

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck

Direktor Prof. Dr. med. Egbert Herting

Funktionelle Charakterisierung von Androgenrezeptormutationen

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- AUS DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT -

vorgelegt von

Jenny Schütt
aus Bergen auf Rügen

Lübeck 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Gabriele Gillessen-Kaesbach

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.12.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	2
2.1.	Der humane Androgenrezeptor - Aufbau und Funktionsweise	2
2.2.	Die Androgene und anabole Steroide	6
2.3.	Die Rolle des AR in der humanen Geschlechtsentwicklung	8
2.4.	Pathologien des Androgenrezeptors	10
2.5.	Spezifität der Androgenrezeptor-DNA-Bindung	11
2.6.	Mutationen des Androgenrezeptors	13
2.6.1.	Allgemeines	13
2.6.2.	Die AR-Mutation L712F	16
2.6.3.	Die AR-Mutation M780I	16
2.6.4.	Die AR-Mutation R855H	17
2.6.5.	Die AR-Mutation V866M	17
2.7.	Ziel dieser Arbeit	19
3.	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1.	Material	20
3.1.1.	PBS-Puffer	20
3.1.2.	Hormonelle Stimulation	20
3.1.3.	Plasmide	21
3.2.	Methoden	23
3.2.1.	Glycerinstockkultur	23
3.2.2.	Maxipräparation von Plasmid-DNA	24
3.2.3.	Photometrische Konzentrationsbestimmung gelöster DNA	24
3.2.4.	Enzymatischer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	24
3.2.5.	Agarosegelelektrophorese	25
3.2.6.	Mammaliazellkultur	25
3.2.7.	Transfektion der CHO-Zellen	27
3.2.8.	Hormonelle Stimulation transfizierter Zellen	27
3.2.9.	Transfektionskontrolle über Negativkontrollen und Darstellung der Transfektionseffizienz mit Hilfe des pSV- β -Galactosidase Control Vectors von Promega	28
3.2.10.	Zelllyse und Luciferaseassay	29
3.2.11.	Proteinlysate	29

3.2.12.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
3.2.13.	Elektroblot und Detektion	31
3.2.14.	Mathematisch-statistische Auswertung	32
3.2.15.	Farbkodierte Darstellung der Ergebnisse mittels TreeView	33
4.	ERGEBNISSE	34
4.1.	Die Negativkontrollen	34
4.2.	Optimierung der Transfektionseffizienz mit dem pSV- β -Galactosidase Control Vector	36
4.3.	Expression der AR-Konstrukte in CHO-Zellen.....	36
4.4.	Transaktivierung an den Reportergen MMTV-Luc, (ARE) ₂ TATA-Luc und GRE-Oct-Luc.....	37
4.4.1.	Das MMTV-Luc-Reportergen.....	38
4.4.2.	Das (ARE) ₂ TATA-Luc-Reportergen.....	40
4.4.3.	Das GRE-Oct-Luc-Reportergen	42
4.5.	Dose Response Kurven.....	44
4.6.	Die Aktivierungsprofile der AR-Mutationen	46
5.	DISKUSSION	49
5.1.	Der Androgenrezeptor	49
5.2.	Die AR-DNA-Bindung.....	56
5.3.	Der Androgenrezeptor und die Liganden	57
5.4.	Das Zellkulturmodell – Möglichkeiten und Grenzen.....	59
5.5.	Ausblick.....	62
6.	LITERATUR.....	65
7.	ANHANG	81
7.1.	LEBENS LAUF.....	81
7.2.	DANKSAGUNG	82
7.3.	ERKLÄRUNG	83
7.4.	TABELLEN UND ORIGINALDATEN	84

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

17 β -HSD	17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
A	Androstendion
AF	activation function
AIS	Androgeninsensitivitätssyndrom
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AR	Androgenrezeptor
ARE	androgenresponsibles Element
AS	Aminosäure/n
AU	activation unit (Aktivierungseinheit)
B _{Max}	maximale Bindungskapazität
bp	Basenpaare
C	Kohlenstoff
CAIS	komplettes Androgeninsensitivitätssyndrom
CHO	chinesische Hamsterovarien (chinese hamster ovary)
DBD	DNA-Bindungs-Domäne
DCC	dextrane coated charcoal
DEO	Desoxycholat
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	desoxyribonucleic acid = Desocytiribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	DL-Dithiothreitol
E	Glutamat
E2	Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Phenylalanin
FCS	fetal calv serum = fetales Kälberserum
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
G	Glycin
GH	growth hormone (Wachstumshormon)
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon (Gonadotropin freisetzendes Hormon)
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	glukokortikoidresponsibles Element

H	Histidin
hAR	humaner Androgenrezeptor
hCG	humanes Choriongonadotropin
hsp/HSP	Hitzeschockprotein
HRE	hormonresponsibles Element
HRR	hormonresponsibile Region
HRU	hormone responsive unit
I	Isoleucin
kbp	Kilobasenpaare
K _D	Dissoziationskonstante
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
L	Leucin
LB	Luria Bertani
LB-Medium	komplexes Standardmedium nach Luria Bertani
LBD	ligand binding domain (Ligandenbindungsdomäne)
LH	Luteinisierendes Hormon
Luc	Luziferase
M	Methionin
MAIS	minimales Androgeninsensitivitätssyndrom
mM	Millimol
MMTV	mouse mammary tumor virus
MR	Mineralokortikoidrezeptor
NLS	nuclear localization signal (Kernlokalisationssignal)
nM	Nanomol
NTD	N-terminale Domäne
Oct	Octamer
PAIS	partiellles Androgeninsensitivitätssyndrom
PB	Probasin
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepuffertes Salzlösung)
PEM	purine homoeobox like (der Purin-Homöobox gleich)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Progesteronrezeptor
PRE	progesteronresponsibles Element
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)

R	Arginin
RAR	Retinonsäurerezeptor
RLU	relativ luciferase units (relative Luziferaseeinheiten)
RXR	Retinonsäurerezeptor
S	Stanozolol
S	Serin
SARM	selektive Androgenrezeptor-Modulatoren
SBMA	spinale und bulbäre Muskelatrophie
SC	sekretorische Komponenten
SDS	sodium lauryl sulphate (Natriumdodecylsulfat)
slp	sex limited protein
SRX	sex determining region Y (geschlechtsdeterminierende Region des Y-Chromosoms)
T	Testosteron
TAF	transactivation function (Transaktivierungsfunktion)
TATA	DNA-Sequenz, welche mehrfach Thymin und Adenin enthält
TAU	transactivation unit (Transaktivierungseinheit)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TR	Thyroidrezeptor
Tris	1,2-Bis(dimethylamino)ethan
V	Valin
VDR	Vitamin D Receptor (Vitamin D Rezeptor)
WT	wildtype (Wildtyp)

1. ZUSAMMENFASSUNG

In Deutschland werden zwei von 10.000 Neugeborenen je Jahr mit einem uneindeutigen Genitale geboren (Thyen et al., 2006). Die Störung wird auch als „disorder of sex development“ (DSD) bezeichnet. Kennzeichnend ist die fehlende Übereinstimmung von chromosomalem, gonadalem und phänotypischem Geschlecht. Von den vielen möglichen Ursachen wie der kongenitalen Nebennierenrindenhyperplasie, der Gonadendysgenese, Hormonsynthesestörungen, verschiedenen Syndromen wie Klinefelter- oder Ullrich-Turner-Syndrom soll in dieser Arbeit auf das Androgeninsensitivitätssyndrom (AIS) näher eingegangen werden. Dieses ist definiert durch in unterschiedlicher Ausprägung eingeschränkte Androgenansprechbarkeit bei normalen Hoden und Androgenbiosynthese. Die Androgene können auf Grund eines funktionell eingeschränkten Androgenrezeptors (AR), mit dem sie an die DNA binden, nicht zu einer ausreichenden Transkription der nachfolgend auf der DNA kodierten Information führen, was sich in einem reduzierten biologischen Effekt zeigen kann. Ursächlich für die eingeschränkte Funktionstüchtigkeit sind oft Punktmutationen in der Aminosäuresequenz des für die Hormon- oder DNA-Bindungsstelle des AR codierenden Genabschnittes (Nitsche, Hiort, 2000). Für diese Arbeit wurden exemplarisch vier Punktmutationen des ARs, die zu einem Aminosäureaustausch in der Ligandenbindungsdomäne (LBD) geführt haben, im Vergleich zum AR-Wildtyp bezüglich ihres Aktivierungspotentials untersucht. Es handelte sich um L712F, M780I, R855H und V866M. Die mit diesen Mutationen korrelierenden Phänotypen sind bekannt: L712F, M780I und R855H führen in der überwiegenden Zahl der Fälle zu einem partiellen AIS (PAIS), V866M dagegen bewirkt meistens ein komplettes AIS (CAIS). Der Frage, wie es zu den unterschiedlichen klinischen Bildern kommen kann, sollte hier nachgegangen werden.

CHO-Zellen wurden transient mit einer Mutation des ARs sowie mit einem Promotorplasmid, welches mit der Information für eine Luciferase gekoppelt war, transfiziert. Es schloss sich die Inkubation mit einem von vier Hormonen (Testosteron, Dihydrotestosteron, Androstendion und Stanozolol) an. Die Luciferaseaktivität galt als indirektes Maß der Aktivität des AR-Konstruktes. Es zeigten sich für jede Mutation spezifische Aktivierungsprofile, die abhängig vom Promotor und dem verwandten Liganden waren. Eine Erklärung für die mutationsspezifischen Muster wurde mit der kristallographisch ermittelten 3D-Struktur des ARs (Sack et al. 2001) diskutiert.

2. EINLEITUNG

2.1. Der humane Androgenrezeptor - Aufbau und Funktionsweise

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein Angehöriger der Familie der Kernrezeptoren (nuclear receptor superfamily) (Jänne et al. 1993, Quigley et al. 1995, Brinkmann AO 2001, Gobinet J et al. 2002). Zu ihr gehören der Glukokortikoidrezeptor (GR), der Mineralokortikoidrezeptor (MR), der Progesteronrezeptor (PR), die Östrogenrezeptoren (ER α , ER β mit mindestens acht Isoformen), die Thyroidhormonrezeptoren (TR α , TR β), der Vitamin-D-Rezeptor (VDR), der Retinonsäurerezeptor (RAR, RXR) und ihnen verwandte Rezeptoren, deren Liganden noch nicht bekannt sind. Alle Rezeptoren wirken als Hormon-Rezeptor-Komplex und interagieren direkt mit der DNA im Zielgenbereich. Bei einer Endorganresistenz gegenüber dem Hormon kann der Rezeptor in Gegenwart des Hormons das Zielgen nicht aktivieren.

Mit dem Glukokortikoid-, Mineralokortikoid-, Östrogen- und Progesteronrezeptor bildet der Androgenrezeptor die Untergruppe der Steroidrezeptoren. Sie wird auch als die dem Glukokortikoidrezeptor ähnliche Gruppe (GR-like) beschrieben. Diese Rezeptoren zeichnen sich untereinander durch die Homologie in ihrer Sequenz und, mit Ausnahme des ER, durch die Regulation der Transkription des Zielgens über ähnliche hormonresponsible Element (HRE) aus (Yen et al. 1997). Aus Sicht der Evolution wird der MR als der älteste Rezeptor beschrieben, ihm folgen GR und PR, der AR weist mit der Annahme von C-19-Verbindungen als physiologische Liganden statt C-21 einen höheren Grad der Abweichung auf (Hu et Funder, 2006).

Die genetische Information für den humanen Androgenrezeptor (hAR) ist in der perizentromeren Region auf dem langen Arm des X-Chromosoms bei Xq11-Xq12 lokalisiert. Sie umfasst über 90 Kilobasenpaare (kbp) genomischer DNA, wovon circa 2760 Basenpaare (bp) die kodierenden Regionen bilden. Die acht kodierenden Exons, sie werden A-H (nach Lubahn et al. 1988) oder 1-8 (nach Tilley, Marcelli et al. 1989) genannt, werden von Introns in der Größenordnung von 0,7 kbp bis über 26 kbp unterbrochen. Exon 1 kodiert die aminoterminal Region (N-terminale Domäne = NTD), Exon 2 und 3 die DNA-bindende Domäne (DBD), das 5'-Ende des Exons 4 kodiert für die hinge-Region mit dem Kernlokalisationssignal (nuclear localization signal = NLS) und das 3'-Ende von Exon 4 kodiert zusammen mit den Exons 5 bis 8 die Ligandenbindungsdomäne (LBD).

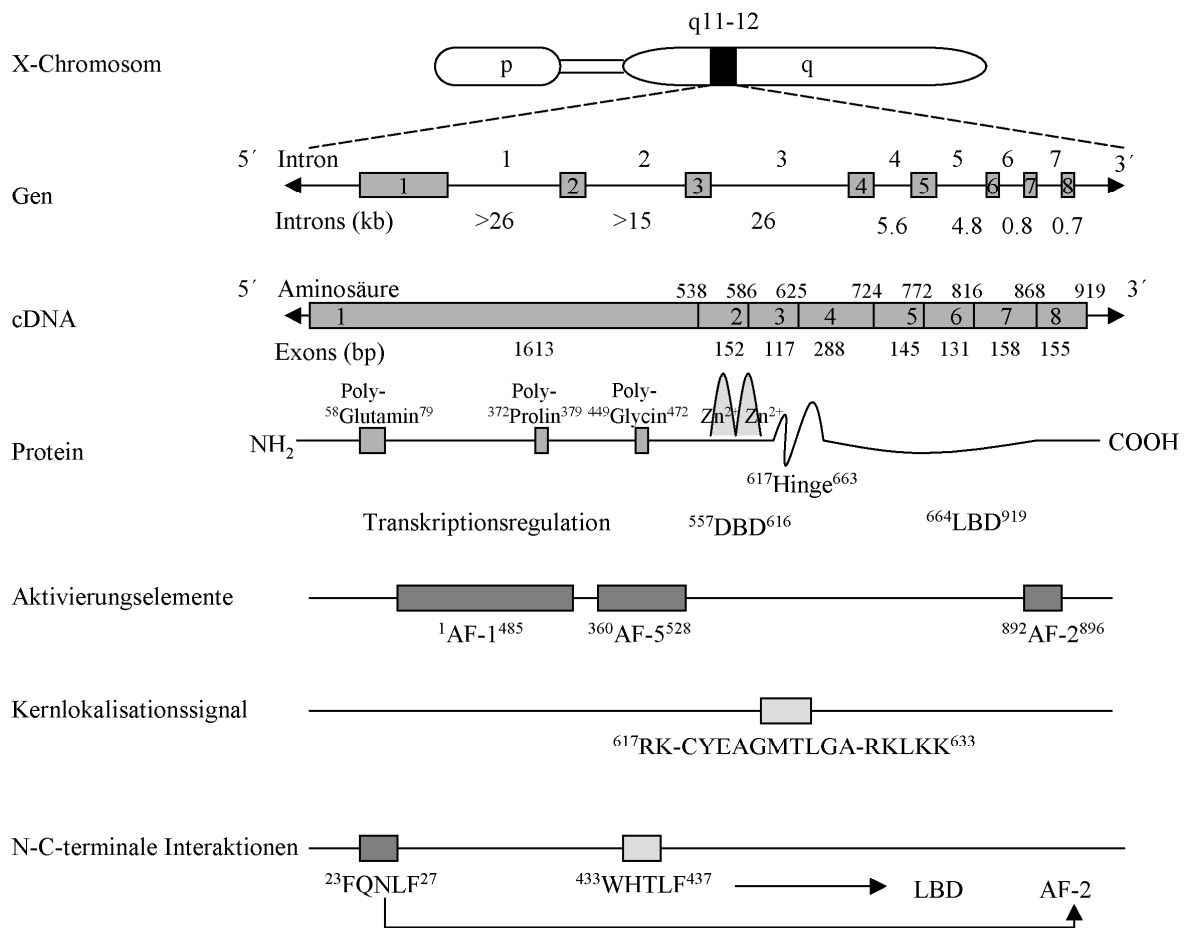


Abbildung 1. Der humane AR

Chromosomale Lokalisation, Struktur, funktionelle Domänen; in Anlehnung an Gottlieb et al. 2004

Die Nummerierung der Aminosäuren in dieser Arbeit folgt mit der Bezeichnung Exon 1 bis 8 der in der Veröffentlichung von Lubahn et al. 1988 verwendeten Nummerierung. Mit 537 Aminosäuren ist das Exon 1 (AS 1 bis 537) des hAR am längsten. Es wird auch als N-terminale Domäne (NTD) bezeichnet. Das Exon 1 weist die geringste Homologie in der Steroidrezeptorfamilie auf und ist sehr größenvariabel. Dem aminoterminalen Ende am nächsten liegt ein polymorphes Glutamin(CAG)wiederholungssegment (AS 58 - 79) gefolgt von einem Prolin(CCN)wiederholungssegment (AS 372 - 379) und einem polymorphen Glycin(GGN)wiederholungssegment (AS 449 - 472). Das Polyglutamin- und das Polyglycinsegment enthalten eine wechselnde Anzahl von Glutamin- bzw. Glycinresten, die zur Längenvarianz des Androgenrezeptors von 910 (Trapman et al. 1988) bis 919 (Lubahn et al. 1988) Aminosäuren führen. Die NTD ist für Transaktivierungsvorgänge von Bedeutung. Jenster (1991; 1995) unterscheidet zwei Transaktivierungseinheiten: AF1 (= TAU1=TAF1) und AF5 (TAU5=TAF5. AF1 erstreckt sich von AS 1-485 mit einem Kern von AS 101-370, welcher 50% der Aktivität zeigt. AF1

wird von der freien LBD blockiert. Nur wenn ein Ligand anwesend ist, kann die AF1 über die Bindung von Cofaktoren die Transkription beeinflussen (Brinkmann 1999, 2001). AF5 umschließt die AS 360-528 mit einem Kern von AS 360-485. Sie ist nur in einem konstitutiven AR (ohne LBD) von Bedeutung, in einem vollständigen AR wird sie unabhängig von der Ligandenanwesenheit von der LBD inhibiert (Brinkmann 1999). Diese Abschnitte des Exons 1 tragen über N-C-terminale Interaktionen zu der dreidimensionalen Struktur des Androgenrezeptors bei und sind über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Transkription des Androgenrezeptors beteiligt.

Exon 2 (AS 539 bis 588) und 3 (AS 589 bis 627) enthalten die DNA-bindende Domäne (AS 556-623 n. Lee 2003) mit zwei zinkbindenden Motiven, die den Zinkfingern ähneln. Jeweils vier Cysteinreste binden ein Zinkion. Sie sind mit näherungsweise 80% Aminosäureidentität die am höchsten konservierten Regionen in der Steroidrezeptorfamilie. Am Fuße des ersten Zinkmoduls liegen drei Aminosäuren, die die umgekehrten Wiederholungen (inverted repeats) der hormonresponsiblen Elemente (HRE) der Zielgene erkennen und mit ihnen interagieren können (Schoenmakers E, 1999, 2000, Brüggewirth 1998). Das zweite Zinkmodul stabilisiert zusammen mit der C-terminalen Verlängerung der DBD (Schoenmakers 2000) diese Interaktion mit der DNA durch Kontakt mit dem Phosphat-Rückgrat der DNA. Es vermittelt die Androgenrezeptordimerisation an der DNA (Truss / Beato 1993) und, mit einem Teil der hinge-Region, die Erkennung der androgenrezeptorspezifischen direkten Wiederholungen (direct repeats) an der DNA (Claessens et al. 2001 und 2004; Lee 2003: Zitat Heinlein CA, Chang C). Die DBD hat zudem eine wichtige Funktion in der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren.

Die hinge-Region am 5'-Ende von Exon 4 (AS 628 bis 723) weist eine geringe Homologie unter den Steroidrezeptoren auf. Sie enthält zusammen mit dem zweiten Zinkmodul das zweiteilige Kernlokalisationssignal (nuclear localization signal = NLS). Das NLS (AS 617-633) besteht aus zwei basischen Motiven, die durch zehn Aminosäuren getrennt werden, RK-CYEAGMTLGA-RKLKK. Es wird durch die freie LBD maskiert (Zhou 1994). Es ist für den Transport des Androgenrezeptors vom Cytoplasma an seinen Wirkungsort im Zellkern notwendig, da der AR für die Diffusion durch die Kernmembran zu groß ist (Jenster 1993). Deeb et al. (2008) beschrieben zudem reduzierte N/C-terminale

Interaktionen bei Veränderungen der hinge-Region, so dass dieser Region eine wichtige Rolle bei der Regulation zugesprochen werden kann.

Der C-terminale Anteil von Exon 4 und die folgenden Exons 5 (AS 724 bis 771), 6 (AS 772 bis 815), 7 (AS 816 bis 867) und 8 (AS 868 bis 919) beinhalten die Ligandenbindungsdomäne. Sie hat eine Homologie von 50% unter den Steroidrezeptoren. Die Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors ist spezifisch und hochaffin für Androgene. Die Aminosäuren 892 bis 896 bilden das Aktivierungselement 2 (activation function 2 = AF-2), das ligandenabhängig direkt oder indirekt unter Mitwirkung von Cofaktoren mit dem Aminoterminus interagiert (Brinkmann 2001) und zur Aktivierung der Transkription führt (Berrevoets et al. 1998). Die Interaktion der AF-2 mit dem Aminoterminus wird als N-C-terminale Interaktion bezeichnet. Dafür ist das ²³FQNLF²⁷-Motiv des NH₂-Terminus des AR von Bedeutung, welches androgenabhängig an die AF-2 bindet. Das ⁴³³WHTLF⁴³⁷-Motiv des ARs kann eine androgenunabhängige Bindung außerhalb der AF-2 an der LBD eingehen. Beide Verbindungen vermindern die Dissoziation von androgenrezeptorgebundenem Androgen und stabilisieren die von der LBD gebildete α -Helix 12 (He 1999, He 2000). Die Dimerisierung des Androgenrezeptors wird von der LBD mit beeinflusst (Wong 1993).

In Abbildung 2. wird dargestellt, wie Androgene proteingebunden zum Zielgewebe gelangen, dort von dem Carrier dissoziieren und als lipophile Hormone durch die Plasmamembran in die Zelle diffundieren (Kempainen et al. 1992). Intrazellulär liegt der posttranslational phosphorylierte AR (112kDa) (Brinkmann 1999) in einer Konformation mit hoher Affinität zur Androgenbindung vor. Diese wird durch rezeptorassoziierte Proteine, wie die Hitzeschockproteine 90 (hsp90), 70 (hsp70), stabilisiert (Jenster 1993, Fang 1996). Das Androgen verdrängt die Hitzeschockproteine, bewirkt die zweite Phosphorylierung des AR (114kDa) (Brinkmann 1999, 2001) und stabilisiert ihn. Die besetzte Ligandenbindungsdomäne (LBD) hebt die Maskierung des NLS auf. Transaktivierungsdomänen, welche zur Konformationsänderung des ARs führen, werden demaskiert. Es folgt der Transport des ARs in den Kern und seine Dimerisation. Als Homodimer bildet er mit Coaktivatoren, der RNA-Polymerase II und über intermolekulare Interaktionen mit Promotor und Enhancer an der DNA einen Komplex, der an hormonresponsiblen Elementen der Zielgene die Transkription initiiert (Steketee et al. 2002, Shang et al. 2002).

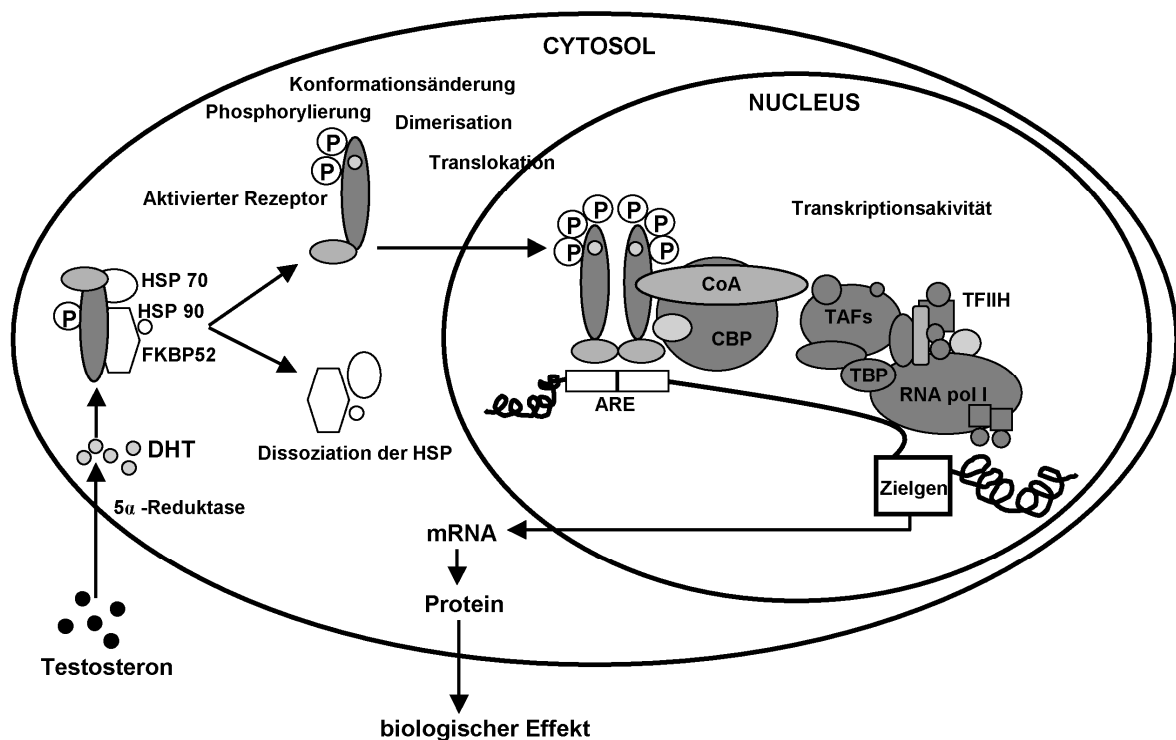


Abbildung 2. Funktion des AR

Testosteron wird in der Zelle über die 5α-Reduktase in DHT umgewandelt, welches die Hitzeschockproteine vom AR verdrängt, an ihn bindet und die zweite Phosphorylierung bewirkt. Der AR ändert seine Konformation, transloziert in den Zellkern, wo er dimerisiert. Als Homodimer bindet er an die ARE der DNA, der Transkriptionskomplex formiert sich und beeinflusst die Transkription und Translation der Ziel-DNA, deren Resultat sich in biologischen Effekten zeigt.

ARE = Androgen responsables Element, CBE = CREB bindendes Protein, HSP = Hitzeschockprotein, RNA pol I = RNA Polymerase I, TAFs = TBP assoziierte Faktoren, TBP = TATA bindendes Protein, TFIIH = Transkriptionsfaktor IIIH in Anlehnung an Sultan et al. 2001 und Hiort und Holterhus 2000.

2.2. Die Androgene und anabole Steroide

Androgen ist die Sammelbezeichnung für die männlichen Sexualhormone. Sie sind C19-Steroidhormone und unterliegen in ihrer Synthese der Kontrolle des Hypothalamus-Hypophysen-Systems. In diesem bewirkt das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) des Hypothalamus die Gonadotropin-Synthese und -Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen. Die Gonadotropine LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) stimulieren in den Leydig'schen Zwischenzellen die Testosteronproduktion und regulieren die Spermio-genese. Die wichtigsten Androgene sind Testosteron (T) und seine Metaboliten Dihydrotestosteron (DHT), Androstendion (A) und Androsteron (s.Abb.2).

Testosteron wird in den Leydig-Zwischenzellen des Hodens, der Nebennierenrinde und in geringen Mengen auch im Ovar synthetisiert. Es stimuliert die Differenzierung des Wolff'schen Ganges während der Embryogenese, die Spermatogenese, das psychosexuelle Verhalten, die Entwicklung der Muskulatur und der Primär- und Sekundärbehaarung sowie den Stimmbruch (Hsiao 2000). Außerdem ist es in der Rückkopplung auf die LH-Produktion wirksam.

DHT wird im Gewebe der Erfolgsorgane über das Enzym 5 α -Reduktase Typ 2 aus Testosteron gebildet. Seine Affinität zum AR ist zwei- bis dreimal höher als die des Testosterons, es dissoziiert vier- bis fünfmal langsamer vom Rezeptor, stabilisiert diesen und ist ungefähr zehnmal so potent wie Testosteron (Deslypere 1992, Zhou 1995, Hsiao 2000, Liu 2003). Daher besteht die Aufgabe des DHT unter anderem darin, sonst schwache hormonelle Signale in einigen Geweben zu verstärken. Es ist für die Virilisierung des Urogenitalsinus und des externen Genitale während der Embryogenese notwendig sowie für die meisten Virilisierungen während der Pubertät. Im Gegensatz zu Testosteron, welches vielfach in anabole Effekte involviert ist, ist DHT essentiell für androgene Effekte (Hsiao 2000).

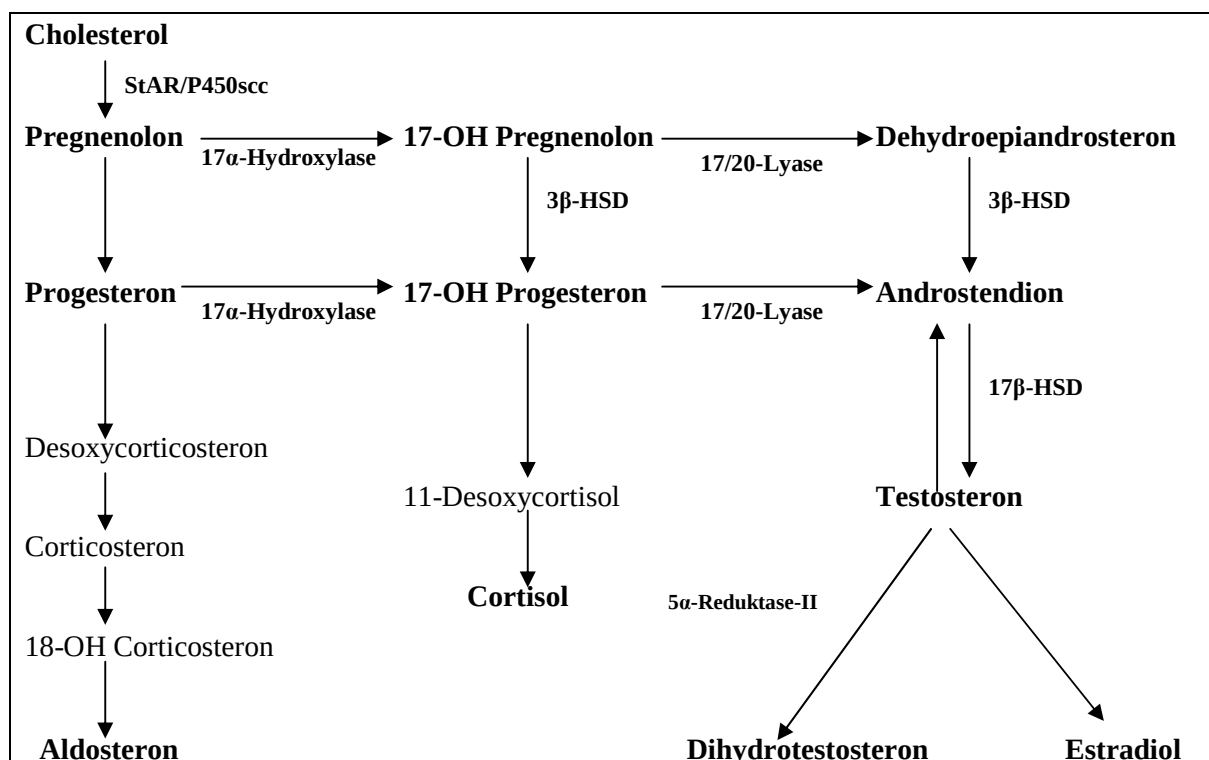


Abbildung 3. Steroidbiosynthese

Androstendion entsteht in der Nebennierenrinde, im Ovar und auch im Hoden aus Dehydroepiandrosteron, welches durch Wirkung der 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3β -HSD) reduziert wird (s. Abb. 3). Testosteron kann andererseits in seinem Zielgewebe über die 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase (17β -HSD) in Androstendion umgewandelt und dadurch inaktiviert werden. Die Blutkonzentration, das androgene Potential und die Affinität des Androstendions zum AR sind deutlich geringer als die des Testosterons und DHTs (Hong 2003). Die Androgene haben über den AR in Papillenzellen der Haut Einfluss auf die Haut und die Haarfollikel und sie können im Knochenmark die Hämatopoese stimulieren (Lee HJ 2003).

Stanozolol ist ein synthetisches anaboles Steroid. Im Stoffwechsel zeichnet es sich durch eine positive Stickstoffbilanz und die Beschleunigung von Wachstumsprozessen aus.

2.3. Die Rolle des AR in der humanen Geschlechtsentwicklung

Der 46, XX- und der 46, XY- Embryo enthalten bipotente Gonadenanlagen, den Wolffschen Gang und den Müllerschen Gang, und ein undifferenziertes äußeres Genitale. Das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein des Y-Chromosoms ist entscheidend für Differenzierung von Testes oder Ovarien und damit für die Festlegung des Geschlechts. Die Differenzierung der Hoden beginnt vor der der Ovarien, weshalb angenommen wird, dass dies ein aktiver Prozess ist. Gonadale Zellen exprimieren in der sechsten Woche den Y-chromosomalen Transkriptionsfaktor SRY (sexdetermining region of Y), welcher mit zahlreichen Cofaktoren die Differentiation der Sertoli-Zellen im Hoden initiiert (Abbildung 4). Die Sertoli-Zellen polarisieren, lagern sich um die Keimzellen an und strukturieren die Gonade in zwei Kompartimente: die Hodenkanälchen mit Keimzellen und Sertoli-Zellen und das Interstitium mit Leydig-Zellen (Brennan J et al. 2004).

Die Sertoli-Zellen produzieren zwischen der sechsten und der achten Woche das Anti-Müller-Hormon (AMH), ein Glykoproteinhormon aus der β -Familie der umwandelnden Wachstumsfaktoren (transforming growth factor β = TGF β). Es führt zur Regression der Müllerschen Derivate und verhindert so die Entwicklung des inneren weiblichen Genitales mit Tuben, Uterus und oberer Vagina.

Ab der neunten Schwangerschaftswoche wird der AR in männlichen und weiblichen Embryonen exprimiert (Hiort et al., 1998).

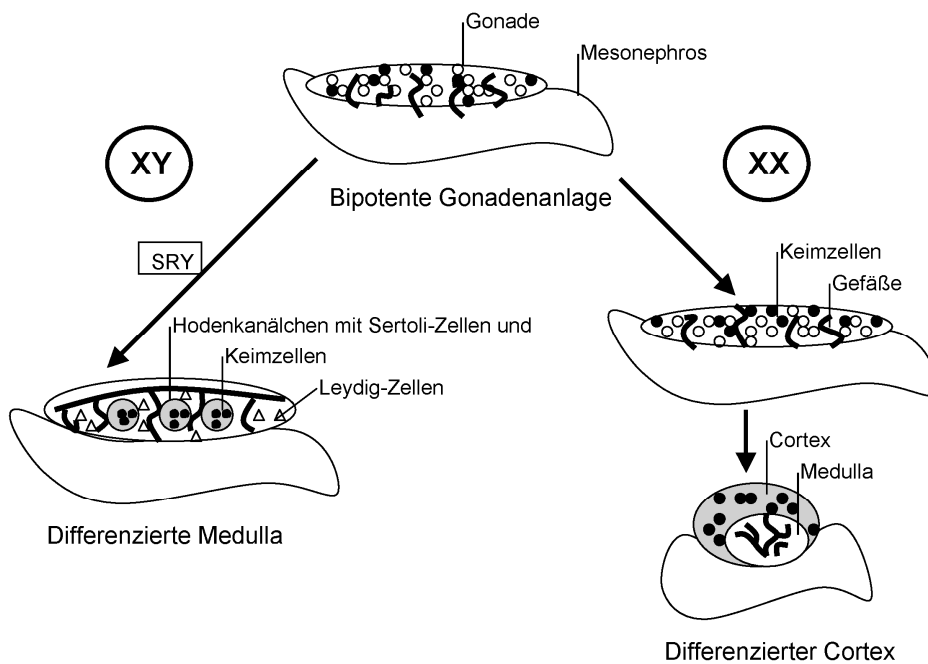


Abbildung 4. Gonadendifferenzierung

Nach Brennan und Capel 2004.

Die Leydig-Zellen beginnen in der achten Woche mit der Testosteronproduktion, die ihren Höhepunkt zwischen der elften und achtzehnten Woche erreicht. Während der Fetalzeit stehen die Leydig-Zellen unter der Kontrolle des mütterlichen humanen Choriongonadotropins (hCG), anschließend unter LH-Kontrolle (Hiort 1998, Hughes et al. 2001). Testosteron stabilisiert den Wolffschen-Gang und induziert zwischen der neunten und der dreizehnten Woche dessen Differenzierung zu Nebenhoden (Epididymes), Samenleiter (Vasa deferentia) und Samenblase (Vesicula seminalis).

Die Virilisierung bedarf in wechselndem Ausmaß der Androgene Testosteron und seines Metaboliten Dihydrotestosteron (DHT). Die interne Maskulinisierung erfordert nur die Anwesenheit von Testosteron für die Aktivierungsvorgänge. In den Geweben wird bis zur dreizehnten Woche keine 5 α -Reduktase Typ 2, welche die Umwandlung von Testosteron zu DHT katalysiert, exprimiert (Wilson et al., 1993). Für die externe Virilisierung (Penis, Skrotum, penile Urethra) und die Entwicklung von Prostata und prostaticem Teil der Urethra ist Dihydrotestosteron notwendig. Das DHT induziert zwischen der neunten und dreizehnten Woche die Ausbildung der Prostata, der Harnröhre, des Penis und des Skrotums. Für die Funktion von Testosteron und Dihydrotestosteron ist ein funktionstüchtiger Androgenrezeptor essentiell. Treten Störungen in der Produktion oder Wirkung der Androgene oder des Rezeptors in dieser Zeit auf, resultiert daraus eine fehlerhafte Maskulinisierung bei 46,XY-Embryonen.

2.4. Pathologien des Androgenrezeptors

Durch die genetische Codierung auf dem X-Chromosom liegt in XY-Individuen nur eine einzige Kopie des ARs im gesamten Genom vor. Auftretende AR-Mutationen führen direkt zu einer veränderten Struktur und Funktion des ARs. Drei Krankheitsbilder werden mit ihnen assoziiert: das Androgeninsensitivitätssyndrom (AIS), die spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA), auch Kennedys disease (Kennedy et al. 1968) genannt, und Prostatakrebs (Brinkmann 1995, Marcelli 2000).

Ursache des AIS sind Androgenrezeptormutationen, welche die Funktionen des ARs mindern, so dass die Entwicklung eines regelhaften 46,XY-Phänotypes nicht möglich ist. Die Mutationen finden sich in allen Exon mit einem gehäuften Vorkommen in Exon 5 und 7 (McPhaul et al. 1993). SBMA tritt in Verbindung mit pathologischen Verlängerungen der Polyglutaminstrecke auf über 40 Wiederholungen in Exon 1 auf (La Spada et al. 1991). Mutationen, die im Zusammenhang mit Prostatakrebs auftreten, sind selten und oft somatischer Art (Marcelli 2000). Sie werden in allen Exons beobachtet, jedoch eher als ein Epiphänomen in neoplastischem Gewebe gewertet (Quigley 1995).

Beim AIS werden das komplette (CAIS), das partielle (PAIS) und das minimale Androgeninsensitivitätssyndrom (MAIS) unterschieden. Menschen mit CAIS haben eine schwere Virilisierungsstörung, die mit einer komplett weiblichen Entwicklung des externen Genitale, primärer Amenorrhoe, blind endender Vagina, fehlendem Uterus, Hoden in den Leistenregionen, Brustentwicklung in der Pubertät und spärlicher bis fehlender sekundärer Körperbehaarung einhergeht. Diese Störung tritt nur aufgrund von Mutationen im Androgenrezeptorgen auf (Batch et al., 1992). Der Phänotyp bei partiellem Androgeninsensitivitätssyndrom reicht von männlich bis weiblich mit sämtlichen Zwischenstufen. Das weibliche Genitale kann leichte Virilisierungszeichen wie Klitoromegalie und fusionierte Labien aufweisen. Bei einem phänotypisch eher männlichen Genital finden sich oft Kryptorchidismus, ein Micropenis und eine Hypospadie. Es wird angenommen, dass ungeklärte Infertilität und Gynäkomastie bei ansonsten normalem männlichen Phänotyp minimale Manifestationen des AIS (=MAIS) seien (Batch et al., 1992). Die Phänotyp-Variationen bei MAIS können so dezent sein, dass sie das ganze Leben lang unentdeckt bleiben (Galli-Tsinopoulou et al. 2003). Zur klinischen Charakterisierung der verschiedenen Phänotypen wird sich der Einteilung in fünf Grade nach Sinnecker et al. 1997 bedient (s. Abb. 5).

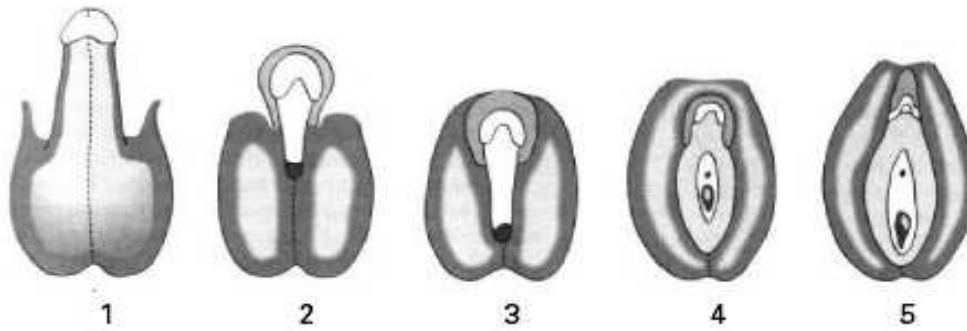


Abbildung 5. Einteilung des AIS in fünf Grade nach Sinnecker et al. (1997)

Grad 1: normale männliche Anatomie, Spermatogenese und / oder Virilisation in der Pubertät beeinträchtigt.

Grad 2: überwiegend männlich, mit isolierter Hypospadie (2a) oder mit Micropenis und zweigeteiltem Skrotum

Grad 3: Genitale nicht eindeutig, Microphallus bzw. Klitoromegalie, Urethralöffnung perineal (3a) oder als Teil des Urogenitalsinus mit kurzer, blind endender Vagina

Grad 4: überwiegend weiblich, Klitoromegalie, teilweise fusionierte Labien, mit Sinus urogenitalis (4a) oder getrennten Öffnungen für Urethra und Vagina (4b)

Grad 5: keine Anzeichen für Virilisierung, mit Scham und/oder Axillarbehaarung (5a); ohne Sekundärbehaarung (5b).

2.5. Spezifität der Androgenrezeptor-DNA-Bindung

Die Mitglieder der Familie der Kernrezeptoren agieren als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren. Sie sind durch die hochkonservierte DBD mit zwei Zinkfingern charakterisiert. Die Regulation der Transkription erfolgt über die Bindung an DNA-Response-Elemente. Diese enthalten eine Hexamersequenz, welche als umgekehrte Wiederholung (inverted repeat), direkte Wiederholung (direct repeat), umgestülpte Wiederholung (everted repeat) oder als Monomer angeordnet sein kann. Die Kernrezeptoren werden nach ihrem Dimerisierungsmuster und dem Response-Element, an welches sie binden, in vier Gruppen aufgeteilt (Mangelsdorf 1995, Verrijdt 2003, Ham J et al. 1988). Steroidrezeptoren bilden die Klassen I und II. Der Androgenrezeptor gehört mit dem Glukokortikoid-, Mineralokortikoid- und Progesteronrezeptor in die Klasse I. Sie erkennen an der DNA eine Sequenz in Form einer umgekehrten Wiederholung 5'-AGAACA-3' (Nelson et al. 1999, Haelens et al. 2003).

Der Östrogenrezeptor bildet mit der Sequenz 5'-AGGTCA-3' eine Ausnahme (Nelson et al. 1999) und gehört in die Klasse II. Die Spezifität des Östrogenrezeptors wird durch die sogenannte P-Box, fünf Aminosäuren im ersten Zinkfinger, von denen drei zwischen den Elementen diskriminieren, bedingt.

Die Klasse III - Rezeptoren binden als Homodimere oder als Heterodimere mit dem promiskuen Partner Retinoid-X-Rezeptor in einer Kopf-zu-Schwanz Konfiguration an die

DNA. Die meisten Response-Elemente enthalten die direkte Wiederholung 5'-AGGTCA-3'-Kernregion mit ein bis fünf Basenpaaren zwischen den beiden Halbseiten. Die

Variabilität der Spacerregion bewirkt die Bindungsspezifität unter den Klasse III-Rezeptoren. Die Rezeptoren mit bisher unbekannten Liganden (orphan receptors) binden entweder als Homodimere an direkte Wiederholungen oder als Monomere an verlängerte Kernsequenzen (extended core sites) 5'-AGGTCA-3', die ihre spezifische Wirkung durch Interaktionen mit flankierenden Sequenzen am 5'-Ende der Sequenz erlangen.

Der Androgenrezeptor kann mit dem zweiten Zinkfinger und der hinge-Region nicht nur an indirekte sondern auch an direkte Wiederholungen an der DNA binden (Claessens et al. 2001 und 2004). Möglich wird dies durch im Vergleich zum GR vier andere Aminosäuren der DBD, die mit einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung eine höhere Affinität zu ungleichen HRE bewirken (Shaffer et al. 2004). Alle spezifischen Androgenrezeptor-Response-Elemente (ARE), wie PB-ARE-2, ein ARE aus der Promotorregion des Probasin (PB)-Gens der Ratte, SC-ARE, ein ARE des ersten Exons des humanen Gens für sekretorische Komponenten (SC), *sc*-ARE1.2, ein ARE in einer weiter C-terminal gelegenen Region des SC-Gens, *slp*-HRE2, ein ARE des sex-limited Proteins (*slp*) der Maus und PEM-ARE-1 und PEM-ARE-2, AREs im proximalen Promotor des murinen *pem*-Homöobox-Gens (siehe Tabelle 1), können (nach Haelens 2003) als direkte Wiederholungen angesehen werden. PEM-ARE-1 hat statt der klassischen drei Nukleotide, in welchen Guanin und Cytosin die dominierenden Nukleotide sind (Nelson et al. 1999), zwischen den beiden Halbseiten fünf. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der Androgenrezeptor in seiner DNA-Bindung flexibler ist als die anderen Rezeptoren seiner Klasse. Geordnet nach Androgenspezifität ergibt sich die Reihenfolge: PEM-ARE-1 < PB-ARE-2 < SC-ARE < *sc*-ARE1.2 = *slp*-HRE2. In den beiden Elementen mit höchster Spezifität werden von Haelens et al. (2003) zwei Nukleotide beschrieben, die für diese Spezifität verantwortlich sein sollen. Es handelt sich hier um das Thymidin an Position -4 und das Adenin an Position +2 (5'-NNNTNNnnnnANNNNN-3'). Auch das Guanin an der -3-Position im SC-ARE (5'-AGCAGGctgTGTCCT-3') soll ähnlich wirken. Elemente mit Mutationen an diesen Positionen zeigen eine Abnahme der Androgenspezifität und des direct-repeat-Charakters.

Für den Aktivierungsprozess sind viele AR-regulierte Gene auf zwei kooperierende ARE angewiesen, die synergistisch bezüglich der DNA-Bindungsaffinität, der Hormonsensitivität und der Transkriptionsaktivität wirksam werden (Reid et al. 2001).

Die ersten zwölf Aminosäuren der hinge-Region werden auch als C-terminale Verlängerung (C-terminal-extension = CTE) bezeichnet und werden für eine hohe Affinität des Androgenrezeptors zum spezifischen androgenresponsiblen Element benötigt.

Tabelle 1. Androgensensible Response-Elemente.

Geordnet nach abnehmender Androgenspezifität.

Oligonukleotide	Sequenz
<i>slp</i> -HRE2	5'-tcgagtctg TGG T CA gcc A GT T CT cagag-3'
<i>sc</i> -ARE1.2	5'-tcgagcaaa GGC T CT ttc A GT T CT aggag-3'
SC-ARE	5'-cgcgtgcc AGC A GG ctg TGTCCC tgaagg-3'
PB-ARE-2	5'-agcttaata GGT T CT tgg A GT A CT ttacg-3'
PEM-ARE-1	5'-cgcgttcac AGA T CT cattc TGT T CC cgggg-3'

fett: direct repeats,

schattiert: für Androgenspezifität wichtige Nukleotide

Die das androgenresponsible Element flankierenden Sequenzen haben keinen direkten Einfluss auf die DNA-Bindung, sie beeinflussen jedoch den Androgenrezeptor-Hormon-DNA-Komplex in seiner Funktionalität. Viele ARE sind komplex und überlappen mit anderen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Nach Haelens et al. interagieren Aminosäuren außerhalb der DNA-Bindungsdomäne und des Response-Elementes, was eine Konformationsänderung mit Freilegung eines Angriffspunktes für Coaktivatoren zur Folge hat.

2.6. Mutationen des Androgenrezeptors

2.6.1. Allgemeines

Mitte der siebziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts gab es die ersten Untersuchungen an kultivierten Genitalhautfibroblasten von Patienten mit AIS (Keenan BS 1974, Griffin JE 1976). Funktionelle Untersuchungen an diesen Zellen zeigten Defekte in der Ligandenbindung. Es kam die Vermutung auf, dass dafür Mutationen des Androgenrezeptors verantwortlich sein können. Mit der Klonierung der für den Androgenrezeptor kodierenden cDNA (Chang et al., 1988, Lubahn et al., 1988, Tilley et al., 1989, Trapman et al., 1989, Brown et al., 1989) und der Aufklärung der genetischen Struktur des Rezeptors (Lubahn et al., 1989; Tilley et al., 1989) konnten die den Veränderungen zugrunde liegenden Mutationen charakterisiert werden. Die Detektion der

Punktmutationen erfolgte oft über DNA-Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analysen (Hiort et al.1994).

Mutationen treten in jeder Form und in allen Bereichen des Androgenrezeptors auf. 1992 fanden McPhaul et al. 90% der untersuchten Mutationen bei Ligandenbindungsdefekt in zwei Bereichen, von Aminosäure 726 bis 774 (Exon 5) und von 831 bis 866 (Exon 7) (Weidemann W 1996), welche für 35% der Ligandenbindungsdomäne kodieren. Auch Quigley beschrieb 1995 für 85% der Mutationen des AR die Lokalisation in der Ligandenbindungsdomäne. Das Auftreten von Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne und im N-terminalen Ende mit den Transaktivierungsdomänen ist seltener.

2003 waren über 300 unterschiedliche Mutationen des Androgenrezeptors bekannt (Gottlieb et al. 2004), aktuell sind in der Androgenrezeptordatenbank (androgendb.mcgill.ca) ca. 870 Fälle von insgesamt ungefähr 400 Mutationen dokumentiert. Die Mutation einer einzelnen Base mit resultierender Aminosäuresubstitution, welche die Funktion des Androgenrezeptors verändert, ist die häufigste Erscheinungsform. Sie kann außerdem zu einem vorzeitigen Stopp-Codon oder einer Alteration des mRNA-splicings führen. Diese Funktionsstörungen können neben einem Basenaustausch auch von Deletionen oder Insertionen mit oder ohne Leserasterverschiebung verursacht werden. Ein somatisches Mosaik infolge postzygotischer Mutation zeichnet sich durch ein anteiliges Vorkommen eines funktionstüchtigen Androgenrezeptorwildtyps und daraus resultierender stärkerer Virilisierung aus (Holterhus et al. 1997). Große strukturelle Defekte wie die partielle oder komplette Deletionen des AR-Gens sind selten und machen weniger als 10% der Mutationen aus.

Aminosäuresubstitutionen in der Ligandenbindungsdomäne können über eine veränderte Androgen-Androgenrezeptor-Struktur zu

- einem vollständigen Verlust der Androgenbindung,
- reduzierter Bindungsaffinität,
- reduzierter Bindungskapazität ($B_{\max}$),
- vermehrter Ligandendissoziation (K_D),
- zunehmender Thermolabilität der Bindung,
- einem Verlust der Stabilisation und des Degradationsschutzes des Rezeptors durch gebundenes Androgen (Marcelli 1994),
- einer Beeinträchtigung der N-/C-terminalen Interaktion und/oder
- einer veränderten Steroidspezifität des Androgenrezeptors führen.

Zwischen den Bindungsparametern des Androgenrezeptors und dem Grad der Androgenresistenz und / oder der Mutation des Androgenrezeptorgens bestand keine offensichtliche Beziehung (Weidemann W 1996). Auf der Suche nach Genotyp-Phänotyp-Korrelationen wuchs die Zahl der Mutationen, welche mit differierenden klinischen Bildern und biochemischen Parametern einhergingen. Zu ihnen gehörten unter anderen die Mutationen L712F (Holterhus, 2000), R840H und R855H (McPhaul, 1992), M780I (Rodien et al., 1996).

Eine große Anzahl der Substitutionsmutationen liegt in hochkonservierten Region, also in Bereichen, deren Aminosäuresequenz unter den Steroidrezeptoren eine große Homologie aufweisen. Die Aminosäureidentität der verschiedenen Rezeptoren korreliert direkt mit der Bedeutung der Region für die Rezeptorfunktion. Die Änderung einer solchen Aminosäuresequenz hat häufig ein CAIS aufgrund fehlerhafter Rezeptorfunktion zur Folge.

Nach der Substitution enthält das neue Basentriplett die Information für die neue Aminosäure. Da jede der drei Basen verändert sein kann, ergeben sich mehrere Möglichkeiten für neue Aminosäuren. Für Valin an Position 866 existieren beispielsweise Umwandlungen zu Methionin, Leucin oder Glutamat. Jede Aminosäure besitzt eigene Charakteristika wie Hydrophilie oder enthaltene Schwefelatome. Ähneln sich die ersetzte und die ersetzende Aminosäure in ihren Eigenschaften, wird die Substitution als konservativ bezeichnet, ähneln sie sich nicht, werden sie nicht-konservativ genannt. Je weniger konservativ die Substitution ist, umso schwerer wird die wahrscheinlich resultierende Störung der Androgenrezeptorfunktion. Elhaji et al. (2004) nahmen vergleichende Untersuchungen an den Mutationen R855C (R = Arginin, C = Cystein) und R855H (H = Histidin) vor, die mit komplettem bzw. partiellem AIS assoziiert sind. Arginin bildete an dieser Position vier, Histidin noch eine Wasserstoffbrücke aus. Cystein war zur Bildung einer Wasserstoffbrücke nicht in der Lage. Diese Ergebnisse korrelierten mit den klinischen Bildern der Mutationen.

An den Lokalisationen 774, 831 (Jakubiczka 1997), 840, 855 und 866 ist die Mutationsrate auffallend hoch. Diese Orte werden als mutational hotspots bezeichnet. Nach Quigley wurde 1995 ein Viertel aller Aminosäuresubstitutionen an diesen Stellen gefunden. Sie führen, in Abhängigkeit der Veränderung der Aminosäureeigenschaften durch die Substitution, überdurchschnittlich häufig zu einer Klinik des CAIS.

In vivo sind nicht zuletzt die individuellen Umgebungsbedingungen im Sinne von Hormonkonzentrationen und Transaktivierungsfaktoren mitverantwortlich für die Ausprägung des AIS (siehe auch Tabelle der Androgenrezeptormutationen im Anhang).

2.6.2. Die AR-Mutation L712F

L712F ist eine Punktmutation im Exon vier an der Codon-Position 712 mit Austausch einer Cytosin-Base gegen eine Thymidin-Base und daraus resultierender Substitution der Aminosäure Leucin (CTT) durch Phenylalanin (TTT). Die Umgebung von Codon 712 ist wichtig für die Ligandenbindung und die Aktivierung der Transkription. Bis heute sind vier Individuen mit dieser Mutation bekannt und von Hiort/Holterhus et al. (1996/2000) beschrieben worden. Betroffen sind drei Brüder und deren Onkel, die Mutter der Brüder ist heterozygot für die Mutation. Klinisch präsentieren sich alle mit einem PAIS unterschiedlicher Ausprägung. Im Androgenbindungsassay war bei normaler maximaler Bindungskapazität ($B_{\max}$) die Dissoziationskonstante (K_D) leicht erhöht. Das entspricht einer mäßigen Beeinträchtigung der Ligandenbindungsdomäne des AR. In den Transaktivierungsstudien konnte das partielle Funktionsdefizit der Mutation unter hohen bis supraphysiologischen Hormonkonzentrationen kompensiert werden.

2.6.3. Die AR-Mutation M780I

Die Punktmutation der Guanin-Base im Exon 6 an Position 2702 gegen Adenin hat die Substitution der Aminosäure Methionin durch Isoleucin zur Folge. Alle bis jetzt publizierten Fälle mit dieser Mutation sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Die Phänotypen weisen eine größere Varianz als bei der vorbeschriebenen Mutation L712F auf. Die klinischen Bilder reichen von partiellem bis zu komplettem AIS. Rodien et al. (1996) berichteten von drei betroffenen Geschwistern, von denen zwei mit CAIS als Mädchen aufwuchsen, der dritte mit PAIS als Junge. Die Bindungskapazität von Androgenen war bei Untersuchung der Genitalhautfibroblasten bei den Mädchen erniedrigt, beim Jungen normal, die Dissoziationskonstanten lagen im oberen Normbereich bis erhöht, die Messungen der Hormonkonzentrationen (T, E2, LH, FSH) ergaben außer für DHT supranormale Werte. In Ermangelung weiterer differierender Resultate werden hormonelle Einflüsse während der Fetalzeit sowie die Rolle von Transkriptionsfaktoren als Ursache der großen phänotypischen Varianz diskutiert. Das von Bevan et al. (1996) untersuchte M780I-Konstrukt zeigte auch bei hohen Miboleronkonzentrationen (Miboleron = synthetisches anaboles Steroid) nur einen minimalen Anstieg der Transkriptionsaktivierung, die nicht an die Wildtypaktivität heranreicht, wie es mitunter bei anderen Mutationen zu beobachten war. Hier besteht eine deutliche Abhängigkeit von den Umgebungsfaktoren, wie der Glutamin(CAG)-Wiederholungsrate im Exon 1 des AR. Eine M780I-Mutante mit wenigen Glutamin-Wiederholungen ist bei supraphysiologischen

Hormonkonzentrationen signifikant aktiver als der Wildtyp (Jakubiczka, 1999). Das klärt jedoch noch nicht den von Rodien beschriebenen Fall, da die Geschwister alle ein identisches AR-Gen aufweisen.

2.6.4. Die AR-Mutation R855H

Erstbeschreiber der Mutation R855H im Exon 7 waren Chang et al. (1991, 73rd Endo Soc Meeting Abstr. 28). Batch et al. (Hum Mol Genetics, 1992) beschreiben die gleiche R855H Mutation mit männlichem Phänotyp mit perineoscrotaler Hypospadie, Micropenis und Kryptorchidismus mit einer verminderten Bindungskapazität für Androgene und über der Norm liegenden Werten für die Dissoziationskonstante und die Thermolabilität. Bevan et al. (1996) konnten diese Klinik und die veränderten Eigenschaften bis auf die Bindungskapazität, die sich bei ihnen normal zeigte, für die von ihnen untersuchte R885H-Mutation bestätigen. In den Transaktivierungsassays in COS-Zellen fanden sie ab einer Konzentration von 1 nM Miboleron einen Aktivitätsanstieg bis auf Wildtypniveau. Ahmed et al. (2000) berichten von einer Mutation mit erhöhter Bindungskapazität. Auch Elhaji et al. (Mol Endo 2004) unterzogen eine R855H Mutation einer kinetischen Analyse. Dabei ergaben sich bezüglich der Bindungskapazität Normalwerte, die Dissoziationskonstante war leicht erhöht. Die Mutation zeigte, verglichen mit dem Wildtyp, eine verringerte Transaktivierungsaktivität, als deren Ursache erhöhte Thermolabilität und verminderte N-C-terminalen Interaktionen angenommen wurden. Eine röntgenkristallographische Darstellung der Mutation als vierdimensionales Modell gab weiteren Aufschluss über die gegenüber dem Wildtyp veränderte Konstellation zum Liganden. Statt vier Wasserstoffbrückenbindungen zu L797 und E803 bildet R855H nur eine Wasserstoffbrücke zu S851. Das führt zu einer veränderten Konformation der von der LBD gebildeten Helix 12 bei Ligandenbindung.

2.6.5. Die AR-Mutation V866M

Erstbeschreiber dieser Mutation mit einem Aminosäureaustausch von Valin (GTG) zu Methionin (ATG) an der Position 2958 im Exon 7 sind Lubahn et. al. (1989) und Brown et al. (1990), welche eine verminderte Androgenbindungsaffinität und eine erst bei supraphysiologischen Androgenkonzentrationen nachweisbare Reportergenaktivierung beschreiben. Diese Erkenntnisse werden im Wesentlichen von Kazemi-Esfarjani (1993) und McPhaul (1991) bestätigt und um die These der außerhalb des AR-Gens gelegenen Faktoren bereichert. Weidemann (1996) findet bei V866M normale Werte für

Bindungskapazität und Thermolabilität, jedoch eine deutlich erhöhte Dissoziationskonstante. Der Phänotyp ist normalerweise weiblich.

2.7. Ziel dieser Arbeit

Die einer Mutationen zugeschriebenen Charakteristika in-vitro und in-vivo können divergieren. Viele Mutationen rufen nicht nur einen bestimmten Phänotyp hervor, sondern sind interindividuell mit unterschiedlichen Ausprägungen des AIS korreliert. Es gibt Punktmutationen wie R615H, S703G, M780I, R855H, V866M u.a., die sowohl PAIS als auch CAIS verursachen können (mcgill.ca/androgendb/). Es ist wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Umgebungsbedingungen, Zielgene, Liganden und Ligandenkonzentrationen ursächlich sind. Sie gaben Anlass zu der Hypothese, dass die funktionellen Auswirkungen von Androgenrezeptormutationen nicht ausschließlich mit einer gegenüber dem Wildtyp quantitativ erniedrigten Aktivität gleichgesetzt werden können. Vielmehr sollte in dieser Arbeit experimentell untersucht werden, ob die vier aufgeführten Androgenrezeptormutationen an unterschiedlichen androgenregulierten Zielgenen unter dem Einfluss unterschiedlicher Hormone ein mutationsspezifisches Aktivierungsprofil zeigen. Dieses, und nicht das rein quantitative Ausmaß der Rezeptorinaktivierung an zumeist einzelnen und arbiträr ausgewählten Reportergenen, könnte eine funktionell relevante Erweiterung in der Charakterisierung von AR-Mutanten bei AIS in vitro sein.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- 1.) Führen Mutationen in der LBD des Androgenrezeptors bei Aktivierung strukturell unterschiedlicher Reportergene in Gegenwart unterschiedlicher Liganden zu einer charakteristischen Veränderung der Aktivierungsprofile androgenregulierter Reportergene?
- 2.) Lässt sich dieses Prinzip für ein qualitativ besseres Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Androgenresistenz verwenden?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

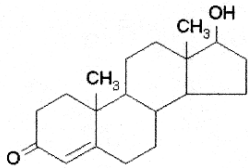
3.1.1. PBS-Puffer

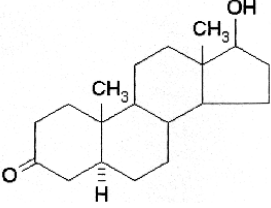
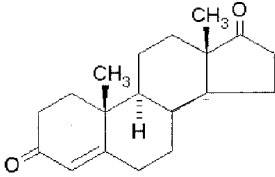
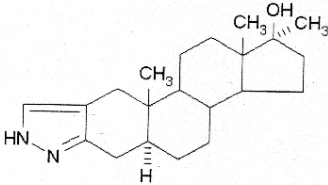
Der PBS-Puffer enthielt 1,6% Natriumchlorid (NaCl), 0,04% Kaliumchlorid (KCl), 0,048% Kaliumdihydrogencarbonat (KH_2PO_4) und 0,58% Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und hatte einen pH-Wert von 7,4. Er fand bei der Mammaliazellkultur, während der Messung der Transfektionseffizienz, bei der Herstellung der Proteinlysate und beim Elektrobplot in Form von PBS-Tween Verwendung. PBS-Tween enthielt zusätzlich 0,1% Tween-20 (Polyoxyethensorbitanmonolaurat von Bio-Rad) und wurde für die Entfernung unspezifischer Bindungen eingesetzt.

3.1.2. Hormonelle Stimulation

Alle Hormone stammten von Sigma-Aldrich, lagen in kristalliner Form vor und lagerten bei Raumtemperatur. Für die Verwendung in den Versuchen wurde mit 96%-igem Ethanol eine einmolare Stammlösung hergestellt, deren Aufbewahrung bei -20°C erfolgte. Mit $\text{DMEM}^{10\%\text{DCC-FCS}}$ wurde daraus eine Verdünnungsreihe von 1 mM bis 10 nM bereitet, welche nach Zugabe zu den Zellen (1:100) die für die Versuche benötigten Hormonkonzentrationen (100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM, 001 nM) ergab.

Tabelle 2. Hormone (in Klammern die Abkürzung) und ihre Eigenschaften.

Hormon (IUPAC-Name)	Molekulargewicht (u)	Eigenschaften
Testosteron (T) (17 β -hydroxy-4-androsten-3-one) 	288,47	virilisierend androgen anabol

Dihydrotestosteron (DHT = D) (17 β -hydroxy-5 α -androst-3-one) 	290,4	virilisierend stark androgen schwach anabol
Androstendion (A) (androst-4-one-3,17-dione) 	286,4	schwach androgen
Stanozolol (S) (17 β -hydroxy-17 α -methylandro[3,2-c]pyrazole) 	328,5	starkes Anabolikum

3.1.3. Plasmide

Das Expressionsplasmid für den Wildtyp-Androgenrezeptor pSVAR0 wurde von A. O. Brinkmann, Erasmus University, Rotterdam, zur Verfügung gestellt.

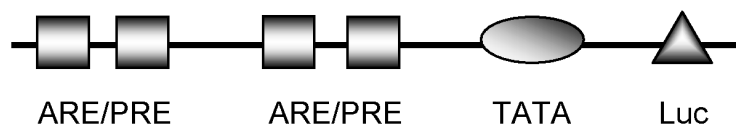
Im Vergleich zum Androgenrezeptorwildtyp wurden vier Mutanten des Androgenrezeptors untersucht. Es waren natürlich vorkommende Mutationen, die bei Patienten mit AIS durch Androgenbindungsuntersuchungen, Analyse der Einzelstrangkonnektionspolymorphismen und DNA-Sequenzierung entdeckt wurden. Alle vier Konstrukte hatten eine Punktmutation mit Basenaustausch in der Ligandenbindungsdomäne (LBD), die sich als ein einzelner Aminosäureaustausch darstellte.

Die Plasmide der Mutationen wurden, basierend auf dem AR0-Plasmid von A. O. Brinkmann, Erasmus University, Rotterdam, generiert (Holterhus 2000, Wieacker 1998).

In den Versuchen kamen pSVAR 712F, pSVAR 780I, pSVAR 855H und pSVAR 866M zum Einsatz.

Es wurde ein für die Firefly-Luciferase kodierendes Reportergen eingesetzt, welches mit drei für Androgene empfänglichen Promotoren kombiniert wurde.

(ARE)₂-TATA-Luc bestand aus zwei androgenresponsiblen Elementen, die von der TATA-Box und dem Luciferasegen gefolgt wurden. Es wurde von G. Jenster, Erasmus University, Rotterdam, zur Verfügung gestellt.

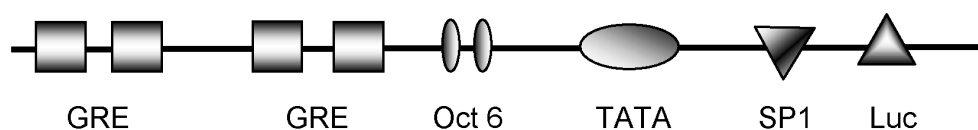


Sequenz: AAG CTT **TGT GTA CAG** GAT **T GTT CTG** CAT GCT CTA GAT **T GTA CAG** GAT **GTT CTG** GTA GCT TGC ATG CCT GCA GGT CGA CTC TAG AGG **GTA TAT** AAT

Abbildung 6. Das (ARE)₂TATA-Luc-Reportergen

Aufbau und Sequenz des (ARE)₂TATA-Luc-Reportergens, die hormonresponsiblen Elemente (HRE) sind dunkelgrau, andere funktionelle Sequenzen sind hellgrau unterlegt.

Das GRE-Oct-Luc Reportergen setzte sich aus zwei glucocorticoidresponsiblen Elementen (GRE), Oct 6, der TATA-Box, einer SP1-site und dem Luciferasegen zusammen. Es stammte von A. O. Brinkmann, Erasmus University, Rotterdam.



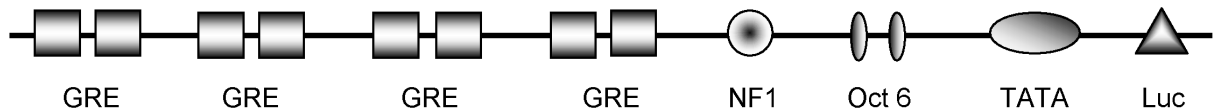
Sequenz(GRE): AAGCT **TGTTAC** AAC **TGTTCT** ATCCCGGGCTAGACCTAGGTAGG-GGATC **AGAACA** GTT **TGTAACCA**

Abbildung 7. Das GRE-Oct-Luc-Reportergen

Aufbau des GRE-Oct-Luc-Reportergens, Sequenz des hormonresponsiblen Anteils des GRE-Oct-Reportergens, HREs sind dunkelgrau unterlegt.

Das von Organon (Organon, West Orange, NJ) bezogene MMTV-Luc Reportergen enthielt vier hormonresponsiblen Elemente (ein unvollständiges Palindrom, ein anomales Palindrom

mit nur zwei separaten Basenpaaren zwischen den Halbseiten und zwei Halbpalindrome), die von einer NF1 Bindungsstelle, zwei Oktamermotiven, der TATA-Box und dem Luciferasegen gefolgt wurden (Truss und Beato 1993).



Sequenz der hormonresponsiblen Elemente (HRE) des MMTV-Luc:
 ATCGTTACAAC**TGTTCT**TAAAACAAGGATGTGAGACAAGTGG-TTTCCTGAG-
 TTGGTTTG**GTATCAAATGTTCT**GATCTGAGCTCTTAG**TGTTCT**ATTTTCCTA**TGT**
TCTTTTGGAACTATCCAAGTCTTATGTAAATGCTTATGTAAAC

Abbildung 8. Das MMTV-Luc-Reportergen

Aufbau und Sequenz des **MMTV-Luc**-Reportergens, dunkelgrau unterlegt: HREs, hellgrau unterlegt: andere funktionelle Domänen des MMTV-Reportergens.

Zur Messung der Transfektionseffizienz wurde das phRG-TK-Plasmid (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), ein konstitutiv exprimiertes, für die Renilla-Luziferase kodierendes Gen, kotransfiziert. Es ist ein für Mammalia-Zell-Systeme optimiertes Plasmid, welches sich durch seine geringe Reaktanz auf unspezifische Stimuli, fehlende Bindungsstellen für bekannte Transkriptionsfaktoren und eine moderate Expression auszeichnete.

Der pSV- β -Galactosidase Control Vector stammte von Promega und wurde zur Überprüfung der Transfektionseffizienz genutzt.

Das Plasmid pTZ19 wurde bei den Negativkontrollen als Carrier-Plasmid eingesetzt, da es nicht für den AR kodiert.

3.2. Methoden

3.2.1. Glycerinstockkultur

Die Plasmid-DNA wurde in *Escherichia coli* DH5 α vermehrt. Für die Aufbewahrung als Glycerinstockkultur wurden 900 μ l *E.coli* in 900 μ l 60%-igem Glycerol (60 ml Glycerol, 40 ml Aqua bidest.) in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2. Maxipräparation von Plasmid-DNA

Plasmide wurden nach dem Protokoll des EndoFree Plasmid Maxi Kits von Qiagen, welches auf einer modifizierten alkalischen Lyse beruht (Birnboim 1979), aufgereinigt. Einer Glycerinstockkultur wurden mit einer Impföse Zellen zum Beimpfen einer Agarplatte entnommen. Zur Herstellung einer Starterkultur wurde von der Agarplatte 24h später eine einzelne Kolonie gepickt und in 20 ml LB_{Amp}-Medium (LB (Luria Bertani) – Medium aus 25 Gelatinekapseln (Q•BIOgene) aufgelöst in 1 l Aqua dest. pH-Wert=7,5 (5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid, 10 g Trypton (alle Q•BIOgene)); für LB_{Amp} 100 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich)) eingimpft. Die Starterkultur stand für sechs Stunden bei 37°C mit ~225 rpm auf dem Rüttler. 0,5 ml der Starterkultur wurden für die Maxikultur in 250 ml LB_{Amp}-Medium überführt und bei 37°C und ~225 rpm über Nacht inkubiert. Um die Zellen ernten zu können, wurde die Maxikultur 20 Minuten bei 4°C mit 6000 x g zentrifugiert. Die enthaltenen Plasmide wurden mit Hilfe des Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kits nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt. Die Maxi-Präparationen der Plasmide lagerten bei –18°C und wurden für die Versuche auf Eis aufgetaut.

3.2.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung gelöster DNA

Die Konzentration der Plasmide wurde mit dem Eppendorf BioPhotometer 6131 bei der OD_{260/280} bestimmt. Die Messung basiert auf der Bradford-Protein-Methode (Bradford MM, 1976), einer quantitativen Proteinmessmethode, bei welcher eine farbstoffgebundene Proteinprobe mit einer Standardkurve bekannter Proteinkonzentration verglichen wird. Die Plasmide wurden im Verhältnis 2:98 mit TE-Puffer (Tris-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer Lösung, BioChemika Ultra über Sigma-Aldrich) verdünnt.

3.2.4. Enzymatischer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Um die Identität der Maxi-Präparationen zu überprüfen, wurden die Plasmide durch Restriktionsendonukleasen (s. Tab. 3) gespalten, auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Die für ein Plasmid möglichen Restriktionsendonukleasen waren den Beschreibungen der Plasmide zu entnehmen. Für den Plasmid-Verdau wurde 1 µg DNA (= Plasmid) mit 10 U der Restriktionsendonuklease und 2 µl eines zur Restriktionsendonuklease passenden 10xPuffers versetzt, mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt und eine Stunde bei der für die jeweilige Restriktionsendonuklease optimalen Temperatur inkubiert.

Tabelle 3. Liste der für die Plasmide verwendeten Restriktionsendonukleasen

Plasmid	Restriktionsendonuklease	Bezugsquelle
pSV-AR0 und Mutationen	Bam H I, Hind III	Gibco/BRL
MMTV-Luc	Pst I	
P(ARE) ₂ -TATA-Luc	Sac I, Hind III	
GRE-Oct-Luc	Sma I, EcoR I	
phRG-TK	Bam H I, Hind III	
pTZ19	Bam H I, Bgl I	

3.2.5. Agarosegelelektrophorese

Die verwendeten Plasmide wurden über Restriktionsendonukleasen linearisiert und auf einem 1%-igen Agarose-TBE-Gel gegen den λ -Hind-III-Molekulargewichtsmarker (Gibco/BRL) mit bekannten Fragmentlängen aufgetragen. Zur Herstellung des Gels wurden 2 g Agarose in 200 ml Tris-Borat-EDTA(=TBE)-Puffer (Stammlösung (10x) aus 54 g Tris, 27,5 g Borsäure und 20 ml 0,5 molarem EDTA, pH-Wert von 8,0) gelöst. Der Loadingbuffer setzte sich aus 30% Glycerol in Wasser und 0,25% einer Bromphenolblaulösung zusammen. Die Elektrophorese wurde mit 10 V je Zentimeter Gellänge durchgeführt. Die Gele wurden anschließend 10 Minuten in 2 μ g/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt, überschüssiges Ethidiumbromid wurde durch ein 10-minütiges Bad in Aqua bi-dist. entfernt. Das Gel wurde auf einem UV-Tisch (UV Transilluminator Hoefer Macro Vue UV 25, Amersham Pharmacia Biotech) unter einer Ultraviolettlampe mit einer Polaroid-DS34-Kamera mit Gelbfilter auf einem Polaroid Polapan-Film (T 667, ISO 3000) abgelichtet.

3.2.6. Mammaliazellkultur

Die Transfektionsversuche wurden an Ovarzellen chinesischer Hamster (chinese hamster ovary cells = CHO) der Linie K1 durchgeführt. Diese waren Subklone einer parentalen CHO-Zelllinie, die ihren Ursprung in einer Ovarbiopsie eines adulten chinesischen Hamsters aus dem Jahr 1957 hat. Die verwendeten Zellen stammten aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

Die CHO-Zellen waren adhärent wachsende fibroblastoide Zellen, die eine zusätzliche Differenzierung durchmachen konnten. Charakterisiert wurden sie weiterhin durch eine Verdopplungszeit von ca. 24h sowie einfache Kulturbedingungen. Sie exprimierten keinen endogenen Androgenrezeptor und waren nicht in der Lage, Testosteron in DHT

umzuwandeln (Thigpen et al. 1993), eine Umwandlung von Androstendion in Testosteron wurde beschrieben (Deslypere 1992), war jedoch auf Grund der enzymatischen Ausstattung der Zellen nicht nachvollziehbar. Für Versuche wurden sie in DMEM^{10%DCC/FCS} bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Die Aufbewahrung erfolgte in 70% DMEM, 20% FCS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich) bei –196°C in flüssigem Stickstoff.

Das Kultur- und Versuchsmedium der CHO-Zellen war DULBECCO's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 Ham (modifiziertes Adlermedium von DULBECCO = DMEM) der Firma Sigma/Aldrich mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) der Firma PAA Laboratories. Für einen Liter DMEM^{10%FCS} wurde die entsprechende Trockenmenge DMEM nutrient mixture F-12 Ham in 1 l Aqua dest. gelöst und mit 1,2 g Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO₃), 10%FCS, sowie 5 ml einer Lösung mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (beide Sigma/Aldrich) versetzt.

Für die Arbeiten mit dem steroidfreien Medium DMEM^{10%DCC/FCS} wurde für das FCS die Kohle-Adsorptionsmethode (DCC = dextran coated charcoal method) angewendet. Für die DCC-Lösung wurden 5 g Aktivkohle Norit A[®] (Serva), 0,5 g Dextran (Sigma-Aldrich) und 200 ml eines 10-millimolaren Tris-HCl-Puffer (Sigma-Aldrich) mit einem pH-Wert von 7,4 über Nacht bei 4°C gerührt, anschließend aliquotiert und bei 4°C und 3000 rpm zehn Minuten lang abzentrifugiert. Jeweils die Hälfte der Kohlepellets wurde nacheinander in 500 ml FCS resuspendiert und zwei Stunden im Eisbad gerührt. Das entstandene DCC-FCS wurde über eine Nutsche von der Kohle getrennt, bei 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert, aliquotiert und bei –20°C gelagert. Zur weiteren Verwendung erfolgte die Erwärmung auf 37°C im Wasserbad.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden die CHO-Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und die 2 ml Zellsuspension in 8 ml DMEM^{10%DCC-FCS} aufgenommen. Nach Zentrifugation kamen die Zellen in 25 ml DMEM^{10%DCC-FCS} wieder in Lösung und wurden in T 175 cm³ Kulturflaschen (Sarstedt) gegeben. Die Anzucht erfolgte bei 37°C und 5%CO₂ bis zu konfluentem Wachstum, 3-4 Tage, im Zellkulturschrank (Heraeus).

Das verbrauchte Medium wurde von den Zellen abgesaugt und sie anschließend zweimal mit 10 ml PBS gespült. 2 ml Trypsin/EDTA (0,5% Trypsin, 0,2% Ethylendiamintetraessigsäure, Gibco/BRL) pro Zellkulturflasche lösten innerhalb von zwei Minuten die adhären Zellen vom Flaschenboden. Durch Zugabe von 8 ml DMEM^{10%DCC-FCS} wurde die Trypsinwirkung beendet. Die Zelllösung wurde bei 900 rpm

(micro rapid, Hettich) zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml DMEM^{10%DCC-FCS} resuspendiert. 20 µl der Suspension dienten, im Verhältnis 1:5 mit Trypanolblau versetzt, zur Ermittlung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer. Es wurde mit einer definierten Zellzahl von 160.000 Zellen pro Milliliter DMEM^{10%DCC-FCS} gearbeitet.

Je 500 µl der Zellsuspension, entsprechend 80.000 Zellen, wurden in ein Loch einer 24-Loch-Platte (Greiner) gegeben. Die so ausplattierten Zellen kamen für 24 h bei 37°C und 5%CO₂ in den Zellkulturschrank.

3.2.7. Transfektion der CHO-Zellen

Die CHO-Zellen wurden nach dem FuGENE-Protokoll (modifiziert nach C. Berrevoets) mit den Plasmiden transfiziert. Der DNA-Mix enthielt für ein Well 30 ng eines Androgenrezeptorplasmides (entweder den Wildtyp oder eine der Mutationen), 200 ng eines Reporterplasmides (MMTV-Luc, (ARE)₂TATA-Luc oder GRE-Oct-Luc) und 5 ng des phRG-TK-Plasmides. Pro Loch der 24-Loch Platte wurden 0,5 µl FuGENE in 100 µl serum- und antibiotikafreiem Medium inkubiert und auf den DNA-Mix gegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 100 µl dieses Ansatzes in ein Well getropft. Die Platten wurden geschwenkt und kamen bei 5%CO₂ und 37°C in den Zellkulturschrank. Nach den fünf Stunden wurden die Zellen hormonell stimuliert.

3.2.8. Hormonelle Stimulation transfizierter Zellen

Die verwendeten Hormone Testosteron, Dihydrotestosteron, Stanozolol und Androstendion waren alle in 96% Ethanol gelöst und lagen in den Ausgangskonzentrationen 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM und 1 mM vor. Sie wurden 1:100 mit DMEM^{10%DCC/FCS} verdünnt, die Zugabe zu den Wells ging mit einer nochmaligen Verdünnung von 1:100 einher, so dass die Endkonzentrationen in den Wells 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, 1,0 nM, 10 nM und 100 nM betrugen. Zusätzlich wurde für jede Plasmidkombination der Basalwert mit dem äquivalenten Volumen an Ethanol bestimmt. Die Inkubation der Hormone dauerte 18h bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank. Die Aktivität des Androgenrezeptorwildtyps bei Zugabe von 10 nM DHT wurde als Standardwert ermittelt und als „1“ gesetzt. Die einem Versuch zugehörigen Werte wurden über den Standardwert normalisiert. Das ermöglichte die versuchsübergreifende Auswertung der Ergebnisse.

3.2.9. Transfektionskontrolle über Negativkontrollen und Darstellung der Transfektionseffizienz mit Hilfe des pSV- β -Galactosidase Control Vectors von Promega

Um eine androgenrezeptorunabhängige Aktivierung der Reportergene auszuschließen, wurden Negativkontrollen ohne das Androgenrezeptorplasmid durchgeführt. Im Versuchsaufbau ersetzte das Plasmid pTZ19 das Androgenrezeptorplasmid. Für die Positivkontrolle wurden 30 ng pSVAR0, 170 ng pTZ19 und 50 ng eines Reportergenplasmides (MMTV-Luc, (ARE)₂TATA-Luc oder GRE-Oct-Luc) transfiziert, für die Negativkontrolle wurden neben 50 ng Reportergenplasmid 200 ng pTZ19 transfiziert. Die Negativkontrollen wurden für jedes Reportergen mit jedem Hormon in einer Konzentration von 100 nM durchgeführt.

Der pSV- β -Galactosidase Control Vector ist ein positiver Kontrollvektor für das Monitoring der Transfektionseffizienz in Säugetierzellen. In dem hier beschriebenen Versuch wurde er mit dem Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galactosid) für die histochemische *in-situ* Analyse genutzt. Zellen, die mit dem pSV- β -Galactosidase Control Vector transfiziert wurden, bildeten das Enzym β -Galactosidase, welches einen Galactoserest vom Substrat X-Gal spaltete, wodurch ein blauer Indigofarbstoff freigesetzt wurde. Transfizierte Zellen erschienen blau.

Die Transfektion wurde entsprechend des FUGENE-Protokolls mit 100 ng, 200 ng und 500 ng des pSV- β -Galactosidase Control Vectors durchgeführt. Als Negativkontrolle, um eine endogene β -Galaktosidaseproduktion oder die Produktion von Isoenzymen durch die Zellen ausschließen zu können, blieben einige Wells mit Zellen untransfiziert. Das Anfärben der Zellen mit X-Gal begann 24h nach der Transfektion mit zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS. Anschließend wurden die Zellen durch 15-minütige Inkubation mit Glutaraldehyd (0,25%-ig in PBS; 200 μ l je well) fixiert. Das Glutaraldehyd wurde entfernt und die Wells mit PBS gespült (500 μ l/well, 3x). Die anschließend aufgetragene X-Gal-Lösung war eine sterilfiltrierte PBS-Lösung aus 0,2% X-Gal (Promega), 2 mM MgCl, 5 mM K₄Fe(CN)₆ $\times$ 3 H₂O und 5 mM K₃Fe(CN)₆. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die X-Gal-Lösung entfernt und die Zellen mit PBS überschichtet. Lichtmikroskopisch konnten die blauen Zellen betrachtet und photographiert werden. Um die Transfektionseffizienz zu berechnen, wurden die blaugefärbten Zellen ausgezählt (in % an Gesamtmenge der Zellen).

3.2.10. Zelllyse und Luciferaseassay

Der Messung der Luciferaseaktivität diente das Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System von Promega.

Das Medium wurde von den Zellen entfernt und die Zellen durch 100 µl des Passive Lysis 5x Buffers (PLB, Promega) je Well lysiert. Die Platten standen für 15 Minuten auf dem Rüttler, um optimale Verteilung und Einwirkung des Puffers zu gewährleisten. Anschließend wurden 25 µl des Zelllysates eines jeden Loches zur Messung in je ein Loch einer 96-Loch-Platte (costar 3921, Corning Incorporated, Corning, NY, U.S.A.) gegeben.

Die Messung der Firefly- und Renilla-Luciferaseaktivität erfolgte am Luminometer lucy 3 von anthos. Über dieses Gerät wurden dem Lysat nacheinander zwei Luciferasesubstrate zugeführt. Das Substrat der Firefly-Luciferase war Luciferase Assay Reagent II, Analoges für die Renilla-Luciferase war das Stop & Glo[®] Reagent. Das Stop & Glo[®] Reagent wurde als zweites Substrat zugegeben, da ein darin enthaltener Puffer die Aktivität der Firefly-Luciferase stoppt und die Messung der Renilla-Luciferase-Aktivität ermöglicht. Die durch die Zellen synthetisierten Enzyme Firefly- und Renilla-Luciferase setzten die Substrate unter Entstehung von Lichtblitzen um, welche quantifiziert werden konnten. So konnte jedem Lysat ein Wert für die androgenabhängige, weil an den Promotor gekoppelte, Firefly-Luciferaseaktivität zugewiesen werden, als auch ein Wert, der androgenunabhängig für die Transfektionseffizienz (Renilla-Luciferase) stand.

3.2.11. Proteinlysate

Die Proteinlysate waren Ausgangspunkt des Nachweises der Androgenrezeptorexpression in den CHO-Zellen. Es gab Lysate unterschiedlich transfizierter sowie untransfizierter Zellen.

Zur Gewinnung der Zellproteinlysate wurden 300.000 Zellen in 2,5 ml DMEM^{10%DCC-FCS} pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Über Nacht wuchsen sie bei 37°C und 5%CO₂ im Zellkulturschrank an. Die Zellen wurden mit 1000 ng des (ARE)₂TATA-Luc-Reportergenplasmides, 150 ng eines Androgenrezeptorplasmides (Wildtyp oder Mutation) und 150 ng phRG-TK zur Transfektionskontrolle nach dem FuGENE-Protokoll transfiziert. Für jedes der fünf verwendeten Androgenrezeptorkonstrukte: pSVAR 0, pSVAR L712F, pSVAR M780I, pSVAR R855H und pSVAR V866M wurde die Transfektion durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Versuch ohne Zugabe des Androgenrezeptorplasmids unter gleichen Bedingungen. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Proteinlysate hergestellt. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und diese zweimal mit PBS

gespült. Für den weiteren Versuchsablauf lagerten die Platten auf Eis. Auf jedes Loch kamen 500 µl Lysispuffer A, hergestellt aus 1 ml Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma-Aldrich), 0,5 g DEO (Desoxycholat, Sigma-Aldrich) und 0,08 g SDS (Natriumdodecylsulfat, Fluka) in 100 ml Puffer C (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 10% Glycerol (87%-ig), 10 nM DTT), versetzt mit 10 µl 60 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) 10 µl 50 mM Bacitracin (beide Sigma-Aldrich). Die Zellsuspension wurde mit einem Zellschaber gelöst und auf eine Qia-Shredder-Säule gegeben. Durch die Säule wurde das Lysat durch kurze Zentrifugation in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, welches bei -80°C eingefroren wurde. 10 µl des Lysates wurden vor dem Einfrieren für eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford (Bradford 1976) abgenommen.

3.2.12. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der Separation der Proteinlysate transfizierter und untransfizierter Zellen.

Die Proteinproben wurden auf einem diskontinuierlichen 12%-igen SDS-PA-Gel (Laemmli UK 1970) elektrophoretisch aufgetrennt (Mini-PROTEAN® 3 Cell, Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, beide Bio-Rad, USA).

Die 4%-igen Polyacrylamidsammelgele setzten sich aus 0,71 ml Acrylamid-Rotiphoese (Roth), 1,1 ml Stacking-Puffer, 3,5 ml Aqua dest., 10 µl Temed (= 1,2 Bis(dimethylamino)ethan, Sigma-Aldrich) und 60 µl 10%-igem APS (Sigma-Aldrich) zusammen. Die 12%-igen Polyacrylamidtrenngele enthielten 5,2 ml Acrylamid-Rotiphoese, 2,7 ml Separating-Puffer, 5,0 ml Aqua dest., 10 µl Temed und 28 µl 10%-iges APS.

Der Stacking-Puffer für Polyacrylamidsammelgele enthielt auf 1 l Aqua dest. 75,4 g (=0,625 M) Tris-Puffer (Tris = 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol) und 5 g SDS (Natriumdodecylsulfat von Fluka). Sein pH-Wert betrug 6,8 und er wurde bei 4°C gelagert. Der Separating-Puffer für Polyacrylamidtrenngele enthielt in 1 l Aqua dest. 226 g (=1,875 M) Tris-Puffer und 5 g SDS. Er hatte einen pH-Wert von 8,8 und lagerte bei 4°C.

20 µl des wie oben hergestellten Zelllysates wurden mit dem äquivalenten Volumen des 2x Sample-Puffer nach LAEMMLI (1 l Aqua dest. mit 12,1 g Tris (100 mM) 40 g SDS, 20 mg Bromphenolblau, 236 ml Glycerol (beide Sigma-Aldrich), pH-Wert von 6,8) angereichert mit 10 mM DTT (DL-Dithiothreitol, Sigma-Aldrich) versetzt. Die Proben

wurden drei Minuten bei 100°C denaturiert, zwei Minuten abzentrifugiert und auf Eis gelagert.

Der Molekulargewichtsmarker (RPN-800-Full-Range-Rainbow-Marker, Amersham) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und für eine Minute bei 40°C erwärmt, um eventuelle Präzipitate zu lösen.

Die Taschen in den Gelen wurden zur Entfernung unpolymerisierter Acrylamidreste mittels einer Spritze mit Elektrodenpuffer (10x Elektrodenpuffer ergab sich aus 1 l Aqua dest. mit 30,25 g Tris (=250 mM), 10 g SDS (=1%), 144 g Glycin (=1,92 M) (von Merck), pH-Wert von 8,3 bis 8,9, Lagerung bei 4°C) gespült. Die Beladung der Taschen erfolgt mit 10 µl Marker bzw. 10 µl der Probe je Tasche. Die Laufzeit des Gels betrug 120 Minuten bei 100 V.

3.2.13. Elektrobplot und Detektion

Der Elektrobplot überführte die aufgetrennten Proteinlysate auf eine Membran, die über die Bindung eines Antikörpers auf das Vorkommen einer für den Androgenrezeptor spezifischen Bande untersucht wurde.

Die Proteinbanden wurden in einem Tankbplot-Verfahren (Mini-PROTEAN[®] 3 Cell, Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell, beide Bio-Rad, USA) auf eine Nitrozellulosemembran (Trans-Blot[®] Transfer Medium, 0,2 µm, Bio-Rad, USA) übertragen. Transferpuffer war ein Blottingpuffer, hergestellt aus 10 x Blottingpuffer (250 mM Tris-Puffer, 1,92 M Glycin, 1% SDS) 150 ml Methanol und 1050 ml Aqua dest., der bei 4°C lagerte. Die Laufzeit des Blots betrug 80 Minuten bei 100 V.

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran bei Raumtemperatur trocken in einem geschlossenen Glasbehälter gelagert oder sofort 20 Minuten auf dem Rüttler in PBS-Tween geschwenkt.

Anschließend wurde die Membran über Nacht mit Blockingreagenz (= PBS-Tween mit 5% Magermilchpulver) blockiert. Die feuchte Nitrozellulosemembran wurde in einen oberen Abschnitt, welcher das Protein des Androgenrezeptors enthält und in einen unteren Abschnitt, in welchem das Aktin aufgetrennt wurde, getrennt. 10 µl des Anti-Androgenrezeptor-Antikörpers (Anti-Androgen Receptor, AS 301-320, F39.4.1, BioGenex) wurden in 6 ml Blockingreagenz (1:600) verdünnt und für eine Stunde auf den oberen Membranabschnitt gegeben. Der untere Membranabschnitt wurde mit einer Lösung aus 1 µl Anti-Aktin-Antikörper (Anti-Actin, A-2066, Sigma-Aldrich) und 1 ml Blockingreagenz (1:1000) für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden beide

Membranteile viermal für 15 Minuten mit PBS-Tween (0,1%) gewaschen. Es folgte die Übersichtung und einstündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper. 1 µl des IgG-Peroxidase-Konjugates (Anti-Mouse, NA931V von Amersham, England) wurde für den Androgenrezeptor-Antikörper in 2 ml Blockingreagenz aufgelöst, für den Aktin-Antikörper wurde das IgG-Konjugat (Anti-Rabbit, A 6154, Sigma, U.S.A.) 1:4000 (1 µl in 4 ml) mit Blockingreagenz verdünnt. Nach erneutem Waschen der Membranen mit PBS-Tween (4 x 15 Minuten) wurden die Proteine mit dem Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences) auf einen Hyperfilm (Hyperfilm™ ECL, Amersham, England) detektiert. Nach einer Belichtungszeit von drei Minuten zeigten sich auf dem entwickelten Film die durch Antikörper markierten Banden der Proteine.

3.2.14. Mathematisch-statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Excel-Software von Microsoft® und SigmaStat von SPSS.

Für jede Kombination von Androgenrezeptortypen, Promotoren und Hormonen wurden drei Triplikatansätze, entsprechend neun Einzelwerten, an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

Die androgenabhängige Aktivität der Firefly-Luziferase wurde in Beziehung zur Transfektionseffizienz, die der Renilla-Luziferase-Aktivität entspricht, gesetzt:

$$\text{korrigierte Firefly-Aktivität} = \frac{\text{Aktivität der Firefly-Luziferase}}{\text{Aktivität der Renilla-Luziferase.}}$$

Für jeden Transfektionsansatz wurde die pSVAR0-Aktivität bei Zugabe von 10 nM DHT als Triplikatansatz bestimmt und als 1 bzw. 100% festgelegt. Gegen diesen Wert wurden alle anderen Aktivitäten normalisiert, wodurch interexperimentelle Schwankungen ausgeglichen werden sollten.

$$\text{normalisierte Luziferaseaktivität} = \frac{\text{Aktivität des Konstruktes bei Hormonkonzentration X}}{\text{Mittelwert pSVAR0 bei 10nM DHT.}}$$

Für die Negativkontrollen erfolgte die Berechnung der Induktion.

3.2.15. Farbkodierte Darstellung der Ergebnisse mittels TreeView

Die Transfektionen hatten eine große Menge Informationen im numerischen Format zum Ergebnis. Für diese stellte sich die Frage nach einer Darstellungsweise, welche dem Betrachter schnell einen Überblick ermöglicht.

Mit Unterstützung des Programmes TreeView (Software: rana.lbl.gov) von M. B. Eisen und P. T. Spellman (Eisen et al., 1998), welches ursprünglich in Verbindung mit einer Clusteranalyse für die Verrechnung und graphische Darstellung von Genexpressionsdaten entwickelt wurde, gelang die um den Mittelwert verteilte graphische Darstellung.

Für jede Kombination von Androgenrezeptorwildtyp/-mutation, Reportergen und Hormon bei den Hormonkonzentrationen von 0 nM bis 100 nM wurden die Mittelwerte der relativen Induktionen berechnet. In Abhängigkeit von den Reportergenen wurden die darauf bezogen größeren Werte zunehmend rot und kleineren Werte zunehmend blau dargestellt.

4. ERGEBNISSE

Das Ergebnis-Kapitel stellt die mit den beschriebenen Methoden erhobenen Daten in Text und Bild dar, angefangen mit den Vorversuchen zur Transfektion über die Transfektion selbst bis zur statistischen Auswertung.

4.1. Die Negativkontrollen

Um zu zeigen, dass bei diesem Versuchsaufbau die Reportergene MMTV-Luc, (ARE)₂TATA-Luc und GRE-Oct-Luc nur bei Vorhandensein des ARs aktiv werden und keine anderen Stimuli zu einem Aktivitätsanstieg führen, wurden die Luciferaseaktivitäten in Zellen mit AR (pSVAR0) und ohne AR (pTZ19) nach Zugabe von verschiedenen Steroiden in einer Konzentration von 100 nM miteinander verglichen.

In den Diagrammen der Abbildung 9 sind die Induktionen der Plasmide pSVAR0 und pTZ19 mit den Hormonen R1881, Androstendion, Testosteron, Dihydrotestosteron oder Stanazolol aufgetragen. Es wird dargestellt, um welchen Faktor die Aktivität steigt (= Induktion), wenn ein Hormon hinzugegeben wurde. Die Induktion bei alleiniger Transfektion von dem pTZ19-Plasmid liegt ungefähr bei eins. Das bedeutet, dass sie sich nicht signifikant von der Aktivität der Zellen ohne Hormonzugabe unterscheidet. Am MMTV-Reportergen (Abb.9.A) reicht die Induktion des pTZ19-Plasmides von $0,57 \pm 0,288$ bei Zugabe von R1881 bis zu $1,758 \pm 0,171$ bei Testosteron. Wurden die Zellen mit dem Plasmid des Androgenrezeptorwildtyps pSVAR0 transfiziert, lassen sich Induktionen von $9,613 \pm 2,999$ mit Stanazolol bis $48,664 \pm 23,531$ mit Dihydrotestosteron messen.

Noch eindeutiger sind die Ergebnisse bei Betrachtung des (ARE)₂TATA-Promotors in Abb. 9. B. Die Induktionen des pTZ19 liegen im Bereich von $0,877 \pm 0,084$ (Testosteron) bis $0,997 \pm 0,169$ (Stanazolol), die des Androgenrezeptors von $22,671 \pm 7,322$ (Stanazolol) bis $117,201 \pm 39,046$ (R1881).

Der GRE-Oct-Promotor (Abb.9.C) hat kein großes Aktivierungspotential, was sich vor allem in den niedrigen Induktionen des pSVAR0-Plasmides widerspiegelt. Ohne Expression eines Androgenrezeptors lassen sich Werte von $1,001 \pm 0,104$ (Androstendion) bis $1,23 \pm 0,496$ (DHT) messen, wird ein Androgenrezeptor exprimiert liegen sie im Bereich von $2,092 \pm 0,639$ (Androstendion) bis $4,795 \pm 1,377$ (R1881).

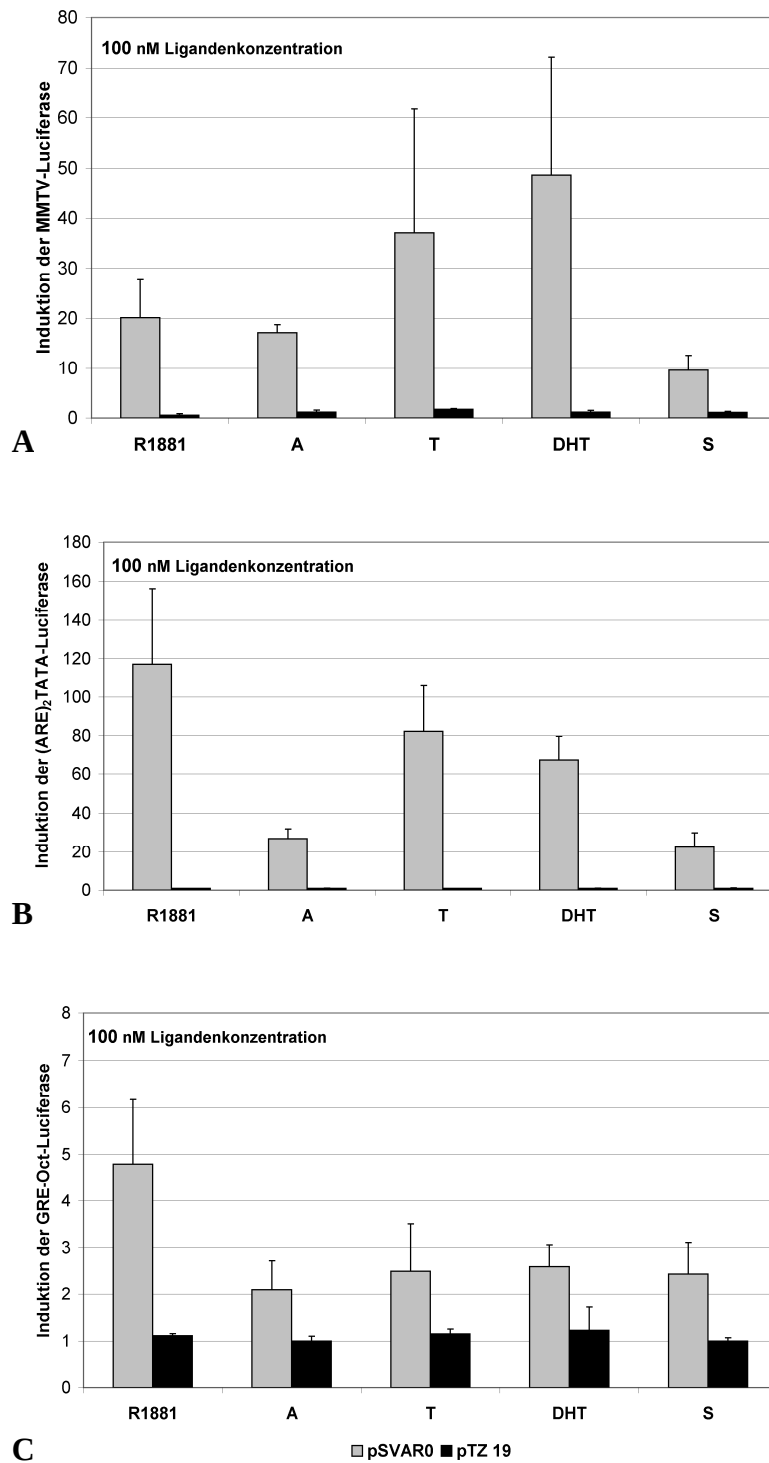


Abbildung 9. Negativkontrollen an den CHO-Zellen

Transfektion der Zellen mit pSVAR0 vs. pTZ19 (s. Legende). Messung der Luciferaseaktivität (y-Achse) vermittelt über drei unterschiedliche Reportergene (MMTV-Luc, (ARE)₂TATA-Luc, GRE-Oct-Luc) unter Zugabe von jeweils 100 nM R1881, A, T, DHT oder S. Auf der Y-Achse ist die Induktion als das Verhältnis von Luciferaseaktivität zur Basalaktivität dargestellt. Die Balken zeigen den Mittelwert eines Triplikatensatzes mit einem Fehlerindikator von einer SD.

4.2. Optimierung der Transfektionseffizienz mit dem pSV- β -Galactosidase Control Vector

Der pSV- β -Galactosidase Control Vector führte in transfizierten CHO-Zellen zur Expression der β -Galactosidase, die aus dem Substrat X-Gal unter Abspaltung eines Galactoserestes einen Indigofarbstoff freisetzte. Die transfizierten, blau erscheinenden Zellen konnten unter einem Mikroskop betrachtet werden. Nach der Transfektion mit 100 ng Plasmid waren 0,4% der Zellen transfiziert (Abb.10.A). Wurden der gleichen Anzahl CHO-Zellen 200 ng Plasmid zugegeben, verschob sich diese Ratio mit 6,25% an der Gesamtzellzahl deutlich zugunsten der transfizierten Zellen (Abb.10.B). 500 ng Androgenrezeptorplasmid transfizierten 14% der CHO-Zellen (Abb.10.C). Das proportional zur Plasmidmenge eingesetzte Transfektionsreagenz führte zunehmend zur Inadhärenz des Zellrasens, so dass die in den Hauptversuchen eingesetzte Plasmidmenge auf 235 ng, für gute Transfektionsraten bei niedriger Zellschädigung, festgesetzt wurde.

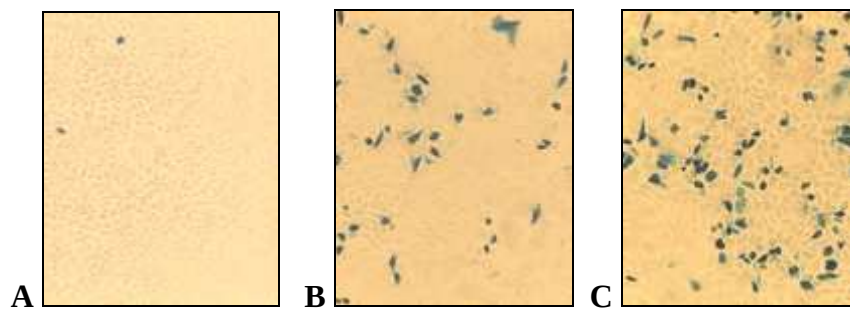


Abbildung 10. Transfektionskontrolle der CHO-Zellen mit dem pSV- β -Galactosidase Control Vector

CHO-Zellen wurden nach dem FuGENE-Protokoll mit 100 ng (A), 200 ng (B) oder 500 ng (C) des pSV- β -Galactosidase Control Vectors transfiziert. Transfizierte Zellen exprimierten das Enzym β -Galactosidase, welches von dem Substrat X-Gal einen Galactoserest abspaltete, wodurch ein Indigofarbstoff freigesetzt wurde, welcher transfizierte Zellen blau erscheinen ließ. Die Anzahl transfizierter blauer Zellen stieg proportional mit der eingesetzten Plasmidmenge. Zum Ausschluss einer endogenen β -Galactosidase-Produktion nicht transfizierte Zellen (Negativkontrolle) ließen keine Blaufärbung erkennen (ohne Abbildung).

4.3. Expression der AR-Konstrukte in CHO-Zellen

Ob und in welcher Größenordnung, in Relation zum WT-AR, die AR-Konstrukte in den CHO-Zellen exprimiert wurden, ließ sich mit dem Westernblot darstellen. Die CHO-Zellen wurden mit dem Plasmid des Androgenrezeptorwildtyp oder einer der Mutationen transfiziert, nach 24 Stunden Inkubation lysiert, im Vergleich zu untransfizierten CHO-

Zellen auf ein Gel aufgetragen, von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und schließlich auf einen Hyperfilm detektiert. In Abbildung 11. ist der Hyperfilm mit AR- und Aktin-Banden nach der Entwicklung zu sehen. Ein mit auf das Gel aufgebracht und geblotteter Molekulargewichtsmarker ermöglichte die Zuordnung der Gelbereiche zu Proteingewichtsklassen.

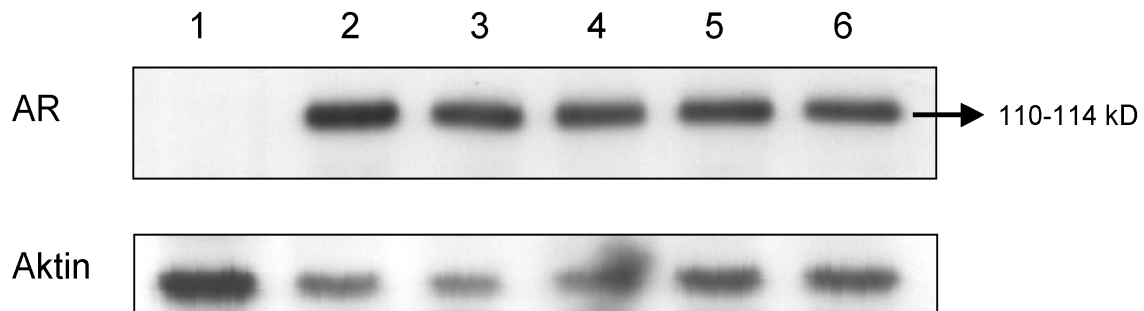


Abbildung 11. Expression der AR-Konstrukte in transfizierten CHO-Zellen vs. nicht-transfizierte CHO-Zellen

Polyacrylamidgelelektrophorese mit nachfolgendem Elektrobplot und Detektion von Proteinlysaten untransfizierter CHO-Zellen (Spalte 1) im Vergleich zu CHO-Zell-Lysaten, die mit pSVAR0 (Spalte 2), L712F (Spalte 3), M780I (Spalte 4), R855H (Spalte 5) oder V866M (Spalte 6) transfiziert wurden. Alle Lysate von mit einem AR-Konstrukt transfizierten Zellen zeigen im Molekulargewichtsbereich des ARs (110 bis 114 kD) eine Bande. Die dazugehörigen Aktinbanden sind wie die AR-Banden relativ gleich stark, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Expression des ARs durch die Mutationen nicht beeinflusst wird.

Im oberen Abschnitt der Abbildung 11. stellen sich Banden mit einem Molekulargewicht zwischen 105 und 160 kD dar. Der Androgenrezeptor hat je nach Phosphorylierungsgrad ein Gewicht von 110 bis 114 kD. Die Lage der Banden entspricht der Lokalisation, an welcher der Androgenrezeptor zu erwarten ist. In den untransfizierten Zellen ist bei diesem Molekulargewicht keine Bande, da kein Androgenrezeptorplasmid transfiziert und kein AR exprimiert wurde. Die Aktinbande im unteren Abschnitt weist Teile des Cytoskelettes nach und ist damit ein zusätzliches Maß für die eingesetzten Proteinmengen. Bei äquivalenten Proteinmengen gleichmäßig ausgeprägte AR-Banden sprechen für eine gleichmäßige, durch die Mutation weitgehend nicht beeinflusste AR-Expression.

4.4. Transaktivierung an den Reportergen MMTV-Luc, (ARE)₂TATA-Luc und GRE-Oct-Luc

Die CHO-Zellen wurden transient mit einem AR-Konstrukt, einem Reportergenplasmid und einem Plasmid zur Kontrolle der Transfektionseffizienz transfiziert. Der daraufhin von den CHO-Zellen exprimierte AR führte nach Hormonzugabe (DHT, T, A, S) an den verschiedenen Reportergen zur Aktivierung der Transkription. Die

Transkriptionsaktivität wurde über die Messung der Luciferaseaktivität ermittelt, die bei allen Hormonen einen konzentrationsabhängigen Anstieg zeigte. Dargestellt sind in den Diagrammen die Daten der Androgenrezeptorkonstrukte nach der Normalisierung. „1“ entspricht der Aktivität des pSVAR0-Konstruktes an dem jeweiligen Promotor bei einer DHT-Konzentration von 10 nM.

4.4.1. Das MMTV-Luc-Reportergen

Bei Einsatz des MMTV-Luc-Reportergens steigt die Aktivität des Androgenrezeptor-wildtypes deutlich früher an als die der Mutationen. Mit DHT (s. Abb. 12.B) liegt der Beginn schon bei 0,01 nM, bei T, A und S bei einer Hormonkonzentration von 0,1 nM. Der Anstieg ist steil, so dass jeweils bei 1 nM die maximale Aktivität erreicht ist, die mit T 110% beträgt und damit über der von DHT liegt. Bei höheren Dosierungen können keine signifikanten Steigerungen beobachtet werden. In Abbildung 12.A ist zu sehen, wie die relative Luciferaseaktivität [RLU] bei 100 nM Testosteron sogar wieder abzunehmen scheint. L712F lässt bei DHT ab 0,1 nM, bei den anderen drei Hormonen ab 1 nM einen Unterschied zur Basalaktivität erkennen. Auch hier folgt eine schnelle Aktivitätszunahme bis zur nächsthöheren Hormonkonzentration. Nimmt die Konzentration weiter zu, stagniert die Aktivität auf dem erreichten Niveau von 40% (A (s. Abb. 12.C) und S (s. Abb. 12.D)) bis 65% (DHT) der pSVAR0-Aktivität. Bei der Mutation M780I finden sich auch die beginnenden Anstiege bei 1,0 nM (T, A) und 0,1 nM (DHT), unter Stanazolol jedoch erst ab 10 nM. Bis 100 nM, bei T bis 10 nM, steigt die Aktivität stetig an. M780I und L712F haben oft ein ähnliches Ausmaß an Aktivität, unter DHT ist M780I mit über 90% der WT-Aktivität deutlich aktiver. R855H weist ab den gleichen Hormonkonzentrationen (bei T, A, S ab 1 nM, bei DHT ab 0,1 nM) wie L712F zunehmende Aktivität auf, die bei T und A bis 100 nM stetig zunimmt. Sie ist die aktivste der Mutationen und übertrifft bei Zugabe von DHT (>105% WT-Aktivität) oder S (110% WT-Aktivität) sogar den AR-Wildtyp. V866M zeigt ein geringes Aktivitätspotential. Bei Einsatz mit Testosteron oder Androstendion führt nur die überphysiologische Konzentration von 100 nM zu von der Basalaktivität verschiedenen RLUs. Das potentere DHT bewirkt dies, wie bei den anderen Mutationen auch, bei der nächstkleineren Hormonkonzentration und steigert diese bei 100 nM auf das Level von L712F mit 60% WT-Aktivität.

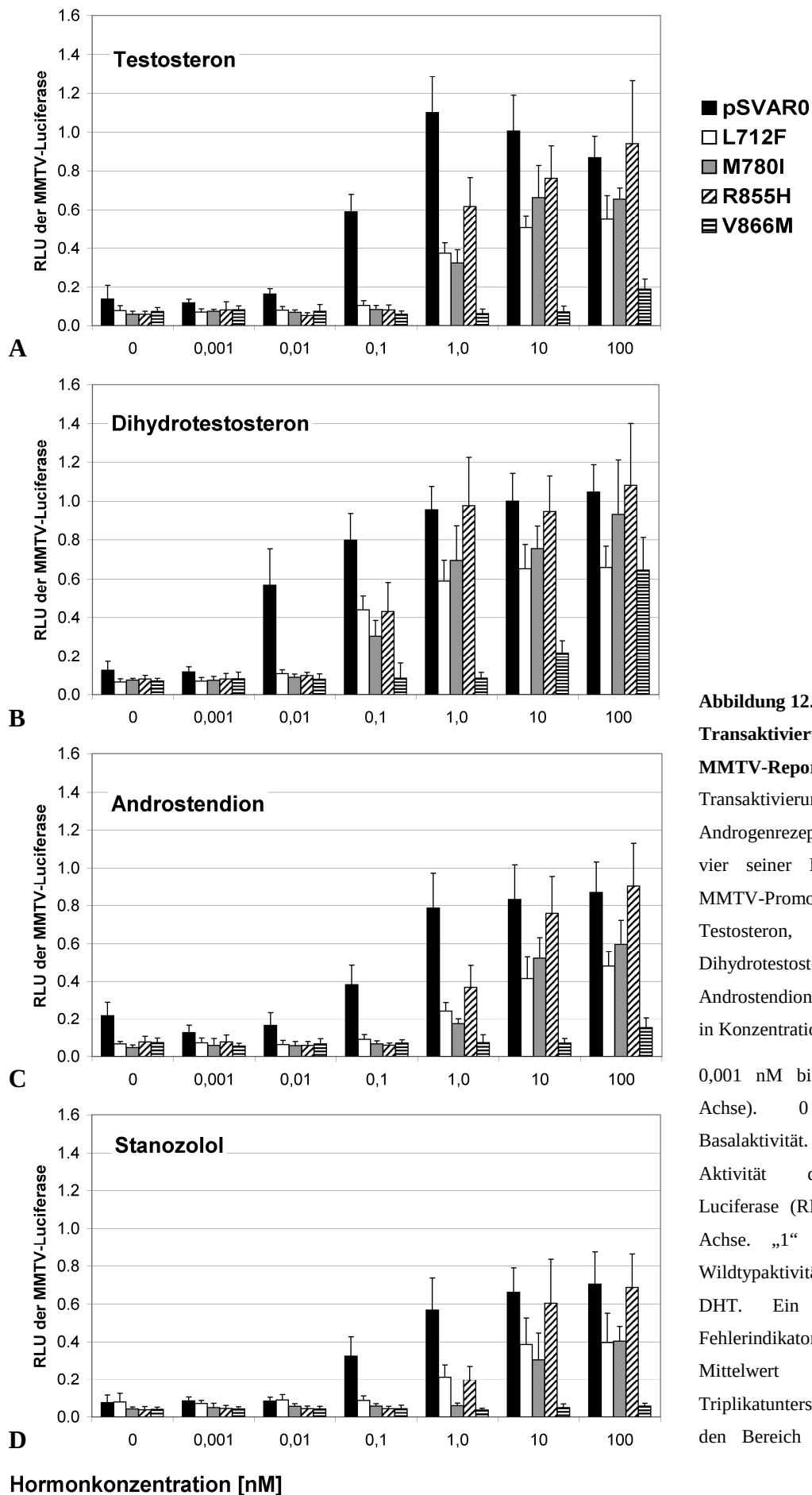


Abbildung 12.

Transaktivierung des MMTV-Reportergens

Transaktivierungsstudie des Androgenrezeptorwildtyps und vier seiner Mutationen am MMTV-Promotor mit Testosteron, Dihydrotestosteron, Androstendion und Stanozolol in Konzentrationen von

0,001 nM bis 100 nM (x-Achse). 0 nM als Basalaktivität. Relative Aktivität der MMTV-Luciferase (RLU) auf der y-Achse. „1“ entspricht der Wildtypaktivität bei 10 nM DHT. Ein Balken mit Fehlerindikator stellt den Mittelwert von drei Triplikatuntersuchungen und den Bereich einer SD dar.

4.4.2. Das (ARE)₂TATA-Luc-Reportergen

Im Gegensatz zum MMTV-Reportergen ist die Aktivität des Androgenrezeptorwildtypes am TATA-Promotor unter allen Bedingungen deutlich höher als die der Mutationen. Der erste hormoninduzierte Aktivitätsanstieg liegt bei T und S ab 0,1 nM, bei DHT ab 0,01 nM und bei A ab 1 nM. Wie in Abb. 13. zu sehen, nimmt mit zunehmender Konzentration auch die Aktivität zunächst stark zu, später wird ihr Anstieg geringer oder stagniert, wie beispielsweise bei 100 nM T. Zweitstärkstes Hormon am TATA-Promotor nach DHT ist S, es folgen T und A. L712F lässt im Vergleich zu pSVAR0 bei einer um eine Zehnerpotenz höheren Hormonkonzentration den Aktivitätsbeginn erkennen, ausgenommen DHT. Die maximale RLU findet sich erst bei 100 nM. Sie entsprechen denen am MMTV-Promotor erreichten. Ähnlich wie bei Einsatz des MMTV-Promotors benötigt das Konstrukt M780I höhere Hormonkonzentrationen für die gleiche Aktivität wie L712F. Es fällt auf, dass M780I mit TATA schwächer ist und L712F bei 100 nM nicht mehr überragt. Bemerkenswert niedrige RLUs zeigt diese Mutation mit Stanazolol (s. Abb. 13.D). Auch R855H ist mit TATA weniger aktiv als mit MMTV. Unter T und DHT beginnt der Anstieg bei 1 nM, unter A und S bei 10 nM. Bei 100 nM zeigt sie mit 65% (T) und 90% (DHT) WT-Aktivität die höchste Aktivität aller Mutationen, erreicht die von pSVAR0 jedoch nicht. Das Konstrukt V866M verhält sich wie bei Einsatz des MMTV-Promotors – mit T, A und S zeigt sich nur bei einer Konzentration von 100 nM eine signifikant über der Basalaktivität liegende hormoninduzierte Aktivität, bei DHT schon ab 10 nM. Für alle mit dem TATA-Promotor eingesetzten AR-Konstrukte lässt sich feststellen, dass die normalisierten Luciferaseaktivitäten deutlich geringer sind als bei den Versuchen mit MMTV.

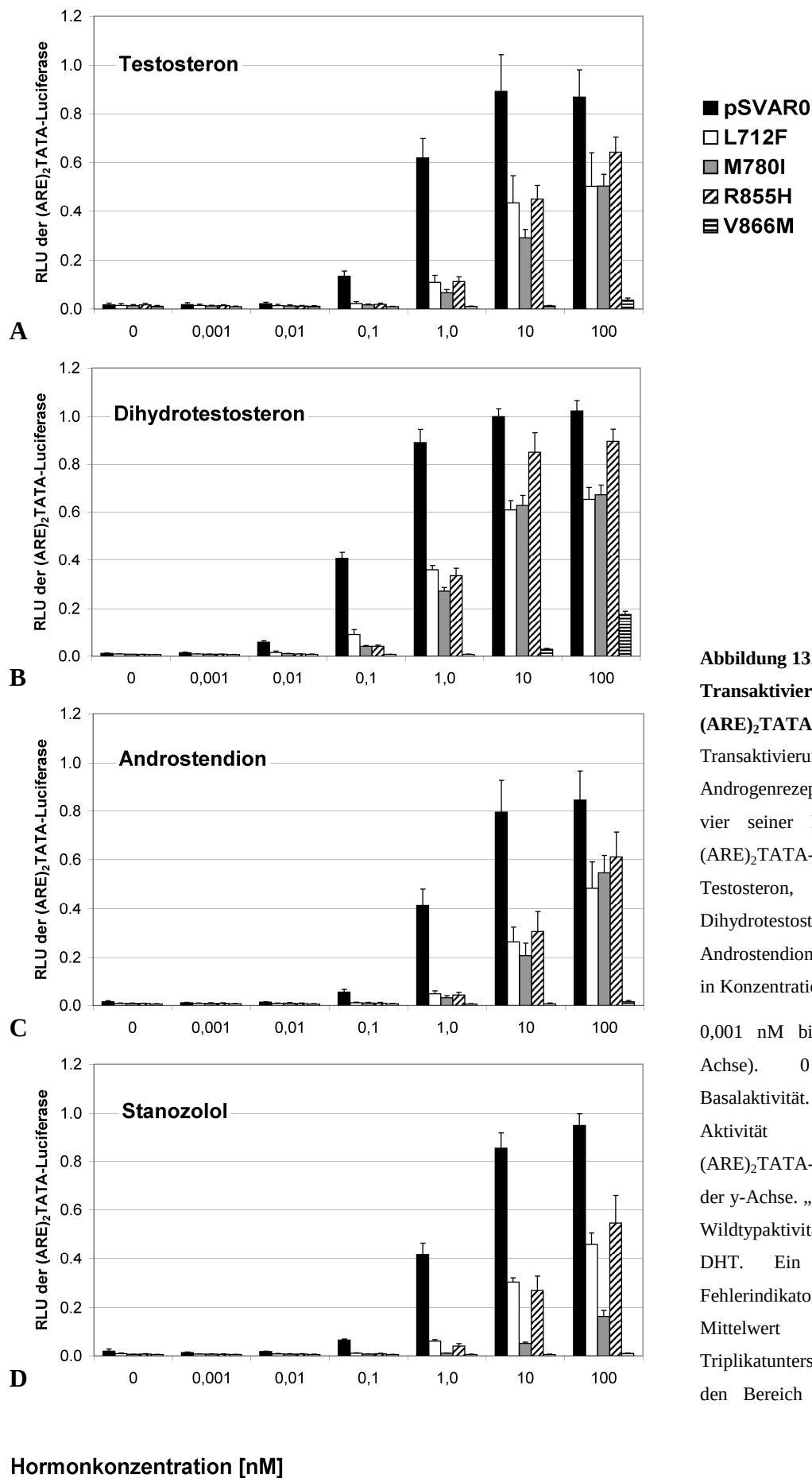


Abbildung 13.
Transaktivierung des (ARE)₂TATA-Reportergens
 Transaktivierungsstudie des Androgenrezeptorwildtyps und vier seiner Mutationen am (ARE)₂TATA-Promotor mit Testosteron, Dihydrotestosteron, Androstendion und Stanozolol in Konzentrationen von 0,001 nM bis 100 nM (x-Achse). 0 nM als Basalaktivität. Relative Aktivität (RLU) der (ARE)₂TATA-Luciferase auf der y-Achse. „1“ entspricht der Wildtypaktivität bei 10 nM DHT. Ein Balken mit Fehlerindikator stellt den Mittelwert von drei Triplikatuntersuchungen und den Bereich einer SD dar.

4.4.3. Das GRE-Oct-Luc-Reportergen

Bei Betrachtung der Diagramme in der Abbildung 14. fällt auf, dass die Differenzen der Aktivitäten zwischen den verschiedenen Konstrukten geringer sind als bei den oben beschriebenen Diagrammen. Die absoluten Werte in den Versuchen mit diesem Promotor waren viel niedriger als bei Einsatz der anderen beiden Promotoren. Daher sind die Aktivitäten der sonst deutlich aktiveren Konstrukte niedriger und liegen näher an den Aktivitäten der sonst weniger aktiven Konstrukte. Anders ausgedrückt findet sich hier in der Relation zu den Versuchen mit Hormonzugabe eine hohe Basalaktivität der Luciferase ohne Hormon. Die Aktivität des Androgenrezeptorwildtyps ist bei allen Hormonkonzentrationen signifikant höher als die der anderen Konstrukte. Ab 0,01 (T und DHT) bzw. ab 0,1 nM (A und S) liegt seine Aktivität deutlich über der Basalaktivität, steigt dann bis 1 nM, bei DHT bis 0,1 nM, weiter an, um mit 90% (T) bis 110% (A) in ein Plateau überzugehen. Das Konstrukt L712F weist bei allen Hormonen nur einen Aktivitätssprung auf. Bei Zugabe von T, A und S (s. Abb. 14.A, C, D) liegt er zwischen 0,1 nM und 1 nM, unter dem potenteren Androgen DHT (s. Abb. 14.B) zwischen 0,01 nM und 0,1 nM. Mit diesem Sprung erreicht L712F mit ungefähr 75% RLU deutlich höhere Werte als mit den Promotoren MMTV und TATA und deutlich höhere Werte als M780I. M780I und R855H vollziehen den Anstieg langsamer über zwei Hormonkonzentrationen hinweg und erreichen bei 10 nM mit 60% und 70% (S) bis 75% und 80% (A) die Maximalaktivität. Ausgenommen ist bei beiden wiederum die Aktivität unter DHT, die schon bei 1,0 nM maximal ist. Im Vergleich zu den anderen beiden Promotoren, an denen mit DHT die höchste Aktivität zu erzielen war, ist sie mit GRE-Oct und A (s. Abb. 14.C) für M780I und R855H am höchsten. Stanozolol induziert die Transkription mit M780I an allen Promotoren am geringsten. V866M verhält sich wie an den anderen Promotoren und hat erst bei 10 nM (T und DHT) bzw. 100 nM (A und S) eine signifikant über der Basalaktivität liegende RLU. Einziges Novum ist die bei 100 nM DHT deutlich über die von M780I und R855H hinausgehende Aktivität von V866M, die in den Versuchsergebnissen über 90% der WT-Aktivität erreicht.

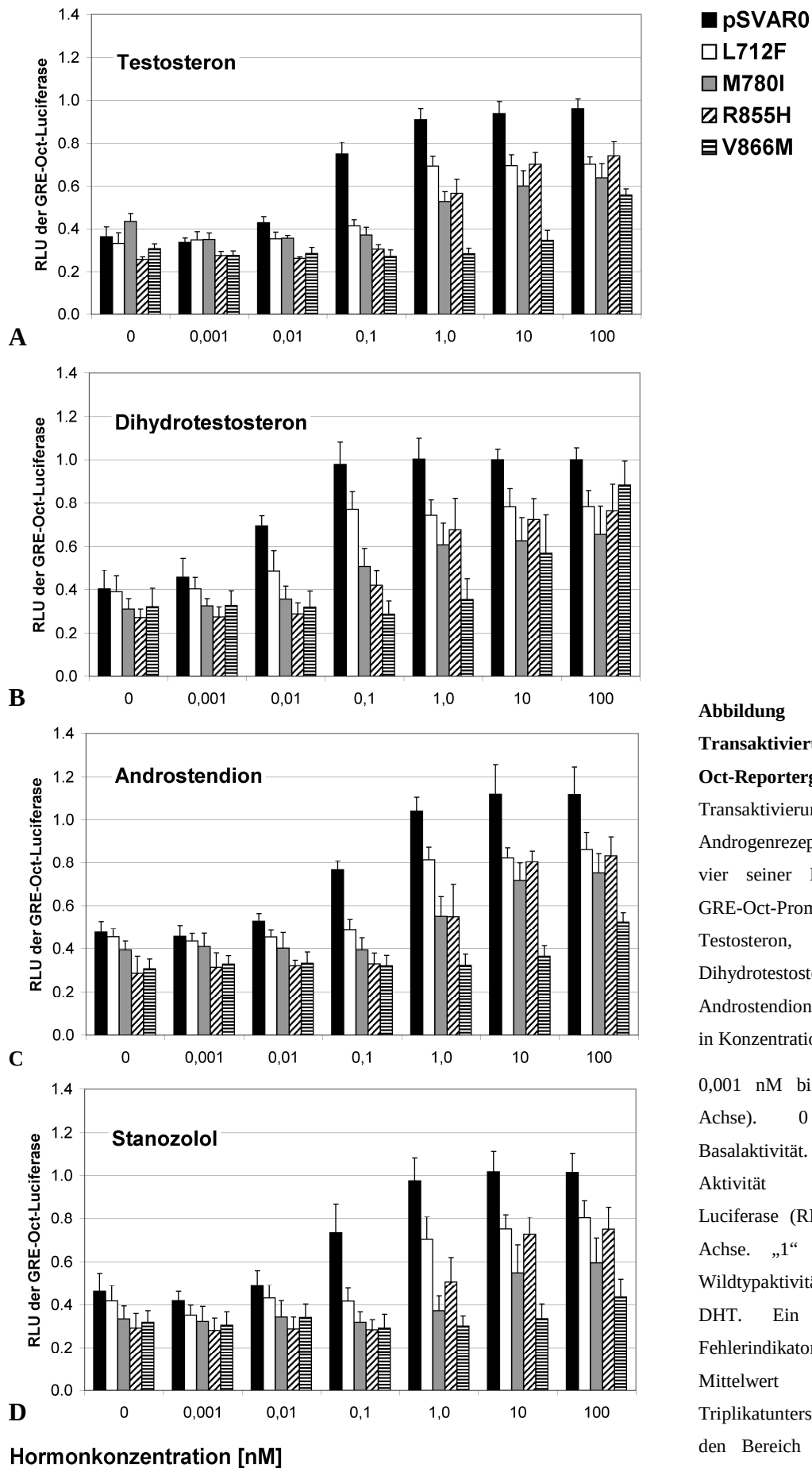


Abbildung 14.

Transaktivierung des GRE-Oct-Reporter gens

Transaktivierungsstudien des Androgenrezeptorwildtyps und vier seiner Mutationen am GRE-Oct-Promotor mit Testosteron, Dihydrotestosteron, Androstendion und Stanozolol in Konzentrationen von

0,001 nM bis 100 nM (x-Achse). 0 nM als Basalaktivität. Relative Aktivität der GRE-Oct-Luciferase (RLU) auf der y-Achse. „1“ entspricht der Wildtypaktivität bei 10 nM DHT. Ein Balken mit Fehlerindikator stellt den Mittelwert von drei Triplikatuntersuchungen und den Bereich einer SD dar.

4.5. Dose Response Kurven

Ergänzend zu den bisher aufgeführten Auswertungen der experimentellen Daten soll an dieser Stelle mit Hilfe von Dose-Response-Kurven und der daraus ermittelten EC 50 für den Androgenrezeptorwildtyp und die Androgenrezeptormutation L712F an dem Promotor (ARE)₂TATA mit den Hormonen Testosteron, DHT, Androstendion und Stanozolol nochmals die Abhängigkeit von der jeweiligen Hormonkonzentration verdeutlicht werden. Dieser Darstellung liegt die Annahme zugrunde, dass die AR-Mutationen unter der höchsten verwendeten Hormonkonzentration ihre Maximalaktivität erreicht haben. Dies ist, wird der Anstieg in den vorangegangenen Abbildungen zur Transaktivierung betrachtet, nicht sicher validierbar, da in den wenigsten Fällen bei der Hormonkonzentration von 100 nM eine Plateauphase erreicht ist, die Konzentration jedoch schon deutlich im supraphysiologischen Bereich liegt.

Als erstes sind die Kurven unter Testosteron dargestellt. Der Wildtyp zeigt einen früheren und steileren Anstieg als die Mutation, die halbmaximale Aktivität ist bei einer Hormonkonzentration von ca. 0,5 nM Testosteron erreicht. Die Mutation L712F benötigt für die halbmaximale Aktivität eine Testosteronkonzentration von 2,7 nM, also mehr als das Fünffache.

Die nächsten Dose-Response-Kurven sind mit dem potenteren DHT aufgezeichnet worden. Entsprechend der Erwartung, dass eine niedrigere Hormonkonzentration zum Erreichen der halbmaximalen Aktivität genügen müsste, errechnet sich für den Wildtyp eine Konzentration von 0,15 nM und auch die Mutation zeigt ihre EC50 bei bereits 0,8 nM DHT im Gegensatz zu 2,7 nM Testosteron. Die Kurvenverläufe der beiden Konstrukte ähneln mit einem früheren und steileren Anstieg für den Wildtyp den für die Kombination mit Testosteron beschriebenen.

Die Kurvenverläufe für die Dosisabhängigkeit sind auch für das Testosteronvorläuferhormon Androstendion ähnlich. Die EC 50 liegt für den Wildtyp bei 1 nM Androstendion, für L712F bei 8,6 nM. Das Mutationskonstrukt zeigt erneut einen mehrfach höheren Hormonbedarf für die halbmaximale Konzentration. Insgesamt ist für beide AR-Konstrukte bis zum Erreichen der halbmaximalen Aktivität eine höhere Hormonkonzentration als bei den Versuchen mit Testosteron und DHT notwendig.

Mit dem Hormon Stanozolol lässt sich wieder der Bedarf einer höheren Hormonkonzentration für L712F für die EC50 als für den AR zeigen. Die Werte der EC

50 liegen bei 1,2 nM für den Androgenrezeptorwildtyp und bei 5,6 nM für die AR-Mutation L712F. Sie befinden sich im Bereich der Werte für das Hormon Androstendion und sind deutlich höher als für Testosteron und DHT.

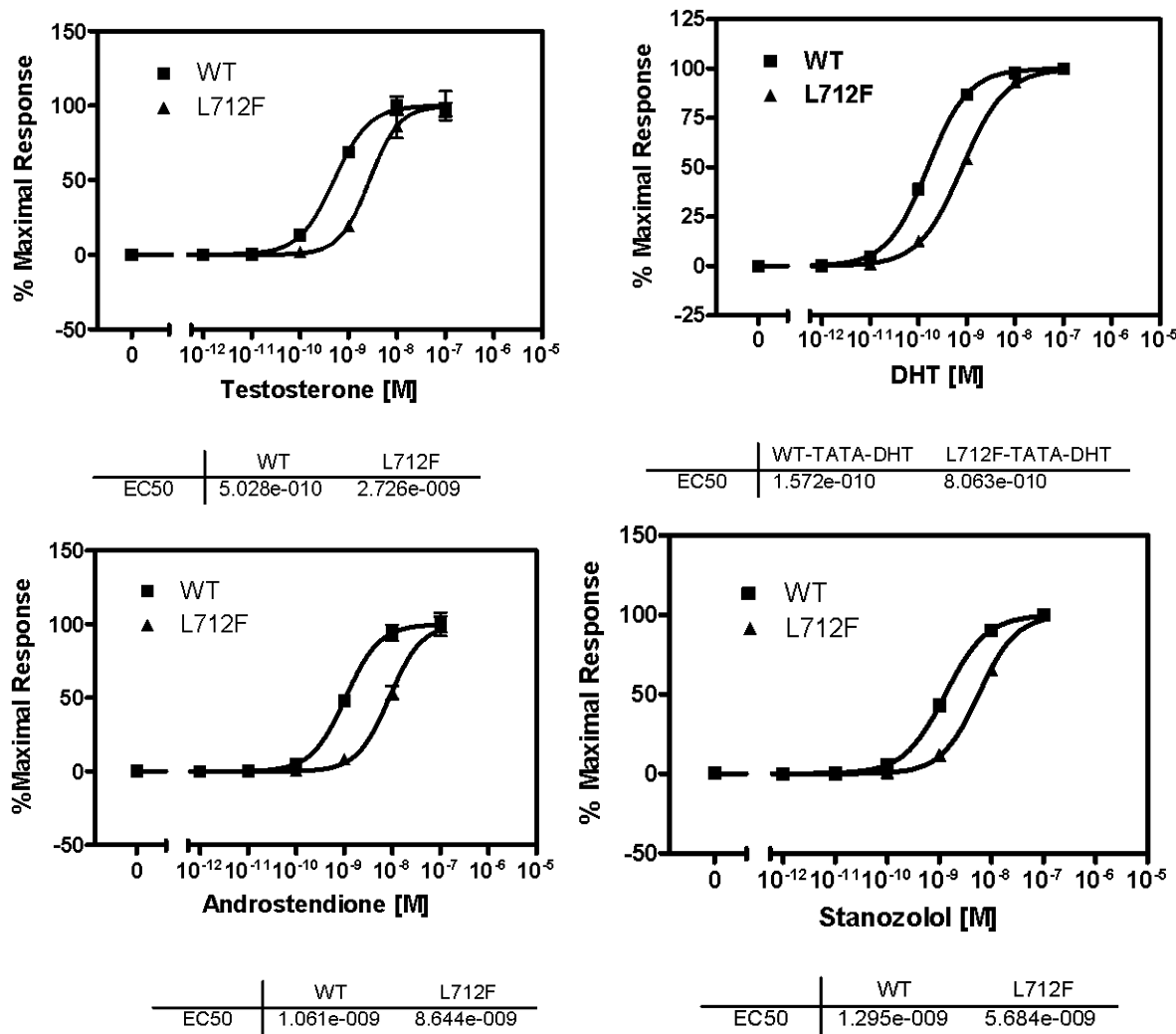


Abbildung 15. Dose Response Kurven

Auf die Hormonkonzentration bezogene Darstellung der Konstruktaktivität für den Androgenrezeptorwildtyp und die AR-Mutation L712F mit dem Promotor (ARE)₂TATA-Luc und den Hormonen T, DHT, A und S.

4.6. Die Aktivierungsprofile der AR-Mutationen

Die fünf Androgenrezeptorkonstrukte, die drei verschiedenen Reportergene und die vier Hormone in jeweils sieben Konzentrationen ergeben 420 Kombinationen, die bezüglich ihres Aktivitätsmusters analysiert werden. Aus den Tabellen und Diagrammen sind die Zusammenhänge und Ähnlichkeiten dieser Datenmenge erst nach genauer Betrachtung ersichtlich. Zur Darstellung der Muster wird sich eines Programms bedient, welches ursprünglich für funktionelle Genanalysen entwickelt wurde (Eisen et al., 1998). Die normalisierten Luciferaseaktivitäten (1= pSVAR0 bei 10 nM DHT) werden pro Ligandenkonzentration und Promotor um das arithmetische Mittel zentriert. Graphisch erscheinen alle über dem Mittelwert liegenden Werte in einem roten Farbton, alle unter dem Mittelwert liegenden Werte in einem blauen Farbton, während der Mittelwert selbst von grauer Farbe ist. Die Farbgebung ist intensiver, je weiter der Wert vom arithmetischen Mittel abweicht. Die so aus AR-Konstrukten, Promotoren, Liganden und Ligandenkonzentrationen entstandene Abbildung 15. zeigt für jedes AR-Konstrukt ein Aktivierungsprofil, welches für den AR-Wildtyp bzw. die AR-Mutationen spezifisch ist. So ist pSVAR0 fast ausschließlich rot, da es meist am aktivsten ist. Lediglich R855H erzielte am MMTV-Promotor mit 100 nM T, DHT und A höhere Luciferaseaktivitäten als der Wildtyp.

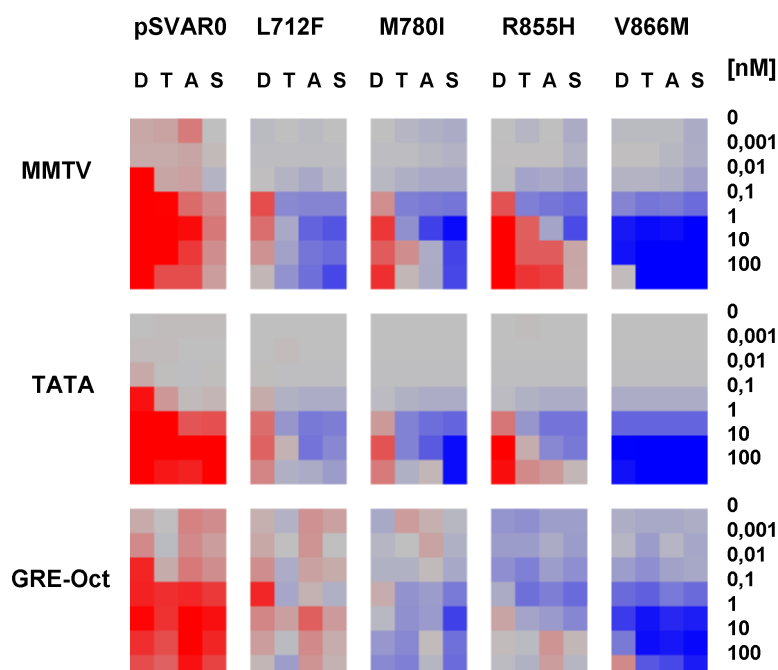


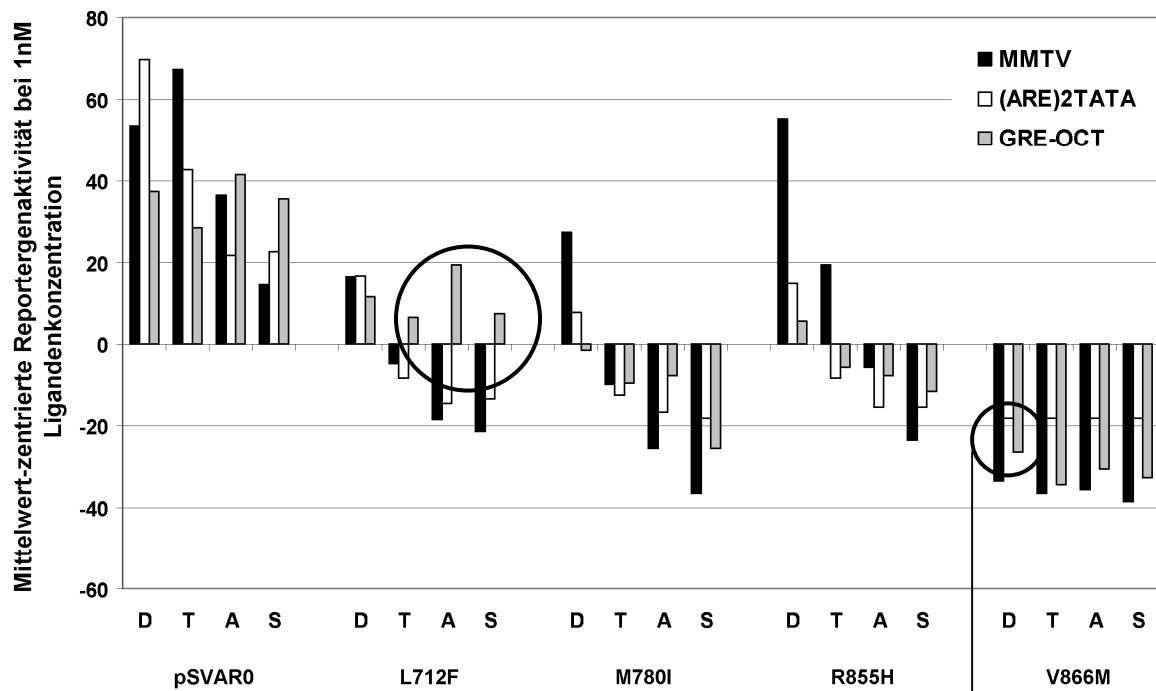
Abbildung 16. Farbkodierte Darstellung der Transfektionsdaten

Für jedes Reportergen (links) wurde für jede Hormonkonzentration (rechts) der Mittelwert gebildet; Daten, die über dem Mittelwert liegen sind rot, Daten, die unter dem Mittelwert liegen sind blau dargestellt. Die Spalten sind den AR-Konstrukten mit den vier Liganden (oben) zugeordnet.

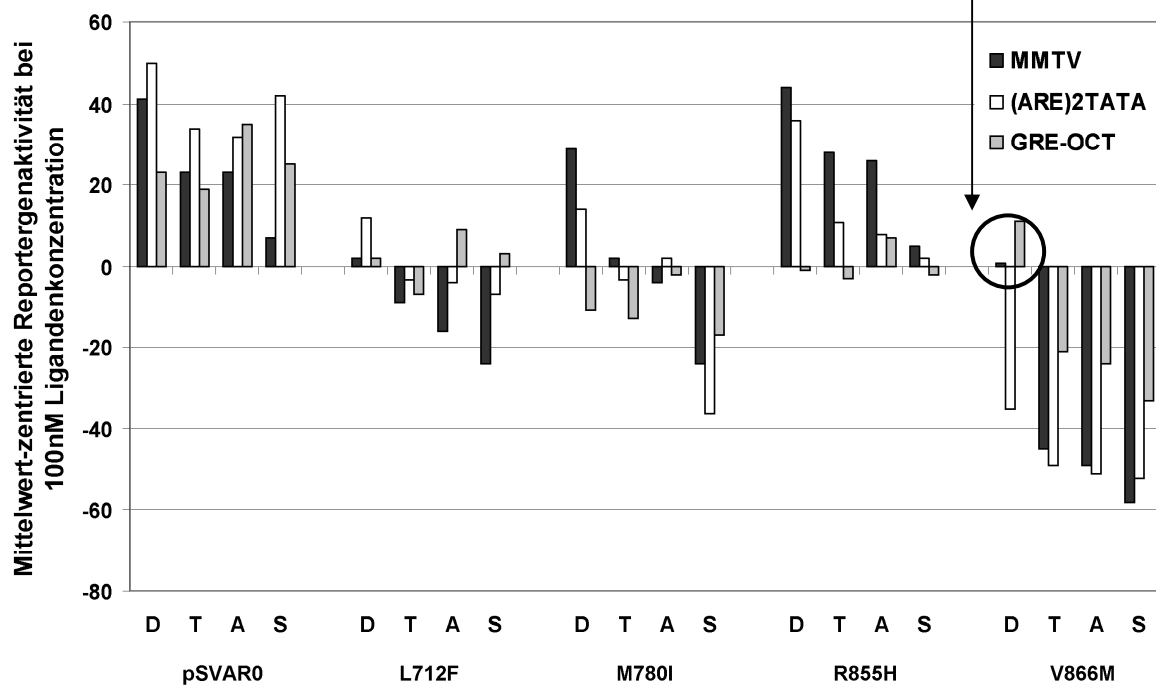
V866M, welches meist ab 100 nM Ligandenkonzentration zunehmende Aktivität zeigte, ist überwiegend blau. Auch die geringe Induktion der Mutation M780I durch S, die im Zusammenspiel mit dem TATA-Promotor sehr auffällig ist, jedoch auch mit den anderen beiden Promotoren auftritt, ist an den blauen Punkten unterhalb der M780I + S deutlich sichtbar.

Werden die um den Mittelwert zentrierten Daten nicht farbkodiert, sondern in Form eines Histogramms dargestellt, zeigen sich die Einflüsse der Promotoren und Liganden auf die Gesamtaktivität der AR-Mutationen deutlich. In den Abbildungen 17.A und 17.B ist die um den Mittelwert zentrierte Reporterogenaktivität bei 1 nM (Abb. 17.A) und bei 100 nM (Abb. 17.B) Ligandenkonzentration zu sehen. Der Androgenrezeptorwildtyp stellt das aktivste Konstrukt dar, V866M ist am wenigsten aktiv. Nur am GRE-Oct-Promotor ist V866M bei der DHT-Höchstkonzentration überdurchschnittlich aktiv (vergl. Kreis bei 1 nM und bei 100 nM). R855H ist mit DHT bereits im physiologischen Konzentrationsbereich am MMTV-Promotor aktiver als pSVAR0, mit Testosteron und Androstendion bei supraphysiologischen 100nM. Auch am TATA-Promotor zeigt R855H mit sehr hoher Ligandenkonzentration hohe Aktivität und ist signifikant aktiver als die anderen Mutationen. Das potente DHT bewirkt auch mit L712F am MMTV-Promotor Aktivitäten über dem Mittelwert, mit allen anderen Liganden ist die Kombination von MMTV und L712F schwach. Wird statt des MMTV GRE-Oct eingesetzt, zeigt L712F gute Aktivität (s. Kreis bei L712F). Dies ist auch im Vergleich zur Mutation M780I ersichtlich, welche mit GRE-Oct nur gering aktiv ist. In Kombination mit TATA sind beide Konstrukte ungefähr gleichwertig, ausgenommen die auffallend schwache Aktivität von M780I mit Stanozolol. Mit MMTV ist M780I bei hochphysiologischen Ligandenkonzentrationen etwas stärker als L712F.

Zusammenfassend ergibt sich für jedes einzelne AR-Konstrukt ein vom Liganden und dessen Konzentration sowie vom Zielgen abhängiges, spezifisches Aktivierungsprofil.



A



B

Abbildung 17. Histogramme

der um den Mittelwert zentrierten Daten, ursprünglich für die farbkodierte Darstellung berechnet; für jedes Androgenrezeptorkonstrukt sind die Daten für die vier Liganden DHT (D), Testosteron (T), Androstendion (A) und Stanozolol (S) mit allen drei Reportergenkonstrukten (MMTV, (ARE)2TATA, GRE-Oct) dargestellt; oben: physiologische Ligandenkonzentration von **1nM**, unten: supraphysiologische Ligandenkonzentration von **100nM**.

5. DISKUSSION

Bereits 1996 hatten Doesburg et al. eine durch Alteration des ARs in der LBD hervorgerufene veränderte Ligandenspezifität des ARs beschrieben.

In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatte sich zeigen lassen, dass der Androgenrezeptor unter *in-vitro*-Bedingungen hormon- und ligandenspezifische Aktivierungsprofile aufwies (Holterhus et al. 2002). Aus diesen Ergebnissen wurde die These abgeleitet, dass sich eine differentielle Aktivität des Androgenrezeptors aus dem Zusammenspiel von Ligand und Reportergen sowie Cofaktoren bei der AR-Aktivierung ergibt. Inwieweit diese Erkenntnisse auf die *in-vivo*-Bedingungen übertragen werden können, um damit auch Aussagen bzw. Vorhersagen über Aktivierungsdefizite des ARs tätigen zu können, musste offen gelassen werden.

Basierend auf den genannten Ergebnissen wurden in dieser Arbeit daran angelehnte Untersuchungen mit Androgenrezeptormutationen durchgeführt.

Die Experimente dieser Arbeit zeigen erstmals, dass Mutationen des ARs nicht nur an einem einzelnen Zielgen zu einer quantitativ verminderten Aktivierung des Zielgens führen, sondern dass sie in Abhängigkeit vom jeweiligen Reporter und dem beteiligten Liganden sowie der Ligandenkonzentration ein mutationsspezifisches Aktivierungsprofil aufweisen. Dieses Aktivierungsprofil ließ sich für jede der hier verwendeten Mutationen nachweisen.

Diese bisher nicht bekannte Tatsache soll im Weiteren diskutiert werden.

5.1. Der Androgenrezeptor

Die Mutationen des ARs präsentieren sich sehr oft mit einem Transaktivierungspotential, das unter dem des WT-ARs liegt. Dafür kann theoretisch eine verminderte Expression der AR-Konstrukte in den CHO-Zellen ursächlich sein. Der Westernblot zeigt jedoch für alle Konstrukte bei äquivalenten Proteinmassen gleich starke Banden im Molekulargewichtsbereich des WT-ARs an, so dass angenommen werden kann, dass alle hier verwendeten Konstrukte im gleichen Maß exprimiert werden.

Eine androgenrezeptorunabhängige Aktivierung der Transkription konnte mit Induktionen aller drei Reportergenkonstrukte, die denen der untransfizierten Kontrollen entsprach, in den Negativkontrollen ausgeschlossen werden.

Die unterschiedlichen *in-vitro*-Transaktivierungspotentiale der vorliegenden Arbeit werden also weder durch verschiedene Konzentrationen der AR-Konstrukte noch durch androgenrezeptorunabhängige Aktivierung bedingt. Vielmehr muss von mutationsbedingten Unterschieden der AR-Konstrukte in der Funktionalität ihrer Domänen ausgegangen werden.

Gemeinsam ist allen Untersuchungskonstellationen von AR-Konstrukt, Reportergen und Ligand, dass eine zunehmende Ligandenkonzentration zu einem Anstieg der Aktivierung führt, dies jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Die Kombinationen mit dem WT-AR sind bis auf zwei nicht signifikante Ausnahmen mit der höchsten Aktivierung verbunden. Lediglich die Mutation R855H zeigt am MMTV-Reportergen mit DHT und Androstendion Mittelwerte, die über denen des AR-WT liegen.

R855H ist häufig das Konstrukt, welches die zweithöchste Aktivierung hervorruft, es folgt meistens M780I mit der drittstärksten Aktivierung *in-vitro*. M780I zeigt jedoch in Kombination mit dem MMTV- und dem (ARE)₂TATA-Reportergen und jeweils Stanazolol eine deutliche niedrigere Aktivierung. V866M ist bis auf die Aktivierung über den GRE-Oct-Promotor die am schwächsten aktivierende Mutation. M780I ist in den meisten Fällen mit einer höheren Aktivierung als L712F verbunden. Vor allem die Beobachtungen an der AR-Mutation M780I lassen annehmen, dass die räumliche Konstellation der beteiligten Strukturen Einfluss auf die messbare Aktivierung, die ein Maß für die Transkriptionsstärke des AR-Konstruktes am Zielgen an verschiedenen Promotoren *in-vivo* darstellen soll, haben kann.

Die LBD des AR-WT weist eine hohe Affinität zu und Spezifität für den Liganden auf. Durch Mutationen der LBD kann diese Spezifität beeinflusst worden sein. Die LBD ist das Kennzeichen eines jeden Kernrezeptors. Alle Kernrezeptoren bilden mit ihrer LBD eine dreilagige, antiparallele α -helikale Struktur, die aus bis zu zwölf einzelnen α -Helices besteht, und eine kurze β -Windung (Poujol et al. 2000, Bourguet et al. 2000). Zwischen Helix 1 bis 3 auf der einen und Helix 7,10 und 11 auf der anderen Seite liegen die Helices 4, 5, 6, 8, 9 und die β -Windung, während Helix 12 wie ein Deckel geklappt werden kann (Matias et al. 2000, Elhaji et al. 2004). Die normale Konfiguration und die freie Beweglichkeit der Helix 12 sind wie die genaue Position beim Verschließen der ligandengebundenen LBD sehr wichtig für die AF-2 (Elhaji et al. 2006), die ihrerseits über die N-/C-terminale Interaktion die Ligandenbindung festigt und positiv auf den Transkriptionserfolg einwirkt. Die LBD selbst hat eine ligandenspezifische Form. Die

Aminosäuren der LBD haben vor allem hydrophoben Charakter, um mit den Steroiden über van-der-Waals-Bindungen in Kontakt treten zu können, Wasserstoffbrückenbindungen sind selten.

Die Kristallstrukturanalyse kann einen Einblick in die räumlichen Strukturen und Beziehungen der LBD zum Liganden gewähren (Hur 2004, Sack et al., 2001). Sie ermöglicht die strukturelle Untermauerung der beobachteten funktionellen Muster der Mutationen.

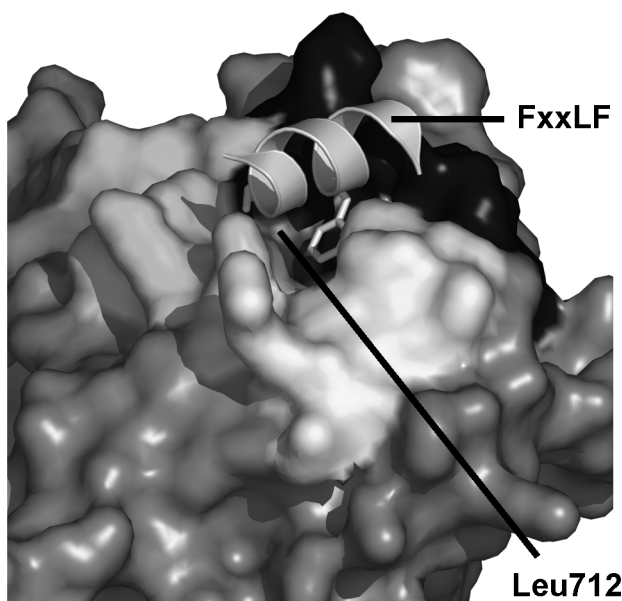


Abbildung 18. 3D-Struktur von L712F

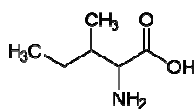
Leucin an der Position 712 liegt in der Helix 3 an der Basis einer Furche, die, da die AF-2 von Helix 3, 4 und 12 gebildet wird, Strukturen mit dem FXXLF-Motiv bindet (Hur et al. 2004, Abbildung 18). Träger dieses Motivs sind Coaktivatoren und der N-Terminus des ARs, der im Rahmen der N/C-terminalen Interaktionen an die AF-2 bindet. Leucin bildet hydrophobe Verbindungen zu Phenylalanin +1 und Leucin +4 des FXXLF-Motivs aus.



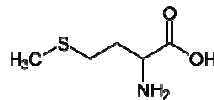
ersetzt, ändern sich mit den Aminosäureseitenketten die Bedingungen für die Bindung der FXXLF-Strukturen. Phenylalanin ist wie Leucin eine hydrophobe Aminosäure. Sie wird zu den Coaktivatoren und dem N-Terminus wahrscheinlich ähnliche Verbindungen wie Leucin aufbauen können. In Abhängigkeit von der Funktionstüchtigkeit der Interaktion verläuft die Transkription am Zielgen und damit das Aktivierungsprofil von L712F. Ausgehend von diesem Modell sollte L712F zu einem Transkriptionserfolg führen können,

wenn auch in geringerem Ausmaß als der AR-Wildtyp. Bedingt durch die *in-vivo* bestehenden verschiedenen Coaktivator- und Ligandenkonzentrationen, von denen die Transkriptionsstärke außerdem abhängt, treten möglicherweise phänotypische Differenzen zwischen den Individuen mit dieser Punktmutation des ARs auf. Dieses Modell deckt sich mit den hier *in-vitro* erhobenen Ergebnissen, dass L712F mit jedem Promotor und jedem Ligand zu einem Transkriptionserfolg führt, der jedoch nie das Wildtypniveau erreicht. Klinisch ist die Manifestation des Aktivierungsgrads in einem PAIS wahrscheinlich.

Methionin 780 ist in der Helix 7 mit Kontakt zum D-Ring des Steroids positioniert, zu welchem es über van-der-Waals-Kräfte in Verbindung steht. Angenommen, die Aktivität dieses Konstruktes wäre sehr von der Struktur des Liganden abhängig, ist es am wahrscheinlichsten, dass unter den verwendeten Hormonen die Aktivität durch Stanozolol mit seinem komplexen A-Ring und dadurch bedingter Lageveränderung am meisten beeinträchtigt wird. Die Aminosäure Methionin im Wildtyp kann einen ausreichenden Kontakt zum Liganden herstellen, Isoleucin ist mit seiner verzweigten Seitenkette



starrer als Methionin



(siehe Abbildung 19) und führt zu

einem ausgeprägten Aktivierungsdefizit der Mutation. M780I hat sich dementsprechend in seinem Aktivierungsprofil besonders durch die schwache Aktivierbarkeit mit Stanozolol ausgezeichnet. Während der Aktivitätsverlust mit den MMTV- und GRE-Oct-Reporter genen gering ausfiel, war er in Kombination mit dem (ARE)₂TATA-Reporter gen sehr ausgeprägt.

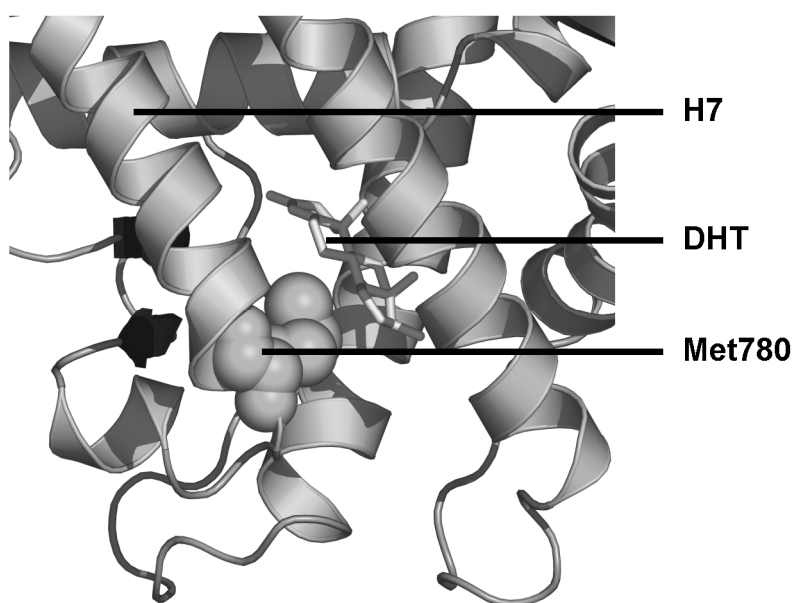
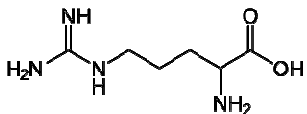
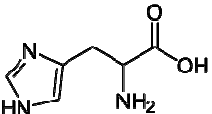


Abbildung 19. 3D-Struktur M780I

Da das Reporterogen in anderen Kombinationen keine so niedrige Aktivität herbeiführt, hat mutmaßlich die Kombination von R855H mit Stanozolol auch das Bindungsvermögen von Androgen-AR-Komplex an der DNA negativ beeinflusst.

Die Mutation von Arginin  zu Histidin  in der

Helix 10/11 führt bei der Mutation R855H zu mehr Thermolabilität und verminderten N/C-terminalen Interaktionen (Elhaji et al. 2004, Jääskeläinen et al. 2006). Sie zeigt eine normale Ligandenbindungskapazität, eine erhöhte Dissoziationskonstante und verminderte Transaktivierungskapazität (Elhaji et al. 2004, Skordis et al. 2005). Jääskeläinen (2006) bestätigte unter varierten Versuchsbedingungen (differente Zellkultur und Transfektionssystem) das residuale dosisabhängige Transaktivierungspotential von R855H und beschrieb eine noch minimale N-/C-terminale Interaktion.

Im Gegensatz zum Wildtyp mit vier Wasserstoffbrückenbindungen zu L797 und E803 bindet R855H S851 über nur eine Wasserstoffbrückenbindung und behindert damit die Umlagerung von Helix 12 nach der Ligandenbindung (Elhaji et al. 2004). In Transