR-Gens geringer als bei Normalkontrollen, bei zwei Patienten war sie höher. Die Ergebnisse aller Patienten schwankten jedoch sehr breit zwischen nicht mehr meßbaren Werten und 217 %, der Median betrug 91 % der Normalkontrollen-Expression (mit Testosteroninkubation) bzw. 79 % (ohne Testosteron). Einen Überblick über alle Ergebnisse gibt die folgende Tabelle:

	Vergleich mit hVHF			
	mit T		ohne T	
	Median	Ergebnisintervall	Median	Ergebnisintervall
ARD 37-2	60,8%	48,2% - 80,9%	33,8%	28,8% - 37,8%
ARD 320-2	111,7%	33,7% - 141,5%	45,9%	26,9% - 134,0%
ARD 345-2	100,5%	61,4% - 120,6%	90,3%	82,4% - 94,7%
ARD 350-3	67,8%	62,3% - 102,7%	54,1%	29,3% - 67,4%
ARD 389-2	88,4%	79,1% - 114,9%	89,3%	89,3% - 112,2%
ARD 402-2	3,1%	3,0% - 3,1%	0,0%	
ARD 444-2	94,1%	67,6% - 137,3%	79,1%	78,3% - 83,8%
ARD 529-2	217,1%	105,7% - 227,9%	185,9%	180,3% - 213,1%
ARD 674-5	28,0%	25,2% - 95,5%	63,3%	32,0% - 68,9%
ARD 714-4	114,4%	76,4% - 120,5%	78,2%	71,4% - 128,3%
ARD 832-2	133,6%	114,4% - 143,5%	149,0%	86,7% - 179,0%
ARD 150-2	40,2%	13,7% - 42,8%	85,4%	70,1% - 88,9%
Durchschnitt	88,3%		79,5%	
SD	53,6%		47,3%	
Median	91,3%		78,6%	

Tabelle 5: Transkription des AR in ARD- und hVHF-Zellen. Der Wert gibt die Transkriptionsrate von ARD-Zellen im Verhältnis zu 100 % Transkription in hVHF-Zellen an. Das Ergebnisintervall bezeichnet die Spannweite der gemessenen Einzelwerte. mit T bzw. ohne T: mit bzw. ohne Testosteroninkubation, SD: Standardabweichung

Besonders auffällig waren die Ergebnisse bei ARD 402-2. Hier wurde eine stark verringerte Transkription nachgewiesen, die nach Testosteroninkubation auf 3,1 % im Vergleich zur Normalkontrolle verringert war. Die drei Banden waren optisch

nur sehr schwach zu erkennen, nur zwei von drei Banden waren auswertbar. Bei Proben ohne Testosteron-Inkubation war keine Transkription meßbar.

Aus diesen Gründen wurden bei dieser Patientin zusätzlich RT-PCRs mit niedrigeren Kompetitorkonzentrationen von 0,01 bis 0,2 aMol/ μ g RNA durchgeführt. Die Target-Banden, die bei Kompetitorkonzentrationen von 0,01 und 0,02 aMol/ μ g bei der Patientin noch sichtbar waren, waren bei höheren Konzentrationen ab 0,05 aM/ μ g nicht mehr zu erkennen. Die AR-Banden befanden sich allerdings immer an der erwarteten Lokalisation bei 479 bp auf dem Gel, was gegen eine strukturelle Veränderung der RNA zwischen Exon 1 und 4 spricht. In Abb. 12 ist das PAA-Gel dieser zusätzlichen Untersuchungen aufgeführt.

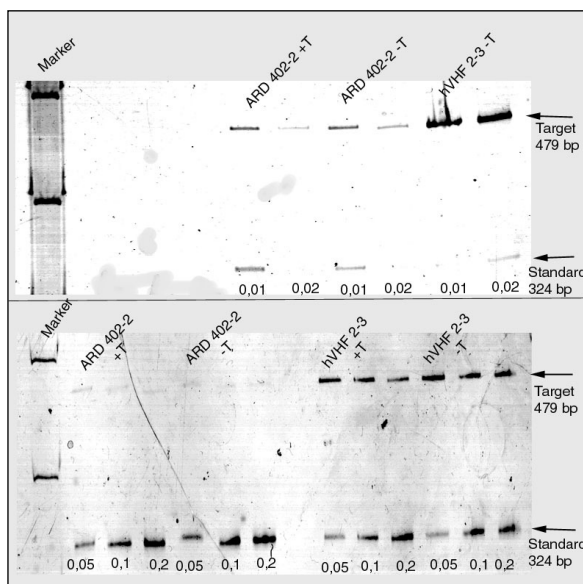


Abbildung 12: PAA-Gele der zusätzlichen RT-PCRs des AR mit geringeren Kompetitorkonzentrationen bei Patientin ARD 402-2. Unterhalb der Kompetitor-Banden ist die Kompetitorkonzentration in aMol/ μ g RNA angegeben. Deutlich ist die herabgesetzte Transkription im Vergleich zur Normalkontrolle hVHF 2-3 zu erkennen.

Um zu überprüfen, ob die gesamte Androgenrezeptor-RNA eine korrekte Länge hatte und Fehler im Spleißvorgang ausgeschlossen werden konnten, wurde zusätzlich eine RT-PCR von Exon 1 bis Exon 8 durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein Androgenrezeptor-Amplifikat normaler Länge, das bei 1268 bp auf dem Gel zu sehen war, aber ein deutlich schwächeres Signal hervorrief als die Normalkontrolle (s. Abb. 13). Dies weist auf korrektes Splicing des Transkripts hin (Hellwinkel et al., 2001).

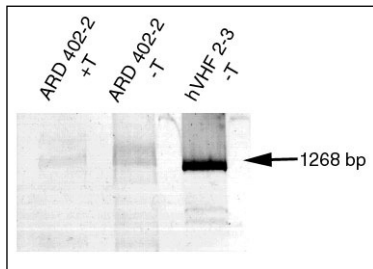


Abbildung 13: PAA-Gel der Transkription des Androgenrezeptors, Exon 1 bis 8.

Der Einfluß von Testosteron auf die Transkription

Des weiteren wurde der Einfluß von Testosteron auf die Transkription von AR-mRNA in genitalen Fibroblasten untersucht. Es wurden keine einheitlichen Ergebnisse gefunden, im Wilcoxon-Test zeigte sich für Patienten und Normalkontrollen kein testosteronabhängig signifikanter Unterschied des AR-Transkriptionsverhaltens. Sowohl bei ARD-Zellen als auch bei hVHF-Zellen war die Transkription mit Testosteron in einigen Fällen erhöht, in anderen Fällen erniedrigt. Die Mediane betragen 107 % bei Patientenzellen und 96 % bei Normalkontrollen, wobei die Transkription ohne Testosteroninkubation als 100 % festgelegt wurde. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

	Einfluß von Testosteron			
	ARD-Zellen		hVHF-Zellen	
	Median	Ergebnisintervall	Median	Ergebnisintervall
ARD 37-2	144,7%	81,6% - 161,1%	67,3%	48,8% - 89,8%
ARD 320-2	195,2%	115,4% - 216,8%	138,5%	70,3% - 155,7%
ARD 345-2	96,4%	88,3% - 129,8%	88,8%	83,3% - 141,8%
ARD 350-3	158,1%	95,8% - 161,4%	76,5%	75,9% - 103,7%
ARD 389-2	106,8%	62,5% - 119,0%	93,1%	79,2% - 120,5%
ARD 402-2			138,5%	70,3% - 155,7%
ARD 444-2	121,2%	93,6% - 155,5%	88,8%	83,3% - 141,8%
ARD 529-2	83,7%	79,6% - 111,6%	91,0%	78,1% - 142,9%
ARD 674-5	88,3%	60,2% - 119,9%	112,3%	79,5% - 148,0%
ARD 714-4	98,4%	92,6% - 106,5%	98,6%	66,5% - 100,6%
ARD 832-2	121,6%	82,7% - 133,8%	110,8%	101,4% - 126,2%
ARD 150-2	48,7%	37,5% - 69,7%	121,6%	101,1% - 234,0%
Durchschnitt	114,8%		102,1%	
SD	38,2%		21,7%	
Median	106,8%		95,9%	

Tabelle 6: Einfluß von Testosteron auf die Transkription des Androgenrezeptors. Der Wert gibt die Veränderung der Transkription, von 100 % Transkription ohne Testosteroninkubation ausgehend, an. ARD 402-2 wurde in den Berechnungen nicht berücksichtigt, da hier ohne Testosteron keine Transkription gemessen werden konnte. Das Ergebnisintervall bezeichnet die Spannbreite der gemessenen Einzelwerte. SD: Standardabweichung

3.1.2 Transkription der 5 α -Reduktase II

In den Untersuchungen zur Transkription der 5 α -Reduktase II waren unterschiedliche Konkretorkonzentrationen in den drei verschiedenen RT-PCR-Ansätzen gewählt worden. Die Ergebnisse konnten dadurch nicht direkt gemittelt werden. Daher wurden zuerst die einzelnen A(T/S)-Werte bei identischen Konkretorkonzentrationen miteinander verglichen. Für den Vergleich mit Normalkontrollen wurde also zunächst $A(T/S)_{\text{Patient}} / A(T/S)_{\text{NC}}$ für drei verschiedene Konkretorkonzentrationen getrennt berechnet. Da das Verhältnis der A(T/S)-Werte zueinander bei unterschiedlichen Konkretorkonzentrationen theoretisch unverändert bleibt, erhält man drei miteinander vergleichbare Werte, deren Mittelwert berechnet werden kann. Für die Untersuchungen zum Einfluß von Testosteron wurde entsprechend $A(T/S)_{\text{Proband +T}} / A(T/S)_{\text{Proband -T}}$ dreimal getrennt berechnet und anschließend gemittelt.

Bei ARD 402-2 und bei ARD 714-4 waren Vergleiche teilweise nicht möglich, da einige Target-Banden unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Die gonadalen Fibroblasten von Patient ARD 150-2 wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt, da gonadale Fibroblasten keine 5 α -Reduktase II exprimieren (Russell et al., 1994; Levine et al., 1996), wie anhand der hier gewonnenen Befunde bestätigt wurde. Bei allen anderen Patienten zeigten die Target-Banden eine korrekte Länge.

Vergleich der Transkription der ARD- mit hVHF-Zellen

Beim Vergleich der Transkriptionsraten war die Transkription der 5 α -Reduktase II mit wenigen Ausnahmen in Patientenzellen geringer als in Normalkontrollen. Die Transkription in Normalkontrollen wurde wieder als 100 % festgelegt. Es fanden sich bis auf 4 % (nach Testosteroninkubation) bzw. 5,7 % (ohne Testosteroninkubation) herabgesetzte Werte in den Zellen von ARD 714-4 und nicht mehr meßbare Werte bei ARD 402-2. Nur in den Fibroblasten von ARD 389-2 fand sich eine deutliche Erhöhung auf 273 % bzw. 222 %. Im Durchschnitt betrug die Transkription der 5RII der ARD-Zellen nur 59-65 % von der der hVHF-Zellen, der

Median lag bei 43 % bzw. 36 %. Aufgrund hoher Standardabweichungen kann jedoch nicht von einer signifikanten Erniedrigung ausgegangen werden.

Tabellarisch und graphisch sind die Ergebnisse in Tabelle 7 und Abbildung 14 dargestellt. Im Anhang sind in Tab. 13 die Rohdaten und in Abb. 35 bis 38 beispielhaft für die Ergebnisse zwei PAA-Gele mit densitometrischen Ergebnissen aufgeführt.

	Vergleich mit hVHF			
	mit T		ohne T	
	Median	Ergebnisintervall	Median	Ergebnisintervall
ARD 37-2	26,6%	24,0% - 30,6%	4,7%	
ARD 320-2	43,2%	35,2% - 63,8%	44,1%	42,0% - 46,3%
ARD 345-2	26,3%	21,7% - 31,0%	35,3%	26,8% - 43,7%
ARD 350-3	63,4%	57,1% - 131,3%	35,9%	32,3% - 46,5%
ARD 389-2	273,3%	149,5% - 345,9%	222,3%	178,8% - 447,9%
ARD 402-2	0,0%		0,0%	
ARD 444-2	51,9%	47,2% - 56,6%	67,8%	54,1% - 81,6%
ARD 529-2	27,7%	14,3% - 35,7%	21,2%	20,3% - 39,9%
ARD 674-5	82,5%	56,8% - 239,9%	103,7%	62,9% - 130,1%
ARD 714-4	4,1%		5,7%	
ARD 832-2	119,3%	73,5% - 130,1%	113,2%	74,3% - 133,6%
ARD 150-2				
Durchschnitt	65,3%		59,4%	
SD	73,6%		63,0%	
Median	43,2%		35,9%	

Tabelle 7: Transkription der 5RII in ARD- und hVHF-Zellen. Der Wert gibt die Transkriptionsrate von ARD-Zellen im Verhältnis zu 100 % Transkription in hVHF-Zellen an. Das Ergebnisintervall bezeichnet die Spannweite der gemessenen Einzelwerte. mit T bzw. ohne T: mit bzw. ohne Testosteroninkubation, SD: Standardabweichung

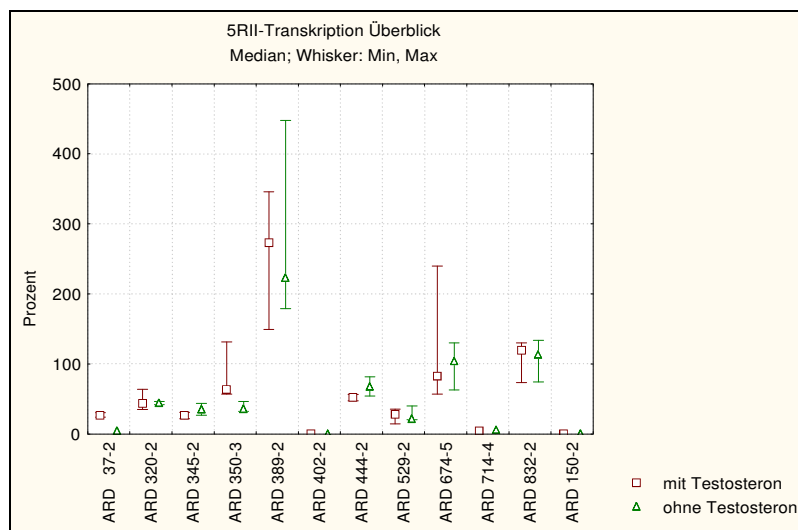


Abbildung 14: Ergebnisse der Transkriptionsuntersuchungen zur 5 α -Reduktase II, verglichen mit 100 % Transkription in Normalkontrollen. Durch die Symbole sind die Mediane gekennzeichnet, die Spannweite umfaßt das Minimum und Maximum.

Bei ARD 402-2 wurden aufgrund der auffällig niedrigen Transkription zusätzlich geringere Kompetitor-Konzentrationen von 0,002 bis 0,06 aMol/ μ g RNA gewählt. Optisch waren bei allen Konzentrationen sehr schwache Target-Banden zu erkennen, aber densitometrisch lagen die Banden unterhalb der Nachweisgrenze (s. Abb. 15).

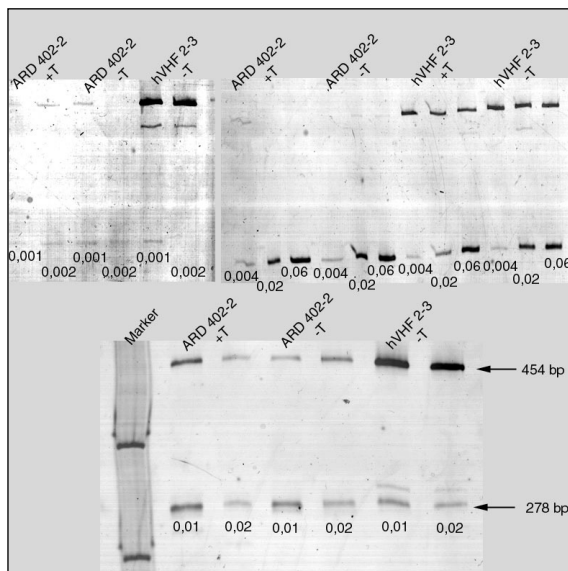


Abbildung 15:

PAA-Gele der zusätzlichen RT-PCRs der 5RII mit geringeren Kompetitor-konzentrationen bei Patientin ARD 402-2. Unterhalb der Kompetitor-Banden ist die Kompetitor-Konzentration in aMol/ μ g RNA angegeben. Deutlich ist die herabgesetzte Transkription im Vergleich zur Normalkontrolle hVHF 2-3 zu erkennen.

Der Einfluß von Testosteron

Bei 6 von 9 auswertbaren PCRs war die Transkription der 5 α -Reduktase II bei Patientenzellen unter Testosteron-Inkubation leicht oder deutlich höher als bei Patientenzellen, die ohne Testosteron inkubiert wurden. Bei hVHF-Zellen, bei denen alle 12 Proben auswertbar waren, war die Verteilung ausgewogen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen kann jedoch nicht von einem signifikanten Einfluß von Testosteron auf die 5RII-Transkription in Patientenzellen ausgegangen werden. Der Median lag nach Testosteroninkubation bei ARD-Zellen bei 107 %, bei hVHF-Zellen bei 102 %, wobei die Transkription ohne Testosteroninkubation als 100 % festgelegt wurde. Das deutet bei Patientenzellen auf einen fehlenden Einfluß von Testosteron auf die Transkription, mit dem Befund bei gesunden Individuen vergleichbar.

	Einfluß von Testosteron			
	ARD-Zellen		hVHF-Zellen	
	Median	Ergebnisintervall	Median	Ergebnisintervall
ARD 37-2	314,5%		62,4%	61,0% - 71,2%
ARD 320-2	155,7%	76,5% - 170,5%	93,6%	74,4% - 112,9%
ARD 345-2	94,0%	74,6% - 113,3%	146,4%	64,5% - 228,2%
ARD 350-3	127,3%	95,5% - 189,4%	72,1%	46,6% - 77,7%
ARD 389-2	187,5%	144,6% - 187,5%	173,0%	152,5% - 284,6%
ARD 402-2			93,6%	74,4% - 112,9%
ARD 444-2	107,3%	56,3% - 158,3%	146,4%	64,5% - 228,2%
ARD 529-2	81,9%	60,9% - 160,3%	95,1%	87,7% - 116,2%
ARD 674-5	56,3%	55,8% - 159,1%	86,2%	42,9% - 101,9%
ARD 714-4			109,4%	49,7% - 170,1%
ARD 832-2	106,5%	101,1% - 117,6%	109,4%	102,3% - 111,6%
ARD 150-2			109,5%	84,5% - 134,8%
Durchschnitt	136,8%		108,1%	
SD	72,8%		31,1%	
Median	107,3%		102,2%	

Tabelle 8: Der Einfluß von Testosteron auf die Transkription der 5 α -Reduktase II. Der Wert gibt die die Veränderung der Transkription, von 100 % Transkription ohne Testosteroninkubation ausgehend, an. ARD 402-2 und ARD 714-4 wurden in den Berechnungen nicht berücksichtigt, da hier keine ausreichende Transkription gemessen werden konnte. Das Ergebnisintervall bezeichnet die Spannbreite der gemessenen Einzelwerte. SD: Standardabweichung

3.1.3 Weiterführende Untersuchungen an GHF des Patienten ARD 402-2

3.1.3.1 Northern Blot

Ein Northern Blot wurde durchgeführt, um die Länge der gesamten RNA zu überprüfen. Im Northern Blot war bei der Normalkontrolle hVHF 2-3 eine deutliche Bande bei 10,5 kb zu sehen, die der Androgenrezeptor-RNA entspricht. Bei der RNA der Patientin ARD 402-2 fand sich hingegen auf dieser Höhe nur ein sehr schwaches Signal. Dieses ist möglicherweise auf ein aus Unregelmäßigkeiten in der Gelstruktur der Taschenstege resultierendes Artefakt zurückzuführen. Weitere Signale, die auf eine veränderte RNA-Struktur hindeuten, fanden sich nicht auf dieser Bahn. Die Kontrolle des Northern Blots mit β -Aktin-RNA ergab bei beiden Proben deutlich sichtbare Banden bei 2,2 kb.

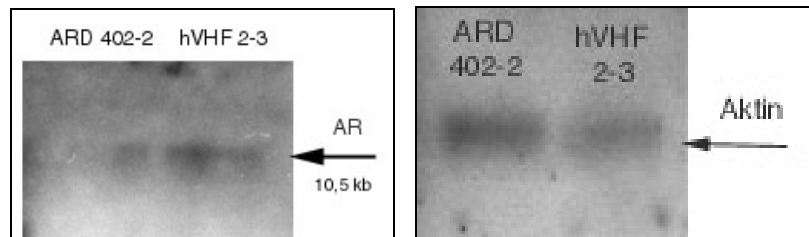


Abbildung 16 und 17: Northern Blot der Androgenrezeptor-RNA und der Aktin-RNA zur Kontrolle des AR-Northern Blots von Patientin ARD 402-2

3.1.3.2 Promotorregion des AR-Gens

Die Promotorregion des AR-Gens wurde auf Mutationen untersucht, um darzustellen, ob die verringerte Transkription mit Veränderungen in der Basensequenz des Promotors einhergeht. Es wurde ein Mutationsscreening mittels SSCP-Analyse über zwei einzelne Abschnitte der Promotorregion durchgeführt, wie von Ghadessy beschrieben (Ghadessy et al., 1999). Diese Abschnitte enthalten mehrere für die Regulation der Transkription wichtige Bereiche.

Im Versuch wurden fünf verschiedene Normalkontrollen mit der Patienten-DNA verglichen. Wie auf den SSCP-Gelen zu sehen ist, fanden sich bei allen Proben, inklusive der des Patienten, identische Einzelstrang-Banden (s. Abb. 18 und 19).

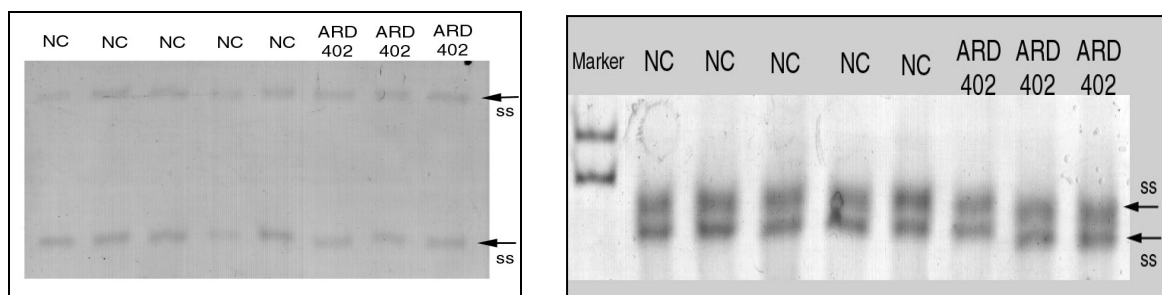


Abbildung 18 und 19: PAA-Gele zur SSCP-Analyse des ersten und zweiten Abschnitts der Promotorregion. NC: Normalkontrolle, ss: single strand

3.1.3.3 Western Blot

Weiterhin wurde ein Western Blot durchgeführt, um einen Eindruck vom Androgenrezeptor-Protein zu erhalten. Hierbei fand sich bei der Patientin keine Translation des Rezeptors. Die Aktin-Translation als Kontrolle war in Patient und Normalkontrolle unauffällig.

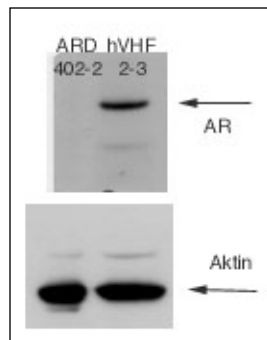


Abbildung 20: Western Blot des Androgenrezeptors bei ARD 402-2 und Normalkontrolle mit Western Blot von Aktin zur Kontrolle. Bei der Patientin ist keine AR-Protein-Bande zu sehen.

3.1.4 Korrelationen zwischen klinischen und experimentellen Funden

Die Ergebnisse aus den Transkriptionsuntersuchungen wurden mit dem Schweregrad der Erkrankung und dem Alter der Patienten in Relation gesetzt. Schlüsselte man die Ergebnisse nach dem Schweregrad des AIS auf, so fand sich mit steigender Virilisierungsstörung eine abfallende AR-Transkription. Bei Patienten mit AIS Grad II waren die Werte am höchsten, streuten allerdings auch bis in niedrigere Werte hinein. Die Maximalwerte fielen kontinuierlich mit steigendem AIS-Grad ab (s. Abb. 21 und 22). Die Unterschiede zwischen den Patientengruppen unterschiedlicher Virilisierungsgrade waren signifikant ($p = 0,02$ im Kruskal-Wallis-Test). Durch die geringe Anzahl der Proben in Grad IV und V ist die Aussagekraft in diesem Bereich beeinträchtigt, doch auch zwischen den Ergebnissen der Grade II und III bestand ein signifikanter Unterschied ($p = 0,037$ im Mann-Whitney-U-Test).

Die Ergebnisse der 5RII-Transkription in Bezug zum Erkrankungsgrad waren ebenfalls signifikant unterschiedlich, allerdings konnte keine Tendenz in eine Richtung ermittelt werden (s. Abb. 23 und 24, Kruskal-Wallis-Test zwischen allen Erkrankungsgraden: $p = 0,008$, Mann-Whitney-U-Test zwischen Grad II und III: $p = 0,02$).

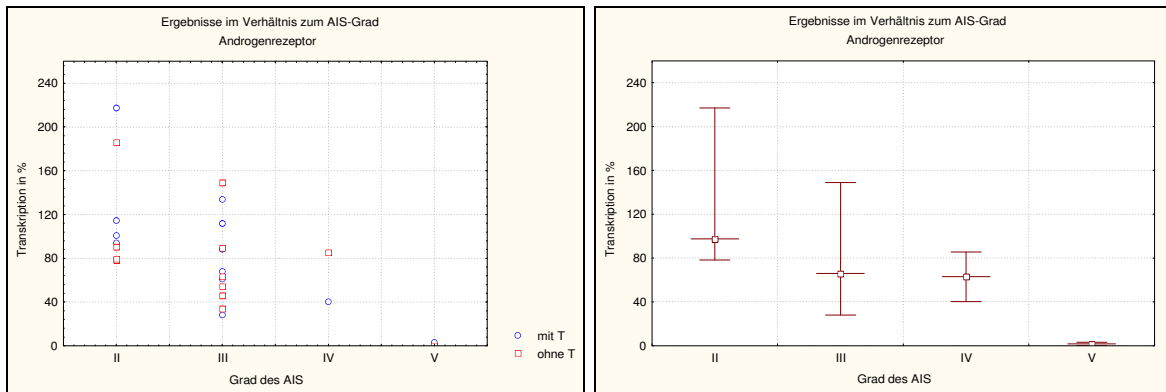


Abbildung 21 und 22: Korrelation zwischen Transkriptionsrate des Androgenrezeptor-Gens und phänotypischem Grad des AIS.

Abb. 21: alle Mediane der Ergebnisse der einzelnen Patienten (s. Kap. 3.1.1, Tab. 5) als Funktion des AIS-Grades

Abb. 22: Darstellung der Werte aus Abb. 21 mit Median als Linie, Minimum und Maximum

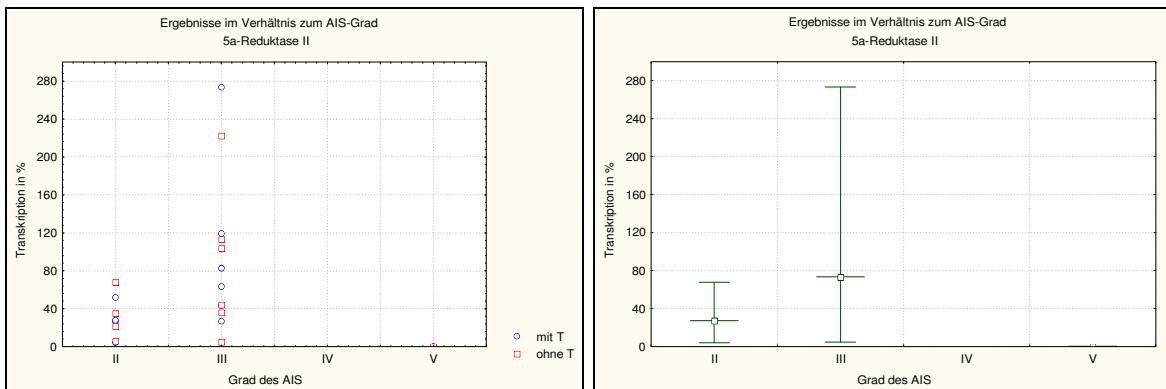


Abbildung 23 und 24: Korrelation zwischen Transkriptionsrate des 5 α -Reduktase II-Gens und phänotypischem Grad des AIS. Da vom einzigen Patienten mit AIS Grad IV gonadale Fibroblasten untersucht worden waren, sind dort für die 5RII-Transkription keine Werte darstellbar.

Abb. 23: alle Mediane der Ergebnisse der einzelnen Patienten (s. Kap. 3.1.2, Tab. 7) als Funktion des AIS-Grades

Abb. 24: Darstellung der Werte aus Abb. 23 mit Median als Linie, Minimum und Maximum

Die Auftrennung nach Alter der Patienten zeigte keine Korrelation. Die Werte waren unabhängig vom Alter bei den AR- und bei den 5RII-Untersuchungen sehr variabel.

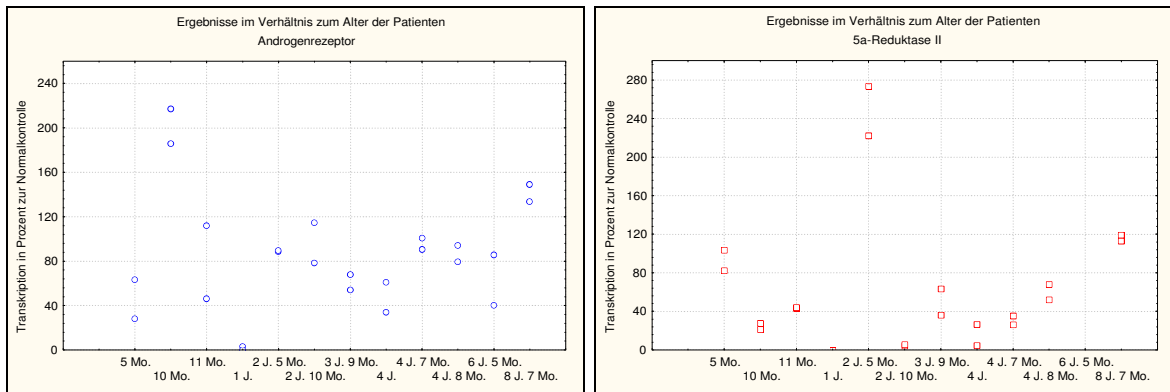


Abbildung 25 und 26: AR- (Abb. 25) und 5RII- (Abb. 26) Transkription als Funktion des Patientenalters

3.2 AR- und 5RII-Transkription in GF von Patienten mit 17β-HSD III-Mutation

3.2.1 Transkription des Androgenrezeptors

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte wie in Kap. 3.1.1 an AIS-Patienten dargestellt. Die Transkription in Normalkontrollen bzw. die Transkription ohne Testosteroneinfluss wurde wieder als 100 % festgelegt. Bei den Patienten mit Mutation im 17β-HSD III-Gen war die Transkription des AR nach kompetitiver RT-PCR überwiegend geringer als in Zellen von Normalkontrollen. In allen Fällen mit Ausnahme von ARD 111-2 +T war der Median der drei RT-PCR-Durchgänge herabgesetzt. Die Patientenzahl war jedoch zu gering und die Streuung zu groß, um Aussagen hinsichtlich einer Tendenz zu machen.

Nach Inkubation mit Testosteron war die Transkription bei drei der Patienten geringfügig erhöht, allerdings konnten ebenfalls keine aussagekräftigen Unterschiede beobachtet werden. Tabellarisch und graphisch sind die Ergebnisse in Tabelle 9 und Abbildung 27 und 28 dargestellt.

	Vergleich mit hVHF			
	mit Testosteron		ohne Testosteron	
	Median	Ergebnisintervall	Median	Ergebnisintervall
ARD 111-2	108,1%	90,8% - 335,7%	84,3%	70,9% - 101,7%
ARD 623-2	93,1%	62,1% - 121,0%	68,5%	62,8% - 139,4%
ARD 57-4	59,6%	29,6% - 91,0%	35,0%	34,5% - 68,7%
ARD 876-2	64,4%	54,9% - 136,4%	47,6%	40,4% - 77,5%
	Einfluß von Testosteron			
	ARD-Zellen		hVHF-Zellen	
	Median	Ergebnisintervall	Median	Ergebnisintervall
ARD 111-2	88,9%	59,2% - 305,8%	64,6%	55,7% - 82,5%
ARD 623-2	116,2%	109,9% - 217,3%	121,2%	112,8% - 173,9%
ARD 57-4	107,2%	84,9% - 192,0%	98,9%	73,9% - 123,6%
ARD 876-2	113,0%	63,9% - 175,5%	70,8%	61,3% - 90,3%

Tabelle 9: Transkription des AR in ARD- und hVHF-Zellen und der Einfluß von Testosteron auf die Transkription des Androgenrezeptors. Der Wert gibt in der oberen Tabelle die Transkriptionsrate von ARD-Zellen im Verhältnis zu 100 % Transkription in hVHF-Zellen an, in der unteren Tabelle die Veränderung der Transkription, von 100 % Transkription ohne Testosteroninkubation ausgehend. Das Ergebnisintervall bezeichnet die Spannweite der gemessenen Einzelwerte.

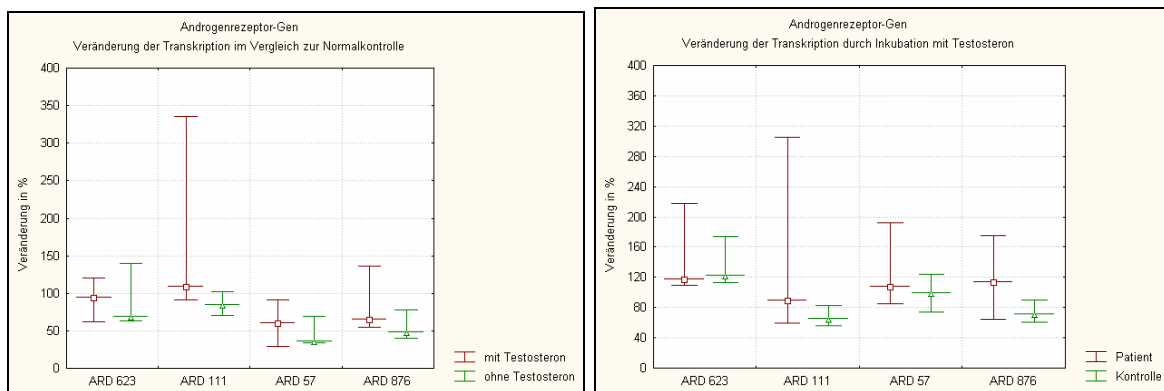


Abbildung 27 und 28: Ergebnisse der einzelnen Patienten mit 17 β -HSD III-Mutation bei der Untersuchung des Androgenrezeptors. Gezeigt ist die Veränderung der Transkription in Prozent. Die Mediane sind als Linien, die Ergebnisintervalle als Balken dargestellt.

Abb. 27: Vergleich mit der Transkription in Normalkontrollen

Abb. 28: Einfluß der Inkubation mit T auf die Transkription des AR-Gens

3.2.2 Transkription der 5 α -Reduktase II

Die Auswertung der 5RII-RT-PCR-Produkte der Patienten und Normalkontrollen erfolgte, da auch hier unterschiedliche Kompetitorkonzentrationen gewählt worden waren, wie bei den 5RII-Untersuchungen der Zellen von AIS-Patienten (s. 3.1.2).

Dabei wurde die Transkription in Normalkontrollen bzw. die Transkription ohne Testosteroneinfluß wieder als 100 % festgelegt. In den gonadalen Fibroblasten der Patienten ARD 57-4 und ARD 876-2 konnte keine Transkription nachgewiesen werden.

Die Transkription der 5 α -Reduktase II war bei Patienten mit 17 β -HSD III-Mutation in drei von vier auswertbaren Untersuchungen (ARD 111-2 und ARD 623-2 je einmal mit und ohne Testosteroninkubation) erniedrigt. Sie betrug nur 21 % bis 50 % im Vergleich zur Normalkontrolle. Einzig bei testosteroninkubierten Zellen von ARD 623-2 war die Transkriptmenge höher als die der zugehörigen Normalkontrolle.

Verglichen mit testosteronfreien Wachstumsbedingungen, die 100 % Transkription entsprachen, war die 5RII-Expression nach Testosteron-Inkubation bei beiden Patienten deutlich auf 300 % bzw. 460 % im Median erhöht. Bei den Normalkontrollen fand sich kein Unterschied zwischen Inkubation mit und ohne Testosteron. Tabellarisch und graphisch sind die Ergebnisse in Tabelle 10 und Abbildung 29 und 30 dargestellt.

	Vergleich mit hVHF			
	mit Testosteron		ohne Testosteron	
	Median	Ergebnisintervall	Median	Ergebnisintervall
ARD 111-2	50,4%	46,1% - 68,0%	21,7%	6,8% - 36,7%
ARD 623-2	163,8%	55,3% - 279,9%	46,8%	20,0% - 120,2%
ARD 57-4				
ARD 876-2				
	Einfluß von Testosteron			
	ARD-Zellen		hVHF-Zellen	
	Median	Ergebnisintervall	Median	Ergebnisintervall
ARD 111-2	460,6%	182,3% - 738,8%	98,2%	86,5% - 118,1%
ARD 623-2	301,1%	260,6% - 303,5%	108,9%	74,4% - 130,3%
ARD 57-4			75,2%	74,6% - 113,9%
ARD 876-2			119,1%	78,3% - 129,6%

Tabelle 10: Transkription des AR in ARD- und hVHF-Zellen und der Einfluß von Testosteron auf die Transkription der 5 α -Reduktase II. Der Wert gibt in der oberen Tabelle die Transkriptionsrate von ARD-Zellen im Verhältnis zu 100 % Transkription in hVHF-Zellen an, in der unteren Tabelle die Veränderung der Transkription, von 100 % Transkription ohne Testosteroninkubation ausgehend. Das Ergebnisintervall bezeichnet die Spannbreite der gemessenen Einzelwerte.

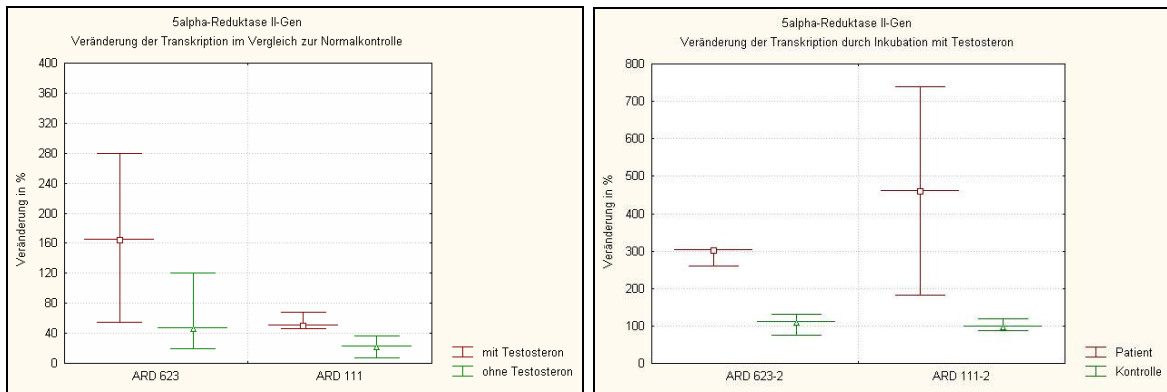


Abbildung 29 und 30: Ergebnisse der einzelnen Patienten mit 17 β -HSD III-Mutation bei der Untersuchung der 5 α -Reduktase II. Gezeigt ist die Veränderung der Transkription in Prozent. Die Mediane sind als Linien, die Ergebnisintervalle als Balken dargestellt.

Abb. 29: Vergleich mit der Transkription in Normalkontrollen

Abb. 30: Einfluß der Inkubation mit T auf die Transkription des 5RII-Gens

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkription des Androgenrezeptor-Gens und des 5α -Reduktase II-Gens bei Patienten untersucht, die unter dem Androgenresistenzsyndrom (AIS) leiden, ohne daß eine Mutation im AR- oder 5RII-Gen zugrunde liegt. Zwei unterschiedliche Fragestellungen wurden bearbeitet. Zum einen wurde nach Ursachen gesucht, die das Androgenresistenzsyndrom bei solchen Patienten erklären können. Hierzu wurde die Expression der genannten Gene mit der von gesunden Individuen verglichen. Zum anderen wurde versucht, Erklärungen für die phänotypische Variabilität des Androgenresistenzsyndroms zu finden. Dazu wurde der Einfluß von Testosteron auf die Transkriptionsrate des AR und der 5RII bei AIS-Patientenzellen und bei Zellen von Patienten mit Mutation im 17β -HSD III-Gen untersucht.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR gewonnen. Bei dieser Methode werden die Mengen der mRNA-Transkripte semiquantitativ mit einem exogenen RNA-Kompetitor verglichen. Die Methode wurde für das AR- und 5RII-Gen in unserem Labor etabliert (Hellwinkel et al., 2000b). Sie ist eine sensitive Technik zur Darstellung und Semiquantifizierung von Transkripten (Price et al., 1992; Siebert, 1993a, b). Im Vergleich zum Northern Blot hat die kompetitive RT-PCR den Vorteil, daß sie eine geringere Menge RNA als Ausgangsmaterial benötigt und weniger zeit- und arbeitsaufwendig ist. Sie enthält weniger Schritte und ist dadurch in geringerem Maße fehleranfällig. Der Kompetitor wird nicht durch individuelle, z. B. hormonelle, Einflüsse verändert, wie es bei internen Kontrollgenen wie β -Aktin oder GAPDH der Fall sein kann. Ein weiterer Vorteil der Methode ist, daß der Kompetitor vor dem fehleranfälligsten Schritt, der cDNA-Synthese, hinzugegeben wird und so eine weitgehende Normalisierung ermöglicht (Henvel et al., 1993). Zusätzlich wurde zur Verifizierung gleichmäßiger Patienten-RNA-Mengen im cDNA-Synthese-Ansatz die L7 als interner Standard im selben Ansatz revers transkribiert und amplifiziert.

Von Hellwinkel wurden ausgedehnte Untersuchungen zur Aussagekraft der Versuche durchgeführt. Die methodisch bedingten Standardabweichungen betragen in seinen Versuchen für das AR-Transkript für die RNA-Isolation +/-

9,5 %, für die cDNA-Synthese +/- 10,2 % und für die PCR +/- 5 %. Beim 5RII-Transkript betrug die Standardabweichung +/- 14,8 % für die RNA-Isolation, +/- 14 % für die cDNA-Synthese und +/- 11 % für die PCR. Die Ergebnisse bestätigten die Verwendbarkeit der Methode (Hellwinkel, 1999).

Erfahrungsgemäß ist die Effektivität von RT-PCRs an 5RII-Transkripten variabel. Dies wird u. a. an einer größeren Standardabweichung deutlich. Die Fehlerquoten zur 5 α -Reduktase II der in dieser Arbeit untersuchten Patientenproben ähneln denen, die Hellwinkel erreichte (Hellwinkel et al., 2000a). Diese Variabilität der Methode bedingt somit eine eingeschränkte Aussagemöglichkeit. Sie kann einerseits durch die Labilität der 5RII-PCR bedingt sein, aber auch auf den interindividuellen und altersabhängigen Mengenunterschieden der 5RII-mRNA, die auch bei gesunden Individuen sehr groß sind, beruhen. Durch ein möglichst ähnliches Alter der Patienten- und zugeordneten Normalkontrollen-Proben wurde versucht, diesen Fehler zu minimieren.

Die verwendeten GoF zeigten keine Unterschiede zu den GHF im AR-Transkriptionsverhalten. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurde in gonadalen Fibroblasten grundsätzlich keine 5RII-Transkription nachgewiesen. Diese Beobachtung stimmt mit bisherigen Kenntnissen überein (Russell et al., 1994; Levine et al., 1996; Hellwinkel et al., 2000a). Von gesunden Individuen liegen keine Erkenntnisse über die Transkription in GoF vor, da deren Gewinnung aus Gonaden ethisch problematisch ist.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Transkription des Androgenrezeptor-Gens und des 5 α -Reduktase II-Gens in Genitalhautfibroblasten von Patienten mit Androgenresistenzsyndrom untersucht. Die hier untersuchten Patienten weisen die klinischen Merkmale des AIS auf, ohne daß eine Mutation in einem der Gene nachzuweisen war. Die Ursache für ihre Störung ist somit ungeklärt. Es sollte untersucht werden, ob eine verringerte Transkription des AR oder der 5RII der Erkrankung zugrunde liegen könnte.

Studien über Patienten mit AIS, bei denen die Transkription des AR-Gens verringert ist, ohne daß eine Mutation die Ursache darstellt, existieren bisher nur in Einzelfällen (Lee et al., 1996; Choong et al., 1997). Umgekehrt wurde bei

Patienten mit nachgewiesenen Mutationen in einigen Fällen über verringerte AR-Expression berichtet (Marcelli et al., 1991). Bei Untersuchungen an Hypospadien-Patienten berichtet Edelstein über eine reduzierte AR-mRNA-Konzentration (Edelstein et al., 1994). Allera beobachtete eine erniedrigte Androgenbindungskapazität oder 5RII-Aktivität bei jeweils zwei Patienten mit normaler AR-Sequenz (Allera et al., 1995). Batch fand nur bei der Hälfte ihrer AIS-Patienten Mutationen und teilweise eine verringerte Androgenbindung (Batch et al., 1992). Die 5RII-Expression wurde in diesem Zusammenhang häufig nicht untersucht. Nur in Einzelfällen wird über eine verringerte 5RII-Aktivität berichtet, unter anderem bei einigen Patienten mit AIS oder 5RII-Defekt. Hier lag, möglicherweise aufgrund des Alters der Studie, keine Mutationsanalyse vor (Pinsky et al., 1978).

Die Transkription des Androgenrezeptors und der 5 α -Reduktase II bei Patienten, bei denen bekannte Mutationen im AR- oder 5RII-Gen Ursache des AIS waren, wurde von Hellwinkel im Hinblick auf eine Klärung der schwachen Genotyp-Phänotyp-Korrelation genauer untersucht. Es fand sich kein einheitlicher Einfluß von Mutationssitus oder Art des Phänotyps auf die Transkription. Die Expression des AR und der 5RII bei PAIS-Patienten war teils normal, teils zweifach (AR) bis sechsfach (5RII) erhöht. In einem Fall war die 5RII-Expression moderat erniedrigt. Bei CAIS-Patienten hingegen war die Transkription beider Gene stärker erniedrigt, zum Teil vermutlich durch frühzeitige Degradation und verringerte Proteinstabilität der Transkripte. Bei Mutationen im 5RII-Gen ist die Transkription des AR nicht beeinflusst, die der 5RII stark erniedrigt bzw. nicht nachweisbar (Hellwinkel et al., 2000a). Ein Einfluß der Transkriptionsrate von AR und 5RII auf den Phänotyp der AIS-Patienten mit nachgewiesener Mutation konnte jedoch nicht sicher belegt werden.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten waren Kinder im Alter von 5 Monaten bis 8,5 Jahren zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme. Die Ausprägung des Androgenresistenzsyndroms reichte von einfacher Hypospadie (AIS Grad II nach Sinnecker et al., 1996) bis zum vollständig weiblichen Phänotyp ohne Virilisierungszeichen (AIS Grad V). Dementsprechend wurde einigen von ihnen ein männliches, einigen ein weibliches Geschlecht zugeordnet. In der vorangegangenen Diagnostik waren außer sonographischen Ausschlusses

Müllerscher Strukturen und Mutationsscreenings an AR und 5RII hCG-Stimulationstests und in einigen Fällen SHBG-Tests durchgeführt worden. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die relative Transkriptmenge von AR und 5RII in GF mit der in gesunden Normalkontrollen verglichen. Einen Gesamtüberblick mit Ergebnissen und Resultaten der Voruntersuchungen gibt Tabelle 14 im Anhang.

Die vorliegenden Untersuchungen (s. Tab. 5, S. 41) zeigen eine durchschnittlich leicht verringerte Transkription des Androgenrezeptors um 10-20 %, die jedoch nicht signifikant ist. Obwohl bei der Mehrheit der Patienten die Transkription erniedrigt ist, sieht man bei einem Drittel der Patienten nur eine leichte Reduktion, bei einem weiteren Drittel allerdings eine starke Erniedrigung auf Werte bis 0 %. Da die Einzelfälle stark variieren, müssen sie getrennt beurteilt werden.

Die Transkription der 5 α -Reduktase II von Patienten mit AIS ist nach den vorliegenden Ergebnissen herabgesetzt (s. Tab. 7, S. 45). Aufgrund der hohen Standardabweichung ist das Ergebnis allerdings nicht signifikant. Da auch hier die Ergebnisse bei den verschiedenen Patienten variabel sind, es wurden u. a. auch erhöhte Transkriptionsraten gemessen, müssen die Fälle ebenfalls einzeln betrachtet werden.

Eine altersabhängige oder testosteronabhängige Verteilung der AR-Transkription und der 5RII-Transkription war bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten nicht zu erkennen. Das deckt sich mit den Befunden an gesunden Individuen und AIS-Patienten mit Mutation (Hellwinkel et al., 2000a; Hellwinkel et al., 2000b; Holterhus et al., 2002).

Eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch die vier Patienten, die die Eingangskriterien nicht vollständig erfüllten (ARD 345-2, ARD 444-2, ARD 674-5 und ARD 714-4), zeigte sich nicht. Wurden sie aus der Auswertung ausgeschlossen, und nur die Patienten betrachtet, bei denen auch Hormonstimulationstests vorlagen, zeigten sich keine Unterschiede im Durchschnitt der Transkriptionsraten zu den Ergebnissen mit allen Patienten (Diagramme nicht dargestellt). Lediglich der Einfluß von Testosteron auf die Expression der 5 α -Reduktase II scheint deutlicher zu sein.

Alle Transkripte der Patienten wiesen korrekte Längen auf, sodaß versteckte Mutationen in den Introns, die den Spleißvorgang beeinträchtigen, im Bereich der untersuchten Exons nicht angenommen werden können.

In Abhängigkeit des Schweregrades des AIS findet sich ein deutlicher Bezug zur Transkriptionsrate des AR (s. Abb. 21 und 22). Mit zunehmender Virilisierungsstörung und steigendem AIS-Grad fällt die Expression des AR-Gens ab. Die Mediane der einzelnen Patientengruppen verlaufen fallend mit steigender Schwere der Erkrankung. Es existieren zwar nur leicht erniedrigte Expressionsraten bei Patienten mit AIS-Grad II, aber es finden sich keine Patienten mit höhergradiger Virilisierungsstörung, die annähernd normale Expressionsraten vorweisen. Die Unterschiede zwischen den Patientengruppen unterschiedlicher Virilisierungsgrade sind signifikant. Bei Patienten mit stärkerer Virilisierung (AIS Grad II/III) besteht zwar eine größere Variationsbreite der AR- und 5RII-Expression, aber bei stärker ausgeprägtem Syndrom, bei dem die Patienten (ARD 402-2 und ARD 350-3, s. auch Abb. 31, 32, 35 und 36 im Anhang) als weiblich eingestuft wurden (Grad IV/V), wurden beide Gene ausschließlich deutlich verringert exprimiert. Ähnliche Ergebnisse wurden jedoch auch bei stärker virilisierten Patienten gemessen, die als Jungen heranwuchsen. Und auch mit normalen oder erhöhten AR-Transkriptionsraten kann die Virilisierung geringer ausfallen als bei erniedrigten 5RII-Transkriptionsraten. Dies ist zum Beispiel bei ARD 832-2 der Fall, der unter PAIS Grad III leidet, im Gegensatz zu den Patienten ARD 714-4 (s. auch Abb. 37 und 38 im Anhang), ARD 529-2 und ARD 444-2, die bei teilweise stark verringerter 5RII-Transkriptionsrate lediglich an PAIS Grad II leiden.

Aufgrund der vielfältigen Ergebnisse lassen sich keine allgemeingültigen Rückschlüsse auf die Ausbildung des Phänotyps der Patienten durch die AR- und 5RII-Transkriptionsaktivität ziehen. Wegen geringer Fallzahlen ist es zudem schwer zu beurteilen, ob es sich um eine homogene oder heterogene Gruppe Patienten handelt. Dennoch läßt sich in einem gewissen Grad eine Aussage über das Transkriptionsverhalten des Androgenrezeptors und der 5 α -Reduktase II

machen. Da die Ergebnisse nicht einheitlich ausgefallen sind, kann zunächst ein einfacher Zusammenhang zwischen AR- bzw. 5RII-Transkription und AIS ausgeschlossen werden. Da bei allen Patienten die Genese ihrer Erkrankung unklar ist, könnten somit unterschiedliche Ursachen vorliegen. Die Sensitivität des Mutationsscreenings mittels SSCP-Analyse beträgt 95%. Damit ist es möglich, daß unter diesen Patienten Einzelne unerkannte Mutationen besitzen. Eine weitere Fehlermöglichkeit liegt darin, daß unterschiedliche Ärzte die Voruntersuchungen durchführten, was zu uneinheitlicher Bewertung in der Einteilung in AIS-Grade führen kann.

Die Beobachtung, daß die AR-Transkriptmenge mit steigender Virilisierungsstörung abfällt, ergänzt die bisherigen Befunde von Hellwinkel (Hellwinkel et al., 2000a). Hellwinkel fand eine herabgesetzte Expressionsrate bei Patienten mit bekannter AR-Mutation und CAIS. Bei Patienten mit AR-Mutation und PAIS war die Herabsetzung der AR-Transkription nicht eindeutig genug, um einen Einfluß auf den Phänotyp anzunehmen. Daraus wurde geschlossen, daß die bestehenden Unterschiede der Transkriptmengen keine bedeutende Rolle bei der Ausprägung des Phänotyps spielen dürften. Da in der vorliegenden Untersuchung trotz großer Variationsbreite der Ergebnisse der Patienten mit AIS Grad II und III der Abfall der Transkription signifikant ist, ist es wahrscheinlich, daß die Transkription des AR eine Rolle bei der Ausprägung des Phänotyps spielt, auch wenn dies nicht der einzige Einflußfaktor ist.

Eine andere Erklärung für dieses Phänomen wäre eine durch den Phänotyp nachfolgend veränderte Transkription, also eine aberrante Transkriptionsrate als Folge, nicht als Ursache des Phänotyps. Durch die Verweiblichung der Patienten könnten Regelmechanismen in Gang gesetzt werden, die sonst nur bei genetisch weiblichen Individuen ablaufen. So könnte dann unter anderem die AR-Transkriptmenge in AIS-Individuen der in GHF normaler weiblicher Individuen entsprechen. Im Genitaltrakt der weiblichen fetalen Maus ist die Verteilung der Androgenrezeptoren beispielsweise anders als in der männlichen Maus. Die AR-Expression beginnt bei beiden zur selben Zeit, weist jedoch unterschiedliche Verteilungsmuster im Gewebe auf (Crocoll et al., 1998). Je nach tatsächlicher Ursache der Virilisierungsstörung könnte solch ein Effekt der Rezeptor-

Umverteilung zusätzlich zum Phänotyp beitragen und somit auch die individuelle Variabilität des Phänotyps teilweise erklären. Dem widersprechen jedoch die Funde von Holterhus, der in labialen Fibroblasten von 46,XY-Frauen mit AR-Mosaiken Expressionsmuster maß, die denen normaler Männer entsprach (Holterhus et al., 2003a).

Um eine Abschätzung des Einflusses der Transkription des Androgenrezeptors auf den Phänotyp vornehmen zu können, läßt sich eventuell ein Vergleich mit anderen Genen heranziehen. Die Hämophilie A ist wie der Androgenrezeptor-Defekt eine Erkrankung, die X-chromosomal rezessiv vererbt wird. Bei der Hämophilie prägt sich die Höhe des Faktor VIII-Proteinmangels auf das phänotypische Krankheitsbild aus. Man spricht von einer Subhämophilie, wenn die Proteinaktivität im Serum 16-50 % des Normalwertes beträgt. Die Subhämophilie bleibt klinisch unauffällig. Bei 5-15 % liegt eine leichte Hämophilie vor, und unter 5 % spricht man von einer mittelschweren bis schweren Hämophilie (Herold, 2000). Diese Werte sind nicht direkt übertragbar, da die vorliegende Studie sich nicht mit Protein- sondern mit RNA-Mengen beschäftigt. RNA-Mengen lassen sich häufig nicht einfach in Proteinmengen umrechnen, da posttranskriptionale Mechanismen die mRNA-Konzentration verändern können. In humanen Prostatazellen jedoch läßt sich von der 5RII-mRNA-Transkription gut auf die 5RII-Enzymaktivität schließen (Soderstrom et al., 2001). Demnach kann die hier gemessene Transkriptionsrate zumindest als Anhaltspunkt dienen. Da keine Mutationen nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, daß die Transkripte selbst intakt sind und so in einem gewissen Grad auf Proteinaktivitäten übertragbar sind. Geht man davon aus, daß eine mRNA-Konzentration von 5 % oder weniger zu deutlichen klinischen Auswirkungen führt, läßt sich das Krankheitsbild der Patientin ARD 402-2, die komplett weiblich erscheint, hierdurch erklären. Transkriptionsraten unter 50 % könnten analog zu einer "Sub-Androgenresistenz" oder einem PAIS bei den Patienten ARD 37-2, ARD 674-5 und eventuell ARD 150-2 beitragen. Geht man bei der 5 α -Reduktase II von einer ähnlichen Wirkweise aus, werden zusätzlich die klinischen Ausprägungen von ARD 350-3, ARD 320-2, ARD 345-2, ARD 714-4 und ARD 529-2 erklärbar. Interessanterweise finden sich

hierbei auch Erklärungen für die Patienten ARD 714-4, ARD 345-2 und ARD 674-5, die nicht die Eingangskriterien erfüllten, da keine Stimulationstests vorlagen. Eine erniedrigte 5RII-Transkription kann sekundär durch einen AR-Defekt hervorgerufen werden. Wenn durch die Schädigung des Androgenrezeptors die Differenzierung 5RII-exprimierender Gewebe nicht ausreichend erfolgt, kann es so zu einem 5RII-Mangel kommen (Wilson et al., 1993).

Bevor allgemeingültige Hypothesen zur Entstehung des AIS diskutiert werden, sollten einige Patienten einzeln betrachtet werden. Aufgrund der Heterogenität der Gruppe finden sich bei Einigen weitere Ansatzpunkte, ihre Virilisierungsstörung zu erklären.

Ein Defekt des LH-Rezeptors (LHR) könnte eine mögliche Ursache bei einem Teil der Patienten darstellen. Bei einem LH-Rezeptor-Defekt finden sich normale oder erhöhte Werte für LH (wie bei ARD 37-2: nach Stimulation von $<0,5$ auf $8,6$ U/l erhöht), das Hormon kann jedoch seine Wirkung nicht entfalten, ähnlich der Pathogenese des AIS. Dies führt zu einer Leydigzellhypoplasie mit verminderter Testosteronproduktion. Phänotypisch finden sich bei einer Mutation im LH-Rezeptor Sexualdifferenzierungsstörungen wie beim AIS mit einer Variation von fast vollständiger Virilisierung bis zum weiblichen Phänotyp. Je nach Inaktivitätsgrad des Rezeptors fallen das Krankheitsbild und der Einfluß auf den Testosteronspiegel durch hCG bzw. LH aus. Mit zunehmender Inaktivität des LH-Rezeptors steigt das Virilisierungsdefizit und ein Testosteronanstieg erfolgt nur nach ACTH-Stimulation, aber nicht nach hCG-Stimulation. Fehlende Brustentwicklung in der Pubertät ist der deutlichste Unterschied zwischen AIS und einem LH-Rezeptordefekt (Themmen et al., 2000). Bisher wurden mehrere Mutationen im LH-Rezeptor gefunden. Auch bei den hier untersuchten Patienten ist es möglich, daß der Defekt nicht im AR, sondern im LHR liegt, insbesondere bei Patienten, deren hCG-Stimulationstest oder Basalwerte für Testosteron gering ausfallen. Das beträfe ARD 37-2, ARD 345-2, ARD 714-4, ARD 529-2 und ARD 150-2. Bei ARD 37-2 und ARD 150-2 sind die Stimulationswerte je nach Quelle als normal (Anstieg auf mehr als das doppelte des Ausgangswertes (Ahmed et al., 1999)) bzw. subnormal (Testosteron $<2,9$ ng/ml (Feyaerts et al., 2002)) zu

bewerten. Hier kann die Ursache der Differenzierungsstörung auch in einer Testosteronbildungsstörung liegen. Bei beiden Patienten wurden jedoch deutlich verringerte AR-mRNA-Mengen gemessen (s. S. 40), was unter Umständen für einen Defekt im AR spricht.

Bei ARD 832-2 wurde die AR-Protein-Menge in einem auswärtigen Labor als erniedrigt gemessen, die 5RII-Aktivität war dort normal. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stellte sich heraus, daß die Transkription des AR und der 5RII normal waren (s. S. 41 und 45). Das deutet darauf hin, daß bei diesem Patienten der Defekt im Androgenrezeptor-Protein selbst zu finden ist und sich auf einer posttranskriptionalen Ebene befindet (s. u.).

Da bei den vier Patienten ARD 345-2, ARD 444-2, ARD 674-2 und ARD 714-4 durch fehlende hCG-Stimulationstests Testosteronsynthesestörungen nicht ausgeschlossen werden konnten, wurde ein Screening nach Mutationen im 17 β -HSD III-Gen durchgeführt. Klinisch stellte sich bei Mutationen im 17 β -HSD III-Gen ein dem AIS ähnliches Krankheitsbild dar, das sich von der Androgenresistenz durch erhöhte Androstendion- und erniedrigte Testosteronspiegel und vermehrt weibliche Ausprägungen unter den Patienten unterscheidet (Twisten et al., 2000). Patient ARD 674-5 wies trotz hoher unstimulierter Testosteronspiegel eine Auffälligkeit im Exon 11 des 17 β -HSD III-Gens auf, die sich als heterozygote Mutation Gly289Ser herausstellte. Bisher wurde diese Mutation als silenter Polymorphismus ohne klinische oder enzymkinetische Auswirkungen beschrieben (Moghrabi et al., 1998; Boehmer et al., 1999). In diesem Fall könnte dieser Polymorphismus möglicherweise zur Virilisierungsstörung beitragen. Bei den anderen drei Patienten fanden sich keine Auffälligkeiten, sodaß eine Testosteronsynthesestörung unwahrscheinlich ist.

Hypospadien können vielfältige Gründe haben (Albers et al., 1997). Frühgeburtlichkeit und Syndrome mit multiplen Fehlbildungen sind mögliche Ursachen für Fehlbildungen wie Hypospadien (Angerpointner, 1984). Sie können durch exogene Einflüsse wie Medikamente in der Schwangerschaft oder

Sexualhormone hervorgerufen werden. Es wird vermutet, daß Hormonbelastungen in der Umwelt Sexualfehlbildungen bewirken können. Sogenannte hormonelle Störfaktoren, wie Antiandrogene oder Xenoöstrogene können die Virilisierung in utero beeinträchtigen (Toppari et al., 1998; Sultan et al., 2001a; Sultan et al., 2001b).

Die Patienten ARD 832-2 und ARD 389-2 sind Frühgeborene, die zusätzlich Fehlbildungen aufweisen. Für eine Assoziation des Turricephalus von ARD 832-2 oder des offenen Foramen ovale von ARD 389-2 mit einem Pseudohermaphroditismus findet sich in der Literatur bisher kein Anhaltspunkt. Trotzdem kann die Frühgeburtlichkeit eine mögliche Ursache darstellen. Auch die Hydronephrose bei Patientin ARD 402-2 und der proportionierte Kleinwuchs von ARD 714-4 sind bisher nicht in Kombination mit Intersexualität aufgetreten. Patient ARD 529-2 leidet zusätzlich an einer Gaumenspalte. Diese Fehlbildung tritt öfter bei Patienten mit Hypospadie auf, sodaß hier ein Zusammenhang gesehen werden kann (Wu et al., 2002).

Bei Patient ARD 345-2 liegt ein VACTERL-Syndrom (Vertebrale Anomalien, Analatresie, Kardiale Malformationen, Tracheoösophageale Fisteln, Renale Anomalien, Rumpfanomalien) vor. Es gibt Fallstudien, in denen das VACTERL-Syndrom mit Hypospadie und Kryptorchismus assoziiert ist (Iafolla et al., 1991). Gleichzeitig existieren Studien, in denen eine Sexualhormon-Exposition der Mutter mit dem VACTERL-Syndrom assoziiert ist (Lammer et al., 1986). Das ist natürlich auch in diesem Fall möglich.

GHF von Patientin ARD 402-2 wurde weiteren Untersuchungen unterzogen (s. Kap. 3.1.3), da die durchgehend auf fast nicht mehr meßbare Werte herabgesetzten Transkriptionen des AR und der 5RII auffällig waren. Erst bei bis zu 20-fach niedrigeren Kompetitormengen als bei den Normalkontrollen beim AR und 15-fach niedrigeren bei der 5RII waren Transkriptionsprodukte zu erkennen. Die Patientin war zur Zeit der Probeentnahme 1 Jahr alt. Sie ist ein phänotypisch völlig weibliches Individuum mit Karyotyp 46,XY, was AIS-Grad V entspricht. Stimulationstests mit hCG hatten eine adäquate Steigerung der T- und DHT-Spiegel gezeigt.

Im Rahmen der weiterführenden Untersuchungen zeigte die RT-PCR des AR über Exon 1 bis 8 eine in ihrer Länge intakte cDNA in verringerter Konzentration. Das entspricht den Ergebnissen, die für den AR von Exon 1 bis 4 gewonnen wurden. Im Northern Blot fanden sich keine zusätzlichen Banden, die auf eine veränderte mRNA-Länge des AR hinwiesen. Die im Vergleich zur Normalkontrolle stark abgeschwächte Bande bei 10,5 kb kann eine geringe Menge strukturell intakter RNA darstellen, ein Artefakt kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Im Western Blot fanden sich weder regelhafte noch pathologische Translationsprodukte. Der Androgenbindungsassay zeigte keine nachweisbare Androgenbindung. Die T/DHT-Ratio nach hCG-Stimulation beträgt 10. Dies spricht gegen eine Störung der 5RII, da erst Werte über 16 als auffällig zu beurteilen sind (Hiort, 1999b). Das Enzym selbst ist somit aller Wahrscheinlichkeit nach in seiner Funktion nicht beeinträchtigt.

Die Analyse der Promotorregion des AR-Gens zeigte mit den Normalkontrollen identische single-strand-Banden. Im untersuchten Bereich sind bei der Patientin daher offensichtlich keine Mutationen vorhanden, die eine verringerte Transkription zur Folge haben können und die Ursache für das Syndrom darstellen könnten.

Die Kombination der beiden Expressionsdefekte, wahrscheinlich auch nur der AR-Mangel allein, kann eine hinreichende Erklärung der vollständigen Feminisierung dieses genetisch männlichen Individuums sein. Allerdings konnte der Grund der erniedrigten AR- und 5RII-Transkriptionsraten im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Es ist wahrscheinlich, daß eine erniedrigte Transkription des AR- und 5RII-Gens eine Rolle bei der Ausbildung des Phänotyps auch anderer Patienten spielt, insbesondere der weiblich imponierenden Patientin ARD 350-3.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, bei den hier untersuchten Patienten sowohl eine verringerte als auch eine unauffällige AR-Transkription zu erklären. Bisher wurden bei AIS-Patienten ohne Mutationsnachweis im AR- und 5RII-Gen Ursachen auf der Ebene der Translation, der Cofaktoren, der Zielgene oder der zeitlichen Abfolge der Expression während der Entwicklung vermutet (Batch et al., 1992; Allera et al., 1995; Lee et al., 1996; Choong et al., 1997). Ist die Transkription des AR

ungestört, kann die Ursache einen Schritt weiter in der Translation liegen. Durch Western Blots ließe sich dies untersuchen. Ist hingegen die Transkription verringert, kann eine Störung innerhalb der Promotorregion vorliegen, sodaß eine Analyse dieses Abschnittes des AR-Gens weiterführt. Finden sich nun Anhaltspunkte für Störungen auf diesen Ebenen, ist wiederum die Frage, wodurch diese entstehen. Auf diese Punkte soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Eine Veränderung im Bereich der Promotorregion könnte eine verringerte Transkription des Gens zur Folge haben. Für diverse Erkrankungen, wie z. B. die β -Thalassämie, das Retinoblastom oder die Hämophilie B, wurden bereits Mutationen in der Promotorregion der beteiligten Gene als Ursache nachgewiesen (Cooper, 1992). Die Promotorregion des Androgenrezeptors (s. Abb. 4) besitzt keine typischen TATA- oder CAAT-Boxen. 1,1 kb vor dem Translations-Initiations-Codon ATG, direkt am Beginn des 5'UTRs, befinden sich zwei Transkriptions-Initiations-Bereiche (TIS). Diese werden als TIS-I und TIS-II bezeichnet und sind zusammen 13 bp groß (Tilley et al., 1989; Faber et al., 1991). TIS-II scheint zusammen mit einer Sp1-Bindungssequenz in einer GC-Box bei -59 bis -32 aufwärts des AR-Transkriptionsinitiationsbereichs zu arbeiten. Von TIS-I, die als Haupt-Transkriptionsstartsequenz postuliert wird, wird vermutet, daß sie mit einem Bereich im 5'UTR von -5 bis +57 und mit der homopurinreichen Sequenz bei -117 bis -60 interagiert (Faber et al., 1993; Mizokami et al., 1994b). Diese zusätzlichen Bereiche könnten genauso wie die zweite TIS der Regulation dienen. Wir untersuchten die Promotorregion des AR-Gens der Patientin ARD 402-2 im Bereich von -153 bis +237 auf Mutationen. Dieser Abschnitt umfaßte somit die Transkriptions-Initiations-Bereiche TIS I und TIS II des AR-Gens und reichte bis zu einer Stem-Loop-Struktur im 5'UTR. Im untersuchten Bereich wurden bei der Patientin ARD 402-2 keine Veränderungen gefunden.

Weiter 5'-aufwärts der TIS wurden mehrere Cis-agierende Elemente beschrieben, bei denen ein sowohl steigernder als auch hemmender Einfluß auf die Promotoraktivität vermutet wird. Unter anderem wurden mehrere cAMP-responsive Elemente entdeckt (Mizokami et al., 1994b). Von cAMP ist bekannt, daß es die Transkription induzieren kann. Bei Ratten wurde eine Steigerung der

AR-Expression in Sertolizellen durch cAMP festgestellt (Sanborn et al., 1991). Weiterhin wurden im 5'UTR ein kleiner Open Reading Frame unklarer Bedeutung gefunden (Tilley et al., 1990), sowie eine Stem-Loop-Struktur bei +21 bis +202 bp, bei der ein Zusammenhang zur Translationsinduktion vermutet wird (Mizokami et al., 1994a).

Diese Bereiche sind hier nicht untersucht worden, daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine Promotor-Veränderung an dieser Stelle vorliegt. Ein Transfektionsassay der Promotorregion, in welchem der Promotor vor ein Reporter-Gen transfiziert und die Aktivierung des Reporters gemessen wird, könnte hier Klärung bringen. Natürlich sind auch Veränderungen im Promotor der 5 α -Reduktase II möglich, die in einer herabgesetzten Transkription resultieren. Bisher wurde darüber in der Literatur noch nicht berichtet. Auch in dieser Richtung sind in Zukunft weitere Untersuchungen denkbar.

Bei einer Reihe Patienten wurden in der vorliegenden Untersuchung keine oder nur geringe Veränderungen der Transkription des AR festgestellt. Bisher ist bei ihnen die Translation nicht untersucht worden, in der durch Western Blots Störungen nachweisbar würden. Die Ursachen hierfür könnten mit Hilfe eines Northern Blots oder einer XL-RT-PCR über die gesamte cDNA-Region aufgedeckt werden, denn im 3'UTR befinden sich einige Bereiche, von denen ein regulierender Einfluß auf die Translation vermutet wird. Möglicherweise liegen in diesem Bereich Störungen vor. Im 3'UTR und im Poly(A)-Schwanz wurden Bereiche vermutet, welche die Translation kontrollieren könnten. Auch im 5'UTR wurden zwei Helix-Loop-Bindungsstellen entdeckt, die vermutlich die Translation beeinflussen (Faber et al., 1991; Jackson, 1993; Mizokami et al., 1994a; Takane et al., 1996). Weiterhin wurde von Takane vermutet, daß posttranskriptionale und posttranslationale Mechanismen die mRNA-Menge und Stabilität beeinflussen können, die dann wiederum eine Ursache für verringerte mRNA-Mengen bei Transkriptionsmessungen sein können.

In Exon 1 des AR-Gens befinden sich zwei Polymorphismen, ein Glutamin- und ein Glycin-Repeat variabler Länge. Es gibt Hinweise darauf, daß ein verlängerter Glutamin-Repeat (Lim et al., 2000; Hughes et al., 2004) und ein verkürzter Glycin-

Repeat (Werner et al., 2004) auch ohne zusätzliche Mutation im AR-Gen mit untervirilisierten Genitalien bzw. einer verringerten Transaktivierungskapazität assoziiert sind. Eine Analyse dieser Abschnitte wäre bei den hier untersuchten Patienten sinnvoll.

Cofaktoren stellen eine weitere Grundlage für Hypothesen zur molekularbiologischen Basis der Androgenresistenz dar. Es gibt eine Reihe von Cofaktoren, die die unterschiedlichsten molekulargenetischen Schritte unterstützen bzw. ermöglichen. Für den Androgenrezeptor sind mehrere Cofaktoren bekannt, die auf die Transkription des AR und die Aktivierung seiner Zielgene wirken, und es ist nicht unwahrscheinlich, daß weitere bisher unentdeckte Faktoren ebenfalls eine Rolle spielen (Gottlieb, 2003).

Cofaktoren des AR regulieren oder veranlassen die Transaktivierung der androgenrezeptorabhängigen Zielgene durch Veränderungen in Transaktivierungsdomänen, sodaß der AR seine Konformation verändert und Genaktivierung möglich wird (Yeh et al., 1999). Der AR hat zwei Hauptdomänen zur Transaktivierung, AF-1 in der transaktivierenden Rezeptordomäne und AF-2 in der ligandenbindenden Domäne. Diese Bereiche interagieren mit den Zielgenen direkt oder über Coaktivatoren (Horwitz et al., 1996). Die über AF-2 aktivierten Faktoren können wiederum andere Rezeptoren aktivieren und an die DNA-bindende oder transaktivierende Domäne des AR können sich weitere Faktoren anlagern (Yeh et al., 1999; Adachi et al., 2000). In den verschiedenen Gruppen der Coaktivatoren von Steroidrezeptoren wurden sowohl rezeptorspezifische, z.B. selektiv auf den AR wirkende, als auch allgemeine Coaktivatoren entdeckt. In jedem Gewebe herrscht zudem ein spezifisches Cofaktormilieu. Zusätzlich spielen das Zellmilieu, der Zelltyp und die Hormonkonzentration eine Rolle (Robins et al., 1994; Bebermeier et al., 2004). Durch die Rezeptor- und Zellselektivität einiger Cofaktoren, die zudem ein spezielles Zellmilieu benötigen könnten, ist es möglich, daß kleine Milieu-Unterschiede zwischen verschiedenen Patienten bereits unterschiedliche AR-Aktivierungsmuster hervorrufen können. Solange es sich um unspezifische Cofaktoren handelt, wird sich der Fehler klinisch auch auf anderen Ebenen ausprägen. Aber spezifische Cofaktoren, die nur in wenigen Zellarten ihre

Wirkung entfalten, können durch Defekte möglicherweise fokussiert AIS hervorrufen. Adachi fand Nachweise für einen Cofaktor, dessen Fehlen AIS hervorruft. Er berichtet von einer Patientin mit CAIS, bei der keine Mutation des AR-Gens als Ursache gefunden wurde. Die AR-mRNA-Konzentration und die AR-Bindungseigenschaften waren ebenfalls normal. Die Übertragung des Transaktivierungssignals über AF-1 war allerdings stark herabgesetzt. Es wurde ein Protein identifiziert, welches als Cofaktor wirkt, aber keinem der bekannten Cofaktoren entspricht (Adachi et al., 2000). Mutationen von Cofaktoren können auch die Transkription verhindern. Rahman identifizierte *in vitro* eine dominant-negative Variante des Cofaktors ARA55. Diese verhinderte die Dimerisation zweier ARA55-Moleküle, die normalerweise die Transkriptionsaktivität des AR steigern. Durch diese Mutation wurde die Transkription supprimiert (Rahman et al., 2003). Mutationen in Bindungsstellen für Coregulatoren können bei *Drosophila* aus einem Corepressor eine Coaktivator machen. Auch für Regulatorsequenzen im AR von Ratten wurde solch ein Mechanismus vermutet (Song et al., 1995). Ein wie von Adachi beschriebener Mechanismus könnte das AIS in Patienten mit normaler AR-Transkriptmenge (hier z. B. ARD 345-3, ARD 714-4 und ARD 832-3) erklären, der von Rahman beschriebene Mechanismus stellt möglicherweise eine Erklärung für Patienten wie ARD 402-2 mit nahezu nicht vorhandener AR-Transkriptmenge dar.

Außer der bekannten androgenabhängigen Aktivierung des Androgenrezeptors existieren Hinweise auf weitere ligandenunabhängige Aktivierungswege. Über den Adenylatcyclase-Signaltransduktionsweg und durch Proteinkinase-Aktivierung kann der AR unabhängig von einem Liganden phosphoryliert und so aktiviert werden (Nazareth et al., 1996; Cato, 2004). Auch Wachstumsfaktoren wie KGF, IGF-1 und EGF führen zu einer androgenunabhängigen Aktivierung des AR in der Prostata (Culig et al., 1994). Weiterhin können auch Androgene allein im Zusammenspiel mit Proteinen wie Ras, Raf und ERK ohne Umweg über Rezeptor und Zellkern in einem beschleunigten Aktivierungsweg wirken (Cato, 2004). In welchem Maße diese alternativen Aktivierungsmodelle eine Rolle in der Androgenwirkung spielen und ob auf diesem Weg dieselben Zielgene aktiviert werden, ist allerdings noch

unklar. Defekte in diesen Wegen der Androgenrezeptoraktivierung können jedoch im Prinzip auch zu Formen der Androgenresistenz führen (Jenster, 2004).

Nicht nur intrazellulär in Genitalhautfibroblasten, auch in anderen Zelltypen können Ursachen für eine defekte Androgenwirkung liegen. Gewebeinteraktionen über verschiedene Zelltypen hinweg und parakrine Mechanismen spielen in vielen Organen eine Rolle. Androgenvermittelte Effekte treten in Zellen auf, die den AR nicht exprimieren, wie frühembryonale Epithelzellen im Urogenitaltrakt. Das Mesenchym ist hingegen zu der Zeit Androgenrezeptor-positiv. Die androgenvermittelte Bildung der Samenblase aus dem Epithel des Urogenitalsinus oder die Differenzierung der Drüsengänge in der Prostata entstehen durch parakrine Mechanismen (Cunha, 1994; Cunha, 1996). Diese parakrin induzierten Wirkungen sind reziprok, da sowohl das Epithel wie auch das Mesenchym sich allein nicht differenzieren. Levine vermutete, daß auch DHT bei der Entwicklung der fetalen männlichen Genitalien in Form eines autokrinen und parakrinen Mechanismus funktioniert, da zwar im Stroma, aber nicht im Epithel des Skrotum AR und 5RII exprimiert wird (Levine et al., 1996). Der Wachstumsfaktor Keratinocyte Growth Factor (KGF) spielt als möglicher Mediator bei der Entwicklung des Drüsenepithels der Prostata eine bedeutende Rolle als Induktor (Cunha, 1996). KGF ist ein im männlichen Genitaltrakt androgenabhängiger Wachstumsfaktor, der in den Mesenchymzellen der Prostata, die den AR exprimieren, gebildet wird. Über FGF-R2, den Fibroblast Growth Factor-Rezeptor 2, der in den Epithelzellen exprimiert wird, fördert er dort das Epithelwachstum. Auch im IGF-System (Insulin-like Growth Factor) wurden mehrere Wechselwirkungen mit Androgenen beschrieben. In Osteoblasten steigern Testosteron und DHT die Expression von IGF-I und IGF-Bindungsprotein 2 und 3 (Gori et al., 1999). IGF-I steigert in Genitalhautfibroblasten die Aktivität der 5 α -Reduktase II. Vermutlich wirkt der Androgenrezeptor parakrin über IGF-I, das lokal gebildet wird, als Modulator (Horton et al., 1993). Da der Androgenrezeptor das IGF-System aktiviert und darüber Teile seiner Wirkung entfaltet, kann hier eine Ursache ungeklärter Virilisierungsstörungen liegen. Elmlinger entdeckte eine verringerte Expression von IGF-II und eine gesteigerte Expression seines

Bindungsproteins IGF-BP 2 in Genitalhautfibroblasten von Patienten mit CAIS (Elmlinger et al., 2001; Diesing et al., 2003). Eine IGF-I-Produktion konnte, genauso wie eine Bindungsaktivität des Androgenrezeptors, in den Zellen nicht nachgewiesen werden. IGF-II und IGF-I werden beide über den IGF-I-Rezeptor moduliert. In dieser Studie wurde auch vermutet, daß die Reduktion von IGF-II und die Steigerung von IGF-BP 2 im Genitalgewebe ein Faktor der fehlerhaften Virilisierung sein könnte. Bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten wäre es ebenso möglich, daß eine verringerte Transkription über das IGF-System die Virilisierung aufhält oder daß bei normaler AR-Transkription ein Defekt im IGF-System als Ursache vorliegt.

Untersuchungen zu Zielgenen des AR wiesen auf eine Anzahl Gene hin, die für Proliferation, Morphogenese und Zelltod verantwortlich sind, wie zum Beispiel Testican und L-Plastin (Nitsche et al., 1996). Eine Reihe weiterer Schlüsselgene der Morphogenese werden in ihrem Expressionsmuster durch den AR geprägt (Holterhus et al., 2003a). Ein Defekt in den Genen, die hiervon speziell für die Ausbildung des Urogenitaltraktes von Bedeutung sind, könnte ein der Androgenresistenz ähnliches Bild hervorrufen.

Es bestehen also diverse Möglichkeiten, wie ein AIS verursacht werden kann, ohne daß eine Mutation im AR- oder 5RII-Gen vorliegt. Weitergehende Untersuchungen des AR-Proteins, des Promotors und der Cofaktoren müssen durchgeführt werden, um bei jedem einzelnen Patienten einen Hinweis auf die Ursache seines Syndroms zu bekommen und in der Summe ein Bild von der Häufigkeit der einzelnen Ursachen zu erhalten.

Die phänotypische Variabilität des AIS, bei der bei nachgewiesenen Mutationen keine durchgehende Korrelation zum Phänotyp gezogen werden kann, stellt einen weiteren ungeklärten Aspekt des Androgenresistenzsyndroms dar. Die Klärung der Ursachen ist besonders für die Geschlechtszuweisung und zur Abschätzung der Entwicklung während der Pubertät von Bedeutung, um die Therapie entsprechend ausrichten zu können.

Phänotypische Unterschiede bei identischen Mutationen verwandter Patienten wurden bereits in mehreren Fällen beschrieben (Rodien et al., 1996; Evans et al., 1997; Boehmer et al., 2001). Als Ursachen wurden unzureichende Testosteronkonzentrationen in einer kritischen Phase der fetalen Entwicklung aufgrund möglicher antiandrogener oder östrogenener Effekte durch Umwelttoxine bzw. selbst Variationen der Androgenspiegel im physiologischen Rahmen zur Zeit der fetalen Genitalentwicklung vermutet. In einem Fall beruhte der Unterschied auf einer zusätzlich erniedrigten 5RII-Expression bei einem der Geschwister. Hier wurden als Ursache Unterschiede in der DHT-Verfügbarkeit während der embryonalen Geschlechtsdifferenzierung vorgeschlagen. Weiterhin wurden Auffälligkeiten in der Stimulierbarkeit eines defekten AR durch T in vivo beobachtet. Ein unter normalen Bedingungen inaktiver Rezeptor eines PAIS-Patienten ließ sich durch unphysiologisch hohe Testosteron-Konzentrationen aktivieren und nahm seine Funktion auf (Holterhus et al., 1999; Holterhus et al., 2000). Mitverursachend für die AIS-Ausprägung wurden auch hier unterschiedliche fetale Testosteronkonzentrationen in verschiedenen Patienten bei identischer AR-Mutation vermutet.

Auch die Beobachtung eines Zusammenhangs zwischen Grad der Erkrankung und Transkriptionsrate des AR (s. o.) legt die Vermutung nahe, daß durchaus ein einzelner Faktor bei genotypisch unauffälligen Patienten ein AIS hervorrufen kann. Bereits mehrfach ist die Hypothese diskutiert worden, daß ein frühembryonaler Einfluß von Hormonen, eventuell Testosteron, die Zellen auf Expressionsmuster prägt und u. a. die AR-Expressionsrate festlegt (Hellwinkel, 1999; Hiort, 1999a; Holterhus et al., 2003a). Der Bezug zwischen Phänotyp und Transkriptionsrate ließe sich damit erklären, daß die Zellen auf AR-Expressionen unterschiedlicher Niveaus festgelegt werden und so in der folgenden Genitalentwicklung unterschiedlich starke Virilisierung bewirken. Auch bei anderen Erkrankungen des Urogenitaltrakts wurden ähnliche Mechanismen ursächlich vermutet. Relativ erhöhte DHT-Konzentrationen könnten während der fetalen Entwicklung der Prostata einen Imprinting-Effekt in den Stromazellen verursachen, der zur Entwicklung einer Benignen Prostatahyperplasie im Alter prädisponiert (Levine et al., 1996). Bereits 1981 formulierten Kaufman et al. die Hypothese, daß

physiologische Fluktuationen der DHT-Menge einen adaptierten Vorteil in Zielzellen verleihen können, wodurch die Ansprechbarkeit der Rezeptoren auf DHT erhöht werden könnte. Eine eventuell defekte Regulation des AR als Ursache für PAIS wurde in einem Patienten spekuliert (Kaufman et al., 1981).

In dieser Hinsicht ist die Frage nach altersabhängigen Autoregulationsmechanismen des AR interessant. Die Regulation des AR durch Androgene ist in unterschiedlichen Geweben und in den gleichen Geweben unterschiedlicher Spezies uneinheitlich. Teilweise finden sich in der Literatur sowohl bei Studien an tierischen als auch an humanen Geweben widersprüchliche Angaben. Positive Wirkungen von Androgenen auf die AR-mRNA- und Proteinmenge wurden bei Ratten, humanen hepatozellulären Karzinomen und im Knochen gefunden (Takeda et al., 1991; Kerr et al., 1995; Yu et al., 1995; Wiren et al., 1997). Eine negative Autoregulation fand sich hingegen in LNCap-Zellen und ebenfalls bei Ratten (Quarmby et al., 1990; Tilley et al., 1990; Trapman et al., 1990; Blok et al., 1992; Wolf et al., 1993). Über die Autoregulation des Androgenrezeptors speziell in humanen Genitalhautfibroblasten gibt es ebenfalls widersprüchliche Darstellungen. In früheren Studien wird von einer Heraufregulation des AR durch DHT in GHF berichtet (Kaufman et al., 1981; Gad et al., 1988). Nirdé sprach von einem biphasischen Autoregulationsmechanismus (Nirde et al., 1998), aber Hellwinkel wie auch Wolf zeigten, daß kein Einfluß durch Androgene besteht (Wolf et al., 1993; Hellwinkel et al., 2000b). Bei AIS-Patienten mit Mutation wird kein Einfluß auf die Transkription durch Testosteron beobachtet (Hellwinkel et al., 2000b). Für 5RII existiert ein positiver Feedback-Mechanismus im embryonalen Urogenitaltrakt der Ratte (George et al., 1991). In humanem Genitalgewebe ist die 5RII-Expression in weiblichen Feten geringer als in männlichen, die höhere Androgenspiegel haben (Wilson et al., 1993). Gegen eine positive Autoregulation in humanem Gewebe spricht allerdings, daß bei CAIS-Patienten die 5RII-Aktivität häufig normal ist und daß in vitro in Genitalhautfibroblasten keine Steigerung durch Inkubation mit Androgenen erreicht wird (Pinsky et al., 1978; Hellwinkel et al., 2000b).

In vielen tierischen Geweben sind die Regulation des Androgenrezeptors und die Androgenrezeptormenge altersabhängig. Bei der Ratte wurde in unterschiedlichen

Gewebe eine Abhängigkeit der Androgenrezeptor-Menge von der Entwicklungsstufe beobachtet (Cunha et al., 1983; Takane et al., 1990). Der Penis der Ratte verliert mit der Adoleszenz seine Androgenresponsivität. Es wurde gezeigt, daß sinkende AR-Protein-Mengen im Penis nur in einigen Penisbereichen mit einer sinkenden AR-mRNA-Menge einhergehen und daher wohl unterschiedliche Faktoren die Promotoraktivität beeinflussen (Takane et al., 1991). In der Harderschen Drüse des Hamsters wurde eine positive Autoregulation des AR nachgewiesen, deren Bedeutung auf die Embryo- und Neugeborenenphase beschränkt ist (Varriale, 1996). Im menschlichen Fetus variiert die Testosteronkonzentration mit dem Alter des Fetus (Diez D'aux et al., 1974; Reyes et al., 1974; Takagi et al., 1977). Die maximale Testosteronsekretion besteht in der 17. bis 20. Woche. Der Androgenrezeptor wird sowohl im Genitalgewebe männlicher als auch weiblicher Feten exprimiert (Kalloo et al., 1993). Kim et al. wiesen bereits bei Feten von 12 bis 20 Wochen Alter Androgenrezeptoren und 5 α -Reduktase II-Aktivität in Genitalhaut und anderen penilen Strukturen nach. Die Expression des AR veränderte sich im Epithel der Urethra mit dem Alter des Feten (Kim et al., 2002). Eine altersabhängige Expression des AR wurde auch in menschlicher Vorhaut beobachtet. Dort sinkt die AR-mRNA-Menge nach der Geburt, beginnt bei einem Alter von 10 Jahren wieder zu steigen und fällt im späteren Leben ab. Dabei scheint die AR-mRNA-Menge nicht (ausschließlich) von Androgenen kontrolliert zu sein, denn sie steigt, bevor der Penis durch Androgene zu wachsen beginnt, und das Peniswachstum endet mit einem Absinken der AR-mRNA-Menge trotz bleibend hoher Testosteronspiegel (Roehrborn et al., 1987). Hellwinkel konnte dies für GHF allerdings nicht bestätigen, die von ihm untersuchten GHF im Alter von fünf Monaten bis 51 Jahren zeigten kein altersabhängige Transkriptionsverhalten (Hellwinkel et al., 2000b).

Anhand dieser Beispiele wird die Vermutung ersichtlich, daß Variationen in der Androgenkonzentration ein entscheidender Faktor für die Unterschiede im Phänotyp sein können, indem sie in der kritischen Phase der embryonalen Genitalentwicklung die Androgenrezeptorfunktion beeinflussen. Der zweite Aspekt der Arbeit umfaßt daher den Einfluß von Testosteron auf die Transkription des

Androgenrezeptors und der 5α -Reduktase II in Fibroblasten der AIS-Patienten und von Patienten mit Mutation im 17β -HSD III-Gen. Sollte eine Art Autoregulation in Genitalhautfibroblasten während der Embryonalzeit existieren, müßte sie bei Patienten mit 17β -HSD III-Mutation gestört sein, da eine normale Testosteronproduktion nicht möglich ist, und die Expression müßte folglich auffällig sein.

Betrachtet man in den hier durchgeführten Untersuchungen den Einfluß von Testosteron, so findet sich sowohl bei ARD-Zellen als auch bei hvHF-Zellen keine signifikante Veränderung in der AR- und 5RII-Expression. Diese Ergebnisse decken sich mit den jüngsten Untersuchungen von GHF mit und ohne Mutation von Hellwinkel (Hellwinkel et al., 2000a; Hellwinkel et al., 2000b). Man kann nun auch bei Genitalhautfibroblasten von AIS-Patienten ohne nachgewiesene Mutation nicht von einem persistierenden Einfluß von Testosteron auf die Transkription sprechen. In den Untersuchungen dieser Arbeit fand sich ebenfalls kein Einfluß von Testosteron auf die Transkription des AR in 17β -HSD III-Patientenzellen. Allerdings war die 5RII-Expression bei den zwei Patienten mit 17β -HSD III-Mutation, deren GHF untersucht wurden, nach Testosteroninkubation verglichen mit testosteronfreien Wachstumsbedingungen deutlich auf 300 % bzw. 460 % im Median erhöht. Diese Ergebnisse können zunächst als Phänomene betrachtet werden, statistisch valide Erkenntnisse lassen sich aufgrund der geringen Probenanzahl nicht machen. Sie können jedoch auch als ein weiterer Hinweis auf eine mögliche die Transkription prägende embryonale Phase betrachtet werden. Geht man von der Annahme aus, daß eine embryonale androgengesteuerte Autoregulation der AR- und 5RII-Transkription existiert, die dazu führt, daß nach Ende dieser prägenden Phase durch Androgene nicht mehr beeinflussbare Transkriptionslevel festgeschrieben sind, fügt sich die erhöhte 5RII-Transkription dieser Patienten gut in diese Hypothese hinein. Da bei diesen Patienten durch mangelnde Testosteronsynthese während der Embryonalentwicklung keine Fixierung der Transkriptionslevel hervorgerufen wird, bleiben diese, allerdings interessanterweise hier nur bei der 5RII, sensibel für eine spätere Stimulation durch Androgene.

Hinweise auf solch einen Mechanismus der zeitlich limitierten androgensensiblen Phase der Genexpression, die später irreversibel deaktiviert wird, fand kürzlich Holterhus. In einer neuen Studie zeigte er Hinweise auf eine pränatale genomische Programmierung der Genitalhautfibroblasten auf (Holterhus et al., 2003a). Wie mit Hilfe von Microarrays erkannt wurde, werden Expressionsmuster von über 30.000 Genen in GHF von gesunden Männern anders festgelegt als in denen von Patienten mit Androgenresistenz. Bei den Genen, bei denen Unterschiede in der Transkription gefunden wurden, handelt es sich vor allem um Gene, die die Entwicklung beeinflussen, wie Differenzierungsfaktoren (HOX), Proteine der Signaltransduktion, der extrazellulären Matrix und für die Zell-Zell-Kontakte (Integrine, Cadherine). DHT-Inkubation konnte keine Veränderung der Transkriptionsmuster hervorrufen. Holterhus vermutete, daß der AR und möglicherweise präandrogene Prozesse die Expressionsmuster verursachen und so eine Ursache für Differenzierungen und Fehlentwicklungen bei der Genitalentwicklung bilden könnten. Diese Expressionsmuster können durch unterschiedliche Testosteronspiegel in der postulierten sensitiven Phase während der Embryonalentwicklung beeinflußt werden und daher zu verschiedenen Phänotypen führen, auch bei identischen Genotypen bzw. identischen Mutationen. Je nach der zugrundeliegenden Ursache der Virilisierungsstörung könnte dieser Effekt den Phänotyp mit beeinflussen und somit auch die individuelle Variabilität des Phänotyps mit erklären.

Obwohl gezeigt wurde, daß bei AIS-Patienten normalerweise keine Abhängigkeit der Transkription von der Testosteronkonzentration besteht, könnte weiterhin in wenigen Fällen eine Persistenz der Sensitivität der AR-Expression für Testosteron erhalten bleiben, ähnlich dem von Holterhus beschriebenen Patienten (Holterhus et al., 2000). Die zuvor genannten Hypothesen, die das AIS bei Patienten ohne Mutation erklären könnten, können ebenfalls zur Variabilität der Phänotypen bei identischer Mutation beitragen, wie zum Beispiel Defekte in Cofaktoren oder andere Modulatoren (Holterhus et al., 2000).

17 β -HSD III-Patienten leiden wie AIS-Patienten an unzureichender Virilisierung, allerdings virilisieren sie in der Pubertät deutlich. Die Ursache der Virilisierung ist

bisher ungeklärt. In der vorliegenden Studie zeigte sich, daß die Expression der 5RII durch Testosteron auf ein Vielfaches erhöht wurde. Im Gegensatz zu normalen männlichen und AIS-Genitalhautfibroblasten scheinen 17 β HSD III-defiziente GHF in vitro eine androgenregulierte Transkriptionsregulation der 5RII aufzuweisen. Diese Daten könnten bedeuten, daß 17 β HSD III-defiziente GHF teilweise der postnatalen programmierten Unempfindlichkeit gegenüber Androgenen entkommen sind. Da den Patienten in der Embryonalentwicklung Testosteron fehlt, blieben die Zellen sensibel für eine Stimulation durch Testosteron. In vivo könnte die Heraufregulation der 5RII-Expression in genitalen Bindegewebszellen durch Androgene zur Virilisierung der 17 β -HSD III-defizienten Patienten in der Pubertät beitragen. Die niedrigen, aber durchaus vorhandenen Testosteronspiegel würden verstärkt in DHT, das potentere Androgen, umgewandelt. DHT stünde dann in den genitalen Geweben vermehrt zur Verfügung, um eine größtmögliche Virilisierung in der Pubertät zu erreichen.

Weitergehende Untersuchungen, insbesondere Screenings mittels Microarrays, an Zellen unterschiedlichen Alters und mit verschiedenen Störungen innerhalb der Wirkungskette der Androgene müßten durchgeführt werden, um die embryonale Prägung durch Androgene und ihre Folgen besser zu verstehen.

Zusammenfassend ergeben sich aus dieser Arbeit folgende Erkenntnisse:

- 1) Bei AIS-Patienten ohne nachweisbare Mutation ist die Transkription des Androgenrezeptor-Gens mit steigender Virilisierungsstörung zunehmend verringert. Ob die Transkriptionsverringering eine der Ursachen oder eine Wirkung der Virilisierungsstörung darstellt, bleibt unklar. Die Transkription des 5 α -Reduktase II-Gens ist bei diesen Patienten eher herabgesetzt. Herabgesetzte Transkriptmengen beider Gene sind vermutlich ein Faktor, der zur Virilisierungsstörung beiträgt. Bei einer Patientin stellt die nahezu vollständig fehlende AR- und 5RII-Transkription vermutlich die Hauptursache des Krankheitsbildes dar. Eine einheitliche Ursache in der heterogenen Patientengruppe wurde nicht gefunden. Mögliche weitere Ursachen eines AIS

ohne Mutationsnachweis liegen in der Promotorregion, der Translationsregulation, Polymorphismen in Exon 1 des AR-Gens, in Cofaktoren der Expression, alternativen Aktivierungswegen des AR, anderen Mediatoren wie IFG-2 und in Defekten der Zielgene.

- 2) Die Transkription des AR- und 5RII-Gens wird bei den hier untersuchten Patienten nicht durch Testosteroninkubation beeinflusst. Wie bei gesunden und AIS-Individuen mit Mutation liegt dies möglicherweise an einer pränatalen Programmierung, bei der Androgene selbst die spätere Beeinflussbarkeit der AR- und 5RII-Transkription durch Androgene abschalten. Defekte in dieser Programmierung können eine Ursache sein, die zur phänotypischen Variabilität beiträgt.
- 3) Bei Patienten mit Mutation im 17 β -HSD III-Gen wird die Transkription der 5RII, nicht aber die des AR durch Testosteron gesteigert. Dies ist ein weiteres Indiz für die Existenz einer zeitlich limitierten sensiblen Phase der Expressionsregulation durch Androgene in der Geschlechtsentwicklung, in der Transkriptraten festgelegt werden. Eine pränatale Programmierung durch Androgene scheint bei diesen Patienten nicht stattgefunden zu haben. Die Induzierbarkeit der 5RII-Expression durch T ist somit eine mögliche Ursache für die Virilisierung während der Pubertät.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichen einen erweiterten Einblick in die komplexen Vorgänge, die der pathologischen männlichen Geschlechtsentwicklung zugrunde liegen und bieten Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen zum tieferen Verständnis der Genese der Androgenresistenz. In der Folge können sie möglicherweise zur Weiterentwicklung therapeutischer Konzepte bei Virilisierungsstörungen beitragen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Androgenresistenzsyndrom (AIS) ist eine Virilisierungsstörung variabler Ausprägung, der meist eine Mutation im Androgenrezeptor (AR)-Gen oder im Gen der 5 α -Reduktase II (5RII) der 46,XY-Patienten zugrunde liegt. 5RII wandelt Testosteron in das potentere Dihydrotestosteron (DHT) um. In dieser Studie wurden Patienten mit klinischen Kriterien des AIS, bei denen keine Mutation nachweisbar war, mittels kompetitiver RT-PCR dahingehend untersucht, ob eine Störung der Transkription des AR- und 5RII-Gens die Ursache des AIS darstellen kann. Die Bandbreite der erhobenen Befunde reichte von kaum nachweisbarer Transkription beider Gene über eine isolierte Verringerung der AR- oder 5RII-Transkription bis hin zu unauffälligen oder erhöhten mRNA-Konzentrationen. Allerdings fand sich eine auffällige Korrelation zwischen der Erniedrigung der Transkriptionsrate des AR und zunehmendem Schweregrad des AIS. Es ist somit denkbar, daß eine erniedrigte Transkription des AR eine Rolle bei der Ausbildung des Phänotyps einzelner Patienten spielt. Dies ist zumindest bei einer Patientin (ARD 402) sehr wahrscheinlich. Weitere mögliche Ursachen für die Ausprägung des AIS wären Defekte der AR-Promotorregion oder der Cofaktoren der AR-Transkription sowie Störungen in der Translation oder in den Zielgenen des AR. Weiterhin wurden Hinweise auf Autoregulationsmechanismen gesucht, welche die schwache Genotyp-Phänotyp-Korrelation des AIS erklären können. Hierzu wurde der Einfluß von Testosteron auf die AR- und 5RII-Transkription in AIS-Patientenzellen und 17 β -HSD III-Patientenzellen untersucht. Patienten mit einer Mutation im Gen der 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase III (17 β -HSD III) können Androstendion nicht in Testosteron umwandeln. Testosteron steigerte die Transkription der 5RII bei diesen Patienten, auf die Transkription des AR und AIS-Patientenzellen hatte es keinen Einfluß. Dies liefert einen weiteren Hinweis auf eine pränatale sensible Phase, in der Androgene einen prägenden Einfluß auf die spätere Expression haben und dann durch Androgene unbeeinflussbare Transkriptionsraten festlegen. So könnte sich die schwache Genotyp-Phänotyp-Korrelation des AIS teilweise erklären lassen und bei 17 β -HSDIII-Patienten durch Ausfall der pränatalen Programmierung die Virilisierung in der Pubertät entstehen.

6. ANHANG

6.1 Transkription des AR: Rohdaten

	Median A(T/S)		hVHF Median A(T/S)	
	mit T	ohne T	mit T	ohne T
ARD 37-2	2,316	2,604	4,806	7,703
ARD 320-2	0,880	0,435	2,520	1,619
ARD 345-2	0,780	0,717	0,851	0,794
ARD 350-3	0,343	0,217	0,510	0,667
ARD 389-2	0,765	1,186	0,865	1,092
ARD 402-2	0,089	0,000	2,520	1,619
ARD 444-2	0,801	0,628	0,851	0,794
ARD 529-2	1,550	1,468	0,680	0,747
ARD 674-5	0,431	0,716	1,528	1,361
ARD 714-4	1,457	1,368	1,388	1,426
ARD 832-2	0,788	0,732	0,549	0,435
ARD 150-2	0,303	0,622	0,732	0,700

Tabelle 11: Rohdaten der Untersuchungen der AR-mRNA an AIS-Patienten: Ergebnisse aus jeweils 3 RT-PCR-Untersuchungen nach densitometrischer Analyse.

	Median A(T/S)		hVHF Median A(T/S)	
	mit T	ohne T	mit T	ohne T
ARD 111-2	1,987	1,594	1,452	2,247
ARD 623-2	1,168	1,005	1,254	0,721
ARD 57-4	0,462	0,365	0,775	0,782
ARD 876-2	0,879	0,501	0,645	1,053

Tabelle 12: Rohdaten der Untersuchungen der AR-mRNA an 17 β -HSDIII-Patienten: Ergebnisse aus jeweils 3 RT-PCR-Untersuchungen nach densitometrischer Analyse

6.2 Transkription des AR: Beispiel-Gele mit Auswertung

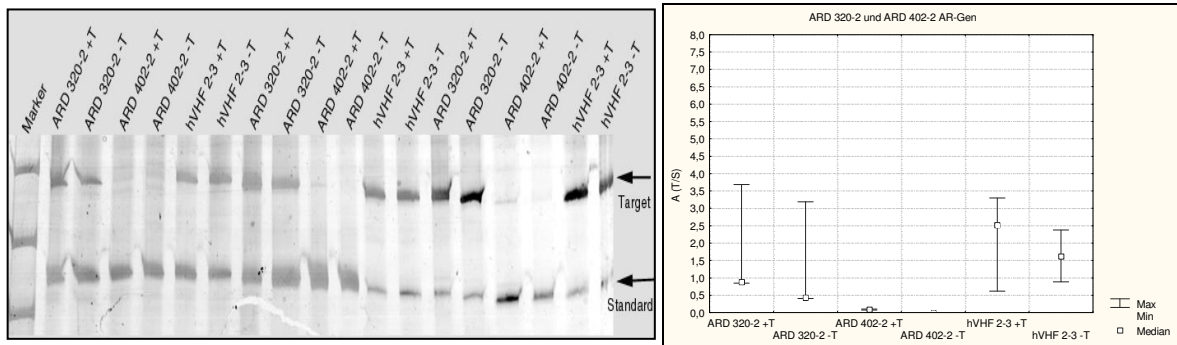


Abbildung 31 und 32: Ergebnisse der Patienten ARD 320-2 und ARD 402-2. Die Transkription des AR ist bei ARD 320-2 leicht, bei ARD 402-2 im Vergleich zur Normalkontrolle hVHF 2-3 sehr stark erniedrigt.

Abb. 31: das PAA-Gel mit drei PCR-Durchgängen

Abb. 32: die A(T/S)-Ergebnisse als Diagramm

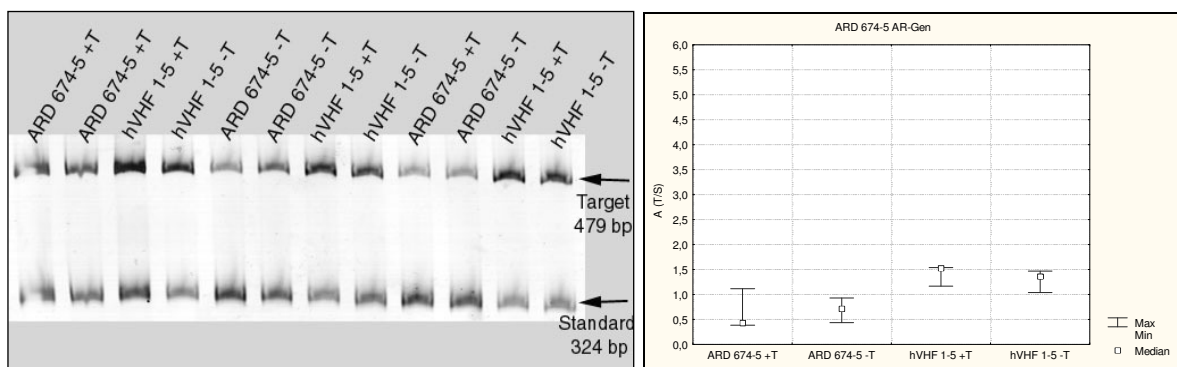


Abbildung 33 und 34: Ergebnisse des Patienten ARD 674-5. Die Transkription des AR ist niedriger als bei der Normalkontrolle hVHF 1-5.

Abb. 33: PAA-Gel mit drei PCR-Durchgängen

Abb. 34: A(T/S)-Ergebnisse als Diagramm

6.3 Transkription der 5RII: Rohdaten

	Patient (Kompetitor in aMol/ μ g)			Normalkontrolle (Komp. in aMol/ μ g)		
	1.PCR A(T/S)	2.PCR A(T/S)	3.PCR A(T/S)	1.PCR A(T/S)	2.PCR A(T/S)	3.PCR A(T/S)
ARD 37-2	0,06	0,12	0,2	0,06	0,12	0,2
+T	0,217	0,117	0,091	0,904	0,440	0,297
-T	0,069			1,482	0,705	0,417
ARD 320-2	0,06	0,06	0,1	0,06	0,06	0,1
+T	0,442	0,425	0,225	1,024	0,666	0,639
-T	0,578	0,273	0,132	1,377	0,590	
ARD 345-2	0,06	0,12	0,2	0,06	0,12	0,2
+T		0,044	0,051		0,142	0,235
-T		0,059	0,045		0,22	0,103
ARD 350-3	0,03	0,06	0,1	0,03	0,06	0,1
+T	1,230	1,074	0,488	1,939	0,818	0,854
-T	0,966	0,567	0,511	2,691	1,755	1,099
ARD 389-2	0,02	0,02	0,06	0,02	0,02	0,06
+T	1,782	3,781	3,135	1,192	1,093	1,147
-T	1,232	1,720	1,672	0,689	0,384	0,752
ARD 402-2	0,06	0,06	0,1	0,06	0,06	0,1
+T				1,024	0,666	0,639
-T				1,377	0,590	
ARD 444-2	0,06	0,12	0,2	0,06	0,12	0,2
+T	4,900	0,067	0,133		0,142	0,235
-T		0,119	0,084		0,220	0,103
ARD 529-2	0,03	0,06	0,1	0,03	0,06	0,1
+T	1,202	1,045	0,541	3,368	7,316	1,953
-T	0,750	1,276	0,889	3,541	6,296	2,226
ARD 674-5	0,03	0,06	0,1	0,03	0,06	0,1
+T	0,698	0,184	0,571	1,228	0,223	0,238
-T	1,250	0,327	0,359	1,205	0,520	0,276
ARD 714-4	0,03	0,06	0,1	0,03	0,06	0,1
+T			0,027	1,779	0,377	0,653
-T		0,043		1,582	0,759	0,384
ARD 832-2	0,03	0,06	0,06	0,03	0,06	0,06
+T	1,930	0,334	0,363	1,484	0,280	0,494
-T	1,813	0,284	0,359	1,357	0,251	0,483
ARD 150-2	0,03	0,03	0,06	0,03	0,03	0,06
+T				1,058	0,408	0,903
-T		0,138		0,785	0,483	0,825
ARD 111-2	0,02	0,03	0,06	0,02	0,03	0,06
+T	2,911	2,49	1,3	5,778	3,66	2,821
-T	0,394	1,366		4,891	3,726	3,26
ARD 623-2	0,02	0,03	0,06	0,02	0,03	0,06
+T	2,407	0,575	1,024	0,860	1,039	0,625
-T	0,793	0,191	0,393	0,660	0,954	0,840
ARD 57-4	0,02	0,03	0,06	0,02	0,03	0,06
+T				2,246	1,095	0,675
-T				1,972	1,467	0,898
ARD 876-2	0,03	0,06	0,1	0,03	0,06	0,1
+T				4,824	1,661	2,219
-T				4,050	2,122	1,712

Tabelle 13: Rohdaten der Untersuchungen der 5RII-mRNA: Ergebnisse aus jeweils 3 RT-PCR-Untersuchungen nach densitometrischer Analyse

6.4 Transkription der 5RII: Beispiel-Gele mit Auswertung

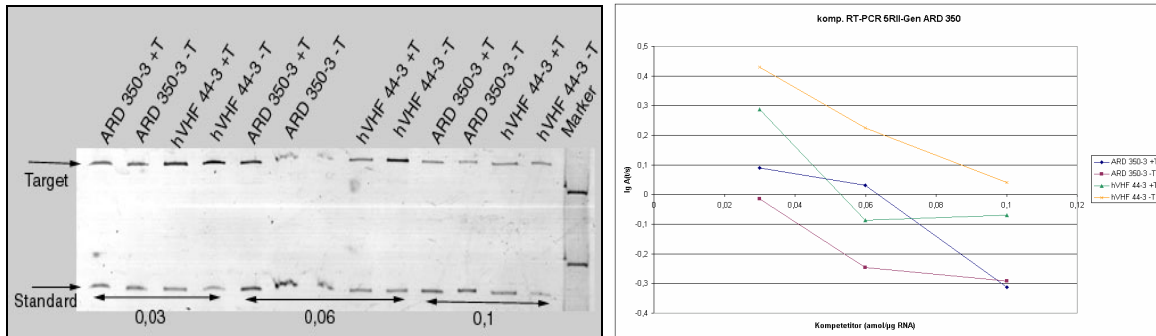


Abbildung 35 und 36: Ergebnisse des Patienten ARD 350-3. Die Transkription der 5RII ist etwas niedriger als bei der Normalkontrolle hVHF 44-3. Der lineare Abfall der A(T/S)-Werte bei steigender Kompetitorkonzentration ist gut zu erkennen.

Abb. 35: das PAA-Gel mit drei PCR-Durchgängen

Abb. 36: die A(T/S)-Ergebnisse im Vergleich zur Kompetitorkonzentration als Diagramm

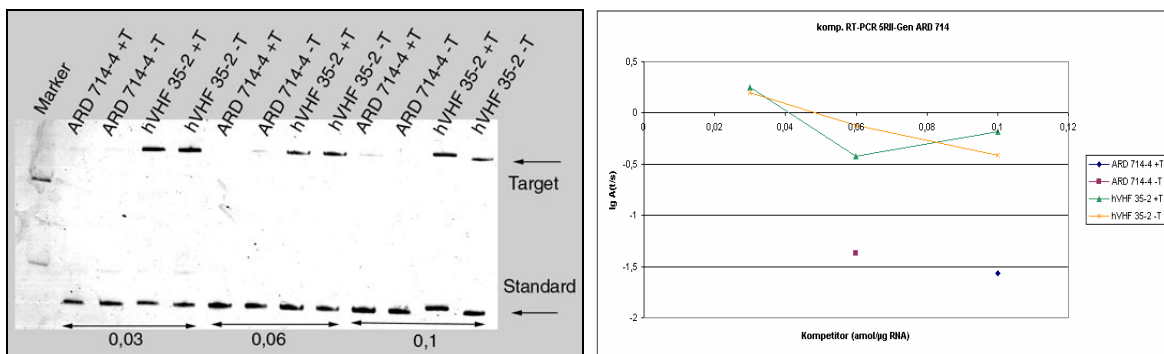


Abbildung 37 und 38: Ergebnisse des Patienten ARD 714-4. Die Transkription der 5RII ist deutlich niedriger als bei der Normalkontrolle hVHF 35-2, bzw. gar nicht meßbar.

Abb. 37: das PAA-Gel mit drei PCR-Durchgängen

Abb. 38: die A(T/S)-Ergebnisse im Vergleich zur Kompetitorkonzentration als Diagramm

6.5 Zusammenfassung aller Ergebnisse

AIS-Pat.	Alter	Geschlecht	AIS		AR Vgl. m. hVHF		5RII Vgl. m. hVHF		Testosteron (ng/ml)		DHT (ng/ml)		SHBG-Test
			Grad	Typ	mit T	ohneT	mit T	ohneT	vor Stim.	nach Stim.	vor Stim.	nach Stim.	
ARD 345-2	4 J. 7 Mo.	m	II	PAIS	100,5%	90,3%	26,3%	35,3%	<0,05		<0,01		
ARD 444-2	4 J. 8 Mo.	m	II	PAIS	94,1%	79,1%	51,9%	67,8%					
ARD 529-2	10 Mo.	m	II	PAIS	217,1%	185,9%	27,7%	21,2%	0,29	2,262	0,0725	0,7337	
ARD 714-4	2 J. 10 Mo.	m	II	PAIS	114,4%	78,2%	4,1%	5,7%	0,053				
ARD 37-2	4 J.	m	III	PAIS	60,8%	33,8%	26,6%	4,7%	0,08	0,97	0,13	0,45	50,90%
ARD 320-2	11Mo.	m	III	PAIS	111,7%	45,9%	43,2%	44,1%		6,6		0,73	
ARD 389-2	2 J. 5 Mo.	m	III	PAIS	88,4%	89,3%	273,3%	222,3%	<0,1	4,4			61,90%
ARD 674-5	5 Mo.	m	III	PAIS	28,0%	63,3%	82,5%	103,7%	2,78				
ARD 832-2	8 J. 7 Mo.	m	III	PAIS	133,6%	149,0%	119,3%	113,2%	0,14	3,11			60,90%
ARD 350-3	3 J. 9 Mo.	w	III	PAIS	67,8%	54,1%	63,4%	35,9%	0,087	4,06	0,0667	0,4002	42,60%
ARD 150-2	6 J. 5 Mo.	w	IV	CAIS	40,2%	85,4%	0,0%	0,0%	0,04	1,4	<0,01	0,15	55,60%
ARD 402-2	1 J.	w	V	CAIS	3,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,398	2,97	0,09	0,3	
17βHSD-Pat.											Androstendion(ng/ml)		
ARD 623-2	12 J. 3 Mo.	w	IV		93,1%	68,5%	163,8%	46,8%	1,84	1,77	2,49	5,23	
ARD 111-2	9 J. 10 Mo.	w	IV		108,1%	84,3%	50,4%	21,7%	<0,0232	0,0609			62,10%
ARD 57-4	10 J. 5 Mo.	w	IV		59,6%	35,0%	0,0%	0,0%	0,1	0,4	0,8	1,9	54,20%
ARD 876-2	1,5 Mo.	w	IV		64,4%	47,6%	0,0%	0,0%	0,19		0,75		

Tabelle 14: Darstellung aller Patienten mit Ergebnissen und klinischen Daten, sortiert nach AIS-Grad. Vgl. m. hVHF: im Vergleich zur Normalkontrolle mit hVHF-Zellen, Stim.: Stimulation mit hCG

6.6 Abkürzungen

AIS	A ndrogen I nsensitivity S yndrome (Androgenresistenzsyndrom)
AR.....	A ndrogen r ezeptor
ARE.....	A ndrogen r esposives E lement
bp	B asen p aare
CAIS.....	c omplete A ndrogen I nsensitivity S yndrome
cDNA.....	k omplementäre DNA von RNA revers transkribiert
DHT	D ihydro t estosteron
DNA	D esoxyribonucleinsäure
GF	G enitale F ibroblasten (GHF oder GoF)
GHF.....	G enital h aut f ibroblasten
GoF	G onadale F ibroblasten
hCG.....	h umanes C horigonadotropin
hVHF	h umane V or h aut f ibroblasten
kb	K ilobasen
LH	L uteinisierendes H ormon
mRNA.....	m essenger- RNA
PAA	P oly- A crylamid
PAIS	p artial A ndrogen I nsensitivity S yndrome
PCR.....	P olymerase C hain R eaction (Polymerasekettenreaktion)
RNA.....	R ibonucleinsäure
RT.....	R everse T ranskriptase
SHBG.....	S ex H ormone B inding G lobulin
SSCP	S ingle S trand C onformation P olymorphism
T	T estosteron
UTR.....	u ntranslated r egion
5RII.....	5 α - R eduktase II
17 β HSD	17 β - H ydroxysteroiddehydrogenase
+T.....	mit Testosteroninkubation (s. Kapitel 2)
- T.....	ohne Testosteroninkubation (s. Kapitel 2)

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Adachi M., Takayanagi R., Tomura A., Imasaki K., Kato S., Goto K., Yanase T., Ikuyama S. and Nawata H., Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease, *N Engl J Med*, **2000**; 343 (12), 856-62.
- 2 Ahmed S. F., Cheng A. and Hughes I. A., Assessment of the gonadotrophin-gonadal axis in androgen insensitivity syndrome, *Arch Dis Child*, **1999**; 80 (4), 324-9.
- 3 Albers N., Ulrichs C., Gluer S., Hiort O., Sinnecker G. H., Mildenerger H. and Brodehl J., Etiologic classification of severe hypospadias: implications for prognosis and management, *J Pediatr*, **1997**; 131 (3), 386-92
- 4 Allera A., Herbst M. A., Griffin J. E., Wilson J. D., Schweikert H. U. and McPhaul M. J., Mutations of the androgen receptor coding sequence are infrequent in patients with isolated hypospadias, *J Clin Endocrinol Metab*, **1995**; 80 (9), 2697-9.
- 5 Angerpointner T. A., Hypospadias--genetics, epidemiology and other possible aetiological influences, *Z Kinderchir*, **1984**; 39 (2), 112-8.
- 6 Batch J. A., Williams D. M., Davies H. R., Brown B. D., Evans B. A., Hughes I. A. and Patterson M. N., Androgen receptor gene mutations identified by SSCP in fourteen subjects with androgen insensitivity syndrome, *Hum Mol Genet*, **1992**; 1 (7), 497-503.
- 7 Bebermeier J. H., Deprimo S. E., Brooks J. D., Hiort O. and Holterhus P. M., Identification of global androgen receptor coregulator expression patterns in human urogenital tissues cultures based on microarray-analysis, **2004**, Poster presentation P 15, *International Symposium Intersex - from Gene to Gender*, Lübeck, Germany
- 8 Blok L. J., Themmen A. P., Peters A. H., Trapman J., Baarends W. M., Hoogerbrugge J. W. and Grootegoed J. A., Transcriptional regulation of androgen receptor gene expression in Sertoli cells and other cell types, *Mol Cell Endocrinol*, **1992**; 88 (1-3), 153-64.
- 9 Boehmer A. L., Brinkmann A. O., Sandkuijl L. A., Halley D. J., Niermeijer M. F., Andersson S., De Jong F. H., Kayserili H., De Vroede M. A., Otten B. J., Rouwe C. W., Mendonca B. B., Rodrigues C., Bode H. H., De Ruyter P. E., Delemarre-Van De Waal H. A. and Drop S. L., 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency: diagnosis, phenotypic variability, population genetics, and worldwide distribution of ancient and de novo mutations, *J Clin Endocrinol Metab*, **1999**; 84 (12), 4713-21

- 10 Boehmer A. L., Brinkmann A. O., Nijman R. M., Verleun-Mooijman M. C., De Ruiten P., Niermeijer M. F. and Drop S. L., Phenotypic variation in a family with partial androgen insensitivity syndrome explained by differences in 5alpha dihydrotestosterone availability, *J Clin Endocrinol Metab*, **2001**; 86 (3), 1240-6.
- 11 Cato A. C., Androgen receptor cross-talk and implications for intersex phenotype, **2004**, Oral presentation S 8, *International Symposium Intersex - from Gene to Gender*, Lübeck, Germany
- 12 Celi F. S., Zenilman M. E. and Shuldiner A. R., A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR, *Nucleic Acids Res*, **1993**; 21 (4), 1047.
- 13 Choong C. S., Sturm M. J., Strophair J. A., Mcculloch R. K. and Hurley D. M., Reduced expression and normal nucleotide sequence of androgen receptor gene coding and promoter regions in a family with partial androgen insensitivity syndrome, *Clin Endocrinol (Oxf)*, **1997**; 46 (3), 281-8.
- 14 Cooper D. N., Regulatory mutations and human genetic disease, *Ann Med*, **1992**; 24 (6), 427-37.
- 15 Coulam C. B., Graham M. L., 2nd and Spelsberg T. C., Androgen insensitivity syndrome: gonadal androgen receptor activity, *Am J Obstet Gynecol*, **1984**; 150 (5 Pt 1), 531-3.
- 16 Crocoll A., Zhu C. C., Cato A. C. and Blum M., Expression of androgen receptor mRNA during mouse embryogenesis, *Mech Dev*, **1998**; 72 (1-2), 175-8.
- 17 Culig Z., Hobisch A., Cronauer M. V., Radmayr C., Trapman J., Hittmair A., Bartsch G. and Klocker H., Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin- like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor, *Cancer Res*, **1994**; 54 (20), 5474-8.
- 18 Cunha G. R., Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate, *Cancer*, **1994**; 74 (3 Suppl), 1030-44.
- 19 Cunha G. R., Keratinocyte growth factor as mediator of mesenchymal-epithelial interactions in the development of androgen target organs, *Cell and Developmental Biology*, **1996**; 7 203-210
- 20 Diesing D., Elmlinger M. W., Schuett B. S., Weidemann W., Romalo G., Schweikert H. U., Spindler K. D. and Ranke M. B., Genital skin fibroblasts (GF) of patients with androgen insensitivity syndrome express higher

- insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2, -3 and -5 than GF of normally virilized males, *Horm Res*, **2003**; 60 (2), 73-8
- 21 Diez D'aux R. C. and Pearson Murphy B. E., Androgens in the human fetus, *J Steroid Biochem*, **1974**; 5 (3), 207-10.
- 22 Edelstein R. A., Carr M. C., Caesar R., Young M., Atala A. and Freeman M. R., Detection of human androgen receptor mRNA expression abnormalities by competitive PCR, *DNA Cell Biol*, **1994**; 13 (3), 265-73.
- 23 Elmlinger M. W., Mayer I., Schnabel D., Schuett B. S., Diesing D., Romalo G., Wollmann H. A., Weidemann W., Spindler K. D., Ranke M. B. and Schweikert H. U., Decreased expression of IGF-II and its binding protein, IGF-binding protein-2, in genital skin fibroblasts of patients with complete androgen insensitivity syndrome compared with normally virilized males, *J Clin Endocrinol Metab*, **2001**; 86 (10), 4741-6.
- 24 Evans B. A., Hughes I. A., Bevan C. L., Patterson M. N. and Gregory J. W., Phenotypic diversity in siblings with partial androgen insensitivity syndrome, *Arch Dis Child*, **1997**; 76 (6), 529-31.
- 25 Faber P. W., Van Rooij H. C., Van Der Korput H. A., Baarends W. M., Brinkmann A. O., Grootegoed J. A. and Trapman J., Characterization of the human androgen receptor transcription unit, *J Biol Chem*, **1991**; 266 (17), 10743-9.
- 26 Faber P. W., Van Rooij H. C., Schipper H. J., Brinkmann A. O. and Trapman J., Two different, overlapping pathways of transcription initiation are active on the TATA-less human androgen receptor promoter. The role of Sp1, *J Biol Chem*, **1993**; 268 (13), 9296-301.
- 27 Feyaerts A., Forest M. G., Morel Y., Mure P. Y., Morel-Journel N., Mallet D., Nicolino M., Chatelain P., David M. and Mouriquand P., Endocrine screening in 32 consecutive patients with hypospadias, *J Urol*, **2002**; 168 (2), 720-5; discussion 725.
- 28 Gad Y. Z., Berkovitz G. D., Migeon C. J. and Brown T. R., Studies of up-regulation of androgen receptors in genital skin fibroblasts, *Mol Cell Endocrinol*, **1988**; 57 (3), 205-13.
- 29 George F. W., Russell D. W. and Wilson J. D., Feed-forward control of prostate growth: dihydrotestosterone induces expression of its own biosynthetic enzyme, steroid 5 alpha-reductase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1991**; 88 (18), 8044-7.
- 30 Ghadessy F. J., Liow S. L. and Yong E. L., Mutations in the promoter region of the androgen receptor gene are not common in males with idiopathic infertility, *Mol Hum Reprod*, **1999**; 5 (3), 287-90.

- 31 Gori F., Hofbauer L. C., Conover C. A. and Khosla S., Effects of androgens on the insulin-like growth factor system in an androgen-responsive human osteoblastic cell line, *Endocrinology*, **1999**; 140 (12), 5579-86.
- 32 Gottlieb B., The Androgen Receptor Gene Mutations Database, <http://ww2.mcgill.ca/androgendb/>, **2003**; Last updated: 25/08/2003
- 33 Hellwinkel O. J., Androgene und ihr Einfluß auf die Transkription von Androgenrezeptor und 5alpha-Reduktase II in menschlichen Genitalhaufibroblasten, **1999**, Lübeck, Naturwiss. Dissertationsschrift
- 34 Hellwinkel O. J., Bassler J. and Hiort O., Transcription of androgen receptor and 5alpha-reductase II in genital fibroblasts from patients with androgen insensitivity syndrome, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2000a**; 75 (4-5), 213-8.
- 35 Hellwinkel O. J., Muller A., Struve D. and Hiort O., Influence of androgens and age on androgen receptor and 5 alpha- reductase II transcription, *Eur J Endocrinol*, **2000b**; 143 (2), 217-25.
- 36 Hellwinkel O. J., Holterhus P. M., Struve D., Marschke C., Homburg N. and Hiort O., A unique exonic splicing mutation in the human androgen receptor gene indicates a physiologic relevance of regular androgen receptor transcript variants, *J Clin Endocrinol Metab*, **2001**; 86 (6), 2569-75.
- 37 Henvel J. V. P., Tyson F. L. and Bell D. A., Construction of Recombinant RNA Templates for Use as Internal Standards in Quantitative RT-PCR, *BioTechniques*, **1993**; 14 395-398
- 38 Herold G., Innere Medizin, in: *Innere Medizin*, **2000**, Herold, G., Köln, 105
- 39 Hiort O., Wodtke A., Struve D., Zollner A. and Sinnecker G. H., Detection of point mutations in the androgen receptor gene using non- isotopic single strand conformation polymorphism analysis. German Collaborative Intersex Study Group, *Hum Mol Genet*, **1994**; 3 (7), 1163-6.
- 40 Hiort O., Sinnecker G. H., Willenbring H., Lehnert A., Zollner A. and Struve D., Nonisotopic single strand conformation analysis of the 5 alpha-reductase type 2 gene for the diagnosis of 5 alpha-reductase deficiency, *J Clin Endocrinol Metab*, **1996a**; 81 (9), 3415-8.
- 41 Hiort O., Willenbring H., Albers N., Hecker W., Engert J., Dibbelt L. and Sinnecker G. H., Molecular genetic analysis and human chorionic gonadotropin stimulation tests in the diagnosis of prepubertal patients with partial 5 alpha- reductase deficiency, *Eur J Pediatr*, **1996b**; 155 (6), 445-51.

- 42 Hiort O., Holterhus P. M. and Nitsche E. M., Physiology and pathophysiology of androgen action, *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, **1998**; 12 (1), 115-32.
- 43 Hiort O., Androgenresistenz - Physiologie und Pathophysiologie der Androgenwirkung, **1999a**, Lübeck, Med. Habilitationsschrift
- 44 Hiort O., Holterhus, P.M., Sinnecker, G.H.G., Kruse, K., Androgenresistenzsyndrome - Klinische und molekulare Grundlagen, *Dt Arztebl*, **1999b**; 96 A-686-692
- 45 Hiort O. and Holterhus P. M., The molecular basis of male sexual differentiation, *Eur J Endocrinol*, **2000**; 142 (2), 101-10.
- 46 Holterhus P. M., Sinnecker G. H., Wollmann H. A., Struve D., Homburg N., Kruse K. and Hiort O., Expression of two functionally different androgen receptors in a patient with androgen insensitivity, *Eur J Pediatr*, **1999**; 158 (9), 702-6.
- 47 Holterhus P. M., Sinnecker G. H. and Hiort O., Phenotypic diversity and testosterone-induced normalization of mutant L712F androgen receptor function in a kindred with androgen insensitivity, *J Clin Endocrinol Metab*, **2000**; 85 (9), 3245-50.
- 48 Holterhus P. M., Hiort O., Alter O., Brown P. O. and Brooks J. D., Differential Gene Expression Patterns in Genital Fibroblasts of Normal Males and 46, XY Females with Androgen Resistance, **2002**, P3-190, *84th annual meeting, Endocrine Society*, San Francisco, California
- 49 Holterhus P. M., Hiort O., Demeter J., Brown P. O. and Brooks J. D., 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*, **2003a**; 4 (6), R37
- 50 Holterhus P. M., Hiort O., Deppe U., Brown P. O. and Brooks J. D., Genomic Analysis of Gene Transcription in Partial Androgen Insensitivity Syndrome with Predominantly Male Phenotyp, **2003b**, P018, *47th Annual Meeting of the German Society of Endocrinology (DGE)*, Köln, Germany
- 51 Horton R., Pasupuletti V. and Antonipillai I., Androgen induction of steroid 5 alpha-reductase may be mediated via insulin-like growth factor-I, *Endocrinology*, **1993**; 133 (2), 447-51.
- 52 Horwitz K. B., Jackson T. A., Bain D. L., Richer J. K., Takimoto G. S. and Tung L., Nuclear receptor coactivators and corepressors, *Mol Endocrinol*, **1996**; 10 (10), 1167-77.

- 53 Hughes I. A., Brown J. J., Mongan N. P., Ahmed S. F., Deeb A., Bunch T., Lee Y. S. and Murphy J., Unclassified intersex disorders, **2004**, Oral presentation S 4, *International Symposium Intersex - from Gene to Gender*, Lübeck, Germany
- 54 Iafolla A. K., Mcconkie-Rosell A. and Chen Y. T., VATER and hydrocephalus: distinct syndrome?, *Am J Med Genet*, **1991**; 38 (1), 46-51.
- 55 Jackson R. J., Cytoplasmic regulation of mRNA function: the importance of the 3' untranslated region, *Cell*, **1993**; 74 (1), 9-14.
- 56 Jenster G., Genes of hormone synthesis and hormone action, **2004**, Oral presentation S 7, *International Symposium Intersex - from Gene to Gender*, Lübeck, Germany
- 57 Kalloo N. B., Gearhart J. P. and Barrack E. R., Sexually dimorphic expression of estrogen receptors, but not of androgen receptors in human fetal external genitalia, *J Clin Endocrinol Metab*, **1993**; 77 (3), 692-8.
- 58 Kaufman M., Pinsky L. and Feder-Hollander R., Defective up-regulation of the androgen receptor in human androgen insensitivity, *Nature*, **1981**; 293 (5835), 735-7.
- 59 Kerr J. E., Allore R. J., Beck S. G. and Handa R. J., Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) and AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus, *Endocrinology*, **1995**; 136 (8), 3213-21.
- 60 Kim S., Liu W., Cunha G. R., Russell D. W., Huang H., Shapiro E. and Baskin L. S., Expression of the androgen receptor and 5alpha-reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra, *Cell Tissue Res*, **2002**; 307 (2), 145-53.
- 61 Lammer E. J., Cordero J. F. and Khoury M. J., Exogenous sex hormone exposure and the risk for VACTERL association, *Teratology*, **1986**; 34 (2), 165-9.
- 62 Lee H. J., Mowszowicz I. I. and Chang C., The first detection of complete androgen insensitivity with no mutation in the coding sequence of the androgen receptor gene, *Front Biosci*, **1996**; 1 a34-8.
- 63 Levine A. C., Wang J. P., Ren M., Eliashvili E., Russell D. W. and Kirschenbaum A., Immunohistochemical localization of steroid 5 alpha-reductase 2 in the human male fetal reproductive tract and adult prostate, *J Clin Endocrinol Metab*, **1996**; 81 (1), 384-9.
- 64 Lim H. N., Chen H., McBride S., Dunning A. M., Nixon R. M., Hughes I. A. and Hawkins J. R., Longer polyglutamine tracts in the androgen receptor

- are associated with moderate to severe undermasculinized genitalia in XY males, *Hum Mol Genet*, **2000**; 9 (5), 829-34
- 65 Marcelli M., Tilley W. D., Zoppi S., Griffin J. E., Wilson J. D. and McPhaul M. J., Androgen resistance associated with a mutation of the androgen receptor at amino acid 772 (Arg----Cys) results from a combination of decreased messenger ribonucleic acid levels and impairment of receptor function, *J Clin Endocrinol Metab*, **1991**; 73 (2), 318-25.
- 66 Mizokami A. and Chang C., Induction of translation by the 5'-untranslated region of human androgen receptor mRNA, *J Biol Chem*, **1994a**; 269 (41), 25655-9.
- 67 Mizokami A., Yeh S. Y. and Chang C., Identification of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element and other cis-acting elements in the human androgen receptor gene promoter, *Mol Endocrinol*, **1994b**; 8 (1), 77-88.
- 68 Moghrabi N., Hughes I. A., Dunaif A. and Andersson S., Deleterious missense mutations and silent polymorphism in the human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 gene (HSD17B3), *J Clin Endocrinol Metab*, **1998**; 83 (8), 2855-60
- 69 Nazareth L. V. and Weigel N. L., Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway, *J Biol Chem*, **1996**; 271 (33), 19900-7.
- 70 Nirde P., Georget V., Terouanne B., Galifer R. B., Belon C. and Sultan C., Quantitation of androgen receptor messenger RNA from genital skin fibroblasts by reverse transcription--competitive polymerase chain reaction, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **1998**; 66 (1-2), 35-43.
- 71 Nitsche E. M., Moquin A., Adams P. S., Guenette R. S., Lakins J. N., Sinnecker G. H., Kruse K. and Tenniswood M. P., Differential display RT PCR of total RNA from human foreskin fibroblasts for investigation of androgen-dependent gene expression, *Am J Med Genet*, **1996**; 63 (1), 231-8.
- 72 Pinsky L., Kaufman M., Straisfeld C., Zilahi B. and Hall C. S., 5alpha-reductase activity of genital and nongenital skin fibroblasts from patients with 5alpha-reductase deficiency, androgen insensitivity, or unknown forms of male pseudohermaphroditism, *Am J Med Genet*, **1978**; 1 (4), 407-16
- 73 Price T., Aitken J. and Simpson E. R., Relative expression of aromatase cytochrome P450 in human fetal tissues as determined by competitive polymerase chain reaction amplification, *J Clin Endocrinol Metab*, **1992**; 74 (4), 879-83.

- 74 Quarmby V. E., Yarbrough W. G., Lubahn D. B., French F. S. and Wilson E. M., Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid, *Mol Endocrinol*, **1990**; 4 (1), 22-8.
- 75 Rahman M. M., Miyamoto H., Lardy H. and Chang C., Inactivation of androgen receptor coregulator ARA55 inhibits androgen receptor activity and agonist effect of antiandrogens in prostate cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**; 100 (9), 5124-9
- 76 Reyes F. I., Boroditsky R. S., Winter J. S. and Faiman C., Studies on human sexual development. II. Fetal and maternal serum gonadotropin and sex steroid concentrations, *J Clin Endocrinol Metab*, **1974**; 38 (4), 612-7.
- 77 Robins D. M., Scheller A. and Adler A. J., Specific steroid response from a nonspecific DNA element, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **1994**; 49 (4-6), 251-5.
- 78 Rodien P., Mebarki F., Mowszowicz I., Chaussain J. L., Young J., Morel Y. and Schaison G., Different phenotypes in a family with androgen insensitivity caused by the same M780I point mutation in the androgen receptor gene, *J Clin Endocrinol Metab*, **1996**; 81 (8), 2994-8.
- 79 Roehrborn C. G., Lange J. L., George F. W. and Wilson J. D., Changes in amount and intracellular distribution of androgen receptor in human foreskin as a function of age, *J Clin Invest*, **1987**; 79 (1), 44-7.
- 80 Russell D. W. and Wilson J. D., Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes, *Annu Rev Biochem*, **1994**; 63 25-61
- 81 Sanborn B. M., Caston L. A., Chang C., Liao S., Speller R., Porter L. D. and Ku C. Y., Regulation of androgen receptor mRNA in rat Sertoli and peritubular cells, *Biol Reprod*, **1991**; 45 (4), 634-41.
- 82 Sax L., How common is intersex? a response to Anne Fausto-Sterling, *J Sex Res*, **2002**; 39 (3), 174-8
- 83 Siebert P. D., Quantitative PCR without the Use of Internal Standards, in: Munch Y., Mayo K. and Miller A., *Quantitative PCR: Methods and Applications*, **1993a**, Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, 1. Auflage, 12-16
- 84 Siebert P. D., Competitive PCR, in: Munch Y., Mayo K. and Miller A., *Quantitative PCR: Methods and Applications*, **1993b**, Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, 1. Auflage, 26-42
- 85 Simental J. A., Sar M., Lane M. V., French F. S. and Wilson E. M., Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor, *J Biol Chem*, **1991**; 266 (1), 510-8.

- 86 Sinnecker G. and Kohler S., Sex hormone-binding globulin response to the anabolic steroid stanozolol: evidence for its suitability as a biological androgen sensitivity test, *J Clin Endocrinol Metab*, **1989**; 68 (6), 1195-200.
- 87 Sinnecker G. H., Hiort O., Dibbelt L., Albers N., Dorr H. G., Hauss H., Heinrich U., Hemminghaus M., Hoepffner W., Holder M., Schnabel D. and Kruse K., Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency, *Am J Med Genet*, **1996**; 63 (1), 223-30.
- 88 Sinnecker G. H., Hiort O., Nitsche E. M., Holterhus P. M. and Kruse K., Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group, *Eur J Pediatr*, **1997**; 156 (1), 7-14.
- 89 Soderstrom T. G., Bjelfman C., Brekkan E., Ask B., Egevad L., Norlen B. J. and Rane A., Messenger ribonucleic acid levels of steroid 5 alpha-reductase 2 in human prostate predict the enzyme activity, *J Clin Endocrinol Metab*, **2001**; 86 (2), 855-8
- 90 Song C. S., Jung M. H., Supakar P. C., Chen S., Vellanoweth R. L., Chatterjee B. and Roy A. K., Regulation of androgen action by receptor gene inhibition, *Ann N Y Acad Sci*, **1995**; 761 97-108.
- 91 Sultan C., Balaguer P., Terouanne B., Georget V., Paris F., Jeandel C., Lumbroso S. and Nicolas J., Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation, *Mol Cell Endocrinol*, **2001a**; 178 (1-2), 99-105.
- 92 Sultan C., Paris F., Terouanne B., Balaguer P., Georget V., Poujol N., Jeandel C., Lumbroso S. and Nicolas J. C., Disorders linked to insufficient androgen action in male children, *Hum Reprod Update*, **2001b**; 7 (3), 314-22.
- 93 Takagi S., Yoshida T., Tsubata K., Ozaki H., Fujii T. K., Nomura Y. and Sawada M., Sex differences in fetal gonadotropins and androgens, *J Steroid Biochem*, **1977**; 8 (5), 609-20.
- 94 Takane K. K., Wilson J. D. and McPhaul M. J., Decreased levels of the androgen receptor in the mature rat phallus are associated with decreased levels of androgen receptor messenger ribonucleic acid, *Endocrinology*, **1991**; 129 (2), 1093-100.
- 95 Takane K. K. and McPhaul M. J., Functional analysis of the human androgen receptor promoter, *Mol Cell Endocrinol*, **1996**; 119 (1), 83-93.

- 96 Takeda H., Nakamoto T., Kokontis J., Chodak G. W. and Chang C., Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate: immunohistochemical and in situ hybridization analysis, *Biochem Biophys Res Commun*, **1991**; 177 (1), 488-96.
- 97 Themmen A. P. N. and Huhtaniemi I. T., Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function, *Endocr Rev*, **2000**; 21 (5), 551-83.
- 98 Tilley W. D., Marcelli M., Wilson J. D. and McPhaul M. J., Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1989**; 86 (1), 327-31.
- 99 Tilley W. D., Marcelli M. and McPhaul M. J., Expression of the human androgen receptor gene utilizes a common promoter in diverse human tissues and cell lines, *J Biol Chem*, **1990**; 265 (23), 13776-81.
- 100 Toppari J. and Skakkebaek N. E., Sexual differentiation and environmental endocrine disrupters, *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, **1998**; 12 (1), 143-56.
- 101 Trapman J., Klaassen P., Kuiper G. G., Van Der Korput J. A., Faber P. W., Van Rooij H. C., Geurts Van Kessel A., Voorhorst M. M., Mulder E. and Brinkmann A. O., Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor, *Biochem Biophys Res Commun*, **1988**; 153 (1), 241-8.
- 102 Trapman J., Ris-Stalpers C., Van Der Korput J. A., Kuiper G. G., Faber P. W., Romijn J. C., Mulder E. and Brinkmann A. O., The androgen receptor: functional structure and expression in transplanted human prostate tumors and prostate tumor cell lines, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **1990**; 37 (6), 837-42.
- 103 Twosten W., Holterhus P., Sippell W. G., Morlot M., Schumacher H., Schenk B. and Hiort O., Clinical, endocrine, and molecular genetic findings in patients with 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency, *Horm Res*, **2000**; 53 (1), 26-31
- 104 Varriale B., Autoinduction of androgen receptor mRNA in primary cultures of hamster (*Mesocricetus auratus*) harderian gland cells, *Gen Comp Endocrinol*, **1996**; 102 (3), 386-93.
- 105 Werner R., Holterhus P. M., Struve D., Homburg N. and O. H., The polymorphic glycine-repeat modulates transactivation capacity of the androgen receptor in vitro, **2004**, Oral presentation O 7, *International Symposium Intersex - from Gene to Gender*, Lübeck, Germany

- 106 Wilson J. D., Griffin J. E. and Russell D. W., Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency, *Endocr Rev*, **1993**; 14 (5), 577-93.
- 107 Wiren K. M., Zhang X., Chang C., Keenan E. and Orwoll E. S., Transcriptional up-regulation of the human androgen receptor by androgen in bone cells, *Endocrinology*, **1997**; 138 (6), 2291-300.
- 108 Wolf D. A., Herzinger T., Hermeking H., Blaschke D. and Horz W., Transcriptional and posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen, *Mol Endocrinol*, **1993**; 7 (7), 924-36.
- 109 Wu W. H., Chuang J. H., Ting Y. C., Lee S. Y. and Hsieh C. S., Developmental anomalies and disabilities associated with hypospadias, *J Urol*, **2002**; 168 (1), 229-32.
- 110 Yeh S., Chang H. C., Miyamoto H., Takatera H., Rahman M., Kang H. Y., Thin T. H., Lin H. K. and Chang C., Differential induction of the androgen receptor transcriptional activity by selective androgen receptor coactivators, *Keio J Med*, **1999**; 48 (2), 87-92.
- 111 Yu L., Nagasue N., Makino Y. and Nakamura T., Effect of androgens and their manipulation on cell growth and androgen receptor (AR) levels in AR-positive and -negative human hepatocellular carcinomas, *J Hepatol*, **1995**; 22 (3), 295-302.

8. DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. med. Olaf Hiort bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und Offenheit, sein Interesse am Fortgang der Arbeit sowie für die in jeder Form gewährte Unterstützung.

Besonderes danke ich Herrn Dr. rer. nat. Olaf José Hellwinkel, unter dessen gewissenhafter Einarbeitung und qualifizierter Betreuung ich im Verlaufe der experimentellen Arbeit sehr viel gelernt habe. Er nahm sich stets Zeit für meine Fragen und hat konstruktive Kritik bei der Abfassung dieser Arbeit geleistet.

Herrn Dr. med. Paul-Martin Holterhus danke ich für die zahlreichen fundierten Anregungen und wertvollen Diskussionen während der Durchführung der Arbeit.

Herzlich danke ich Frau Dagmar Struve und Frau Christine Marschke für ihre freundliche Anleitung und Unterstützung im Labor.

Frau Anke Müller danke ich für die Erlaubnis zur Nutzung der Geräte für Northern Blots.

Frau Nicole Homburg danke ich für die Durchführung des Western Blot.

Herrn PD Dr. Friedrich danke ich für die wertvolle statistische Beratung.

Frau Cornelia Salb danke ich für das Bereitstellen der statistischen Software.

Abschließend danke ich meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung und Sebastian, Anna, Lisbeth und Dirk für das Korrekturlesen der Arbeit.

9. LEBENS LAUF

Persönlich Angaben:

Geburtsdatum/-ort: 26. 10. 1976 in Hamburg
Adresse: Wakenitzmauer 19a
23552 Lübeck
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/83 - 07/96 Grundschole und Gymnasium in Hamburg
02/94 - 05/94 Concordia College, Adelaide, Australien

Studium:

10/96 – Frühjahr 04 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen
Universität Lübeck

08/98 Physikum, Note: gut
08/99 1. Staatsexamen, Note: gut
08/01 - 02/02 Studium an der Universitetet i Bergen, Norwegen
03/03 2. Staatsexamen, Note: gut
Frühjahr 04 3. Staatsexamen

PJ:

Innere Medizin: Westküstenklinikum Heide (2 Monate)
Rockhampton Base Hospital, Australien (2 Monate)
Chirurgie: Hôpital de la Providence, Neuchâtel, Schweiz (2 Monate)
Ngwelezane Hospital, Empangeni, Südafrika (2 Monate)
Anästhesie: Universitätsklinikum S-H, Campus Lübeck (4 Monate)

Tätigkeiten neben dem Studium:

04/98 - 07/01 Extrawache auf verschiedenen Stationen der Med.
Universität Lübeck, zuletzt ein Jahr in der Notaufnahme
10/00 - 02/03 Rettungssanitäterin beim ASB Lübeck

Veröffentlichungen:

Hellwinkel O. J., Bassler J. and Hiort O., Transcription of androgen receptor and 5alpha-reductase II in genital fibroblasts from patients with androgen insensitivity syndrome, J Steroid Biochem Mol Biol, 2000; 75 (4-5), 213-8.

Bassler J., Holterhus P. M. and Hiort O., Escape of 5alpha Reductase II Transcription from Genomic Programming in 17β Hydroxysteroid Dehydrogenase III Deficient Genital Skin Fibroblasts, 47th Annual Meeting of the German Society of Endocrinology (DGE), 2003, Köln, Germany, Poster P010.

Holterhus P. M., Bassler J., Hoppe U., Werner R., Korsch E., Dörr H., Ranke M. B. and Hiort O., Androgen insensitivity syndrome caused by defects of transcription and translation of the androgen receptor in the absence of mutations, *Horm Res*, 2003; 60 (suppl 2) 8; 42nd Annual Meeting of the European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE), Vortrag OR1-25

Bassler J., Holterhus P. M., Hellwinkel O. J. and Hiort O., Androgenresistenz ohne Mutation - Zusammenhang zwischen Phänotyp und Androgenrezeptor-Expression?, 99. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 2003, Bonn, Germany, Vortrag KH 32.05F.

Bassler J., Holterhus P. M., Hellwinkel O. J. and Hiort O., Androgen Insensitivity Syndrome without mutation – Correlation between phenotype and androgen receptor expression?, 1st International Symposium "Intersex – from gene to gender", 2004, Lübeck, Germany, Poster P 14

Holterhus P. M., Hoppe U., Werner R., Bassler J., Korsch E., Ranke M. B., Dörr H. G. and O. Hiort, Androgen insensitivity syndrome caused by defects of transcription and translation of the androgen receptor in the absence of mutations, Paper in Vorbereitung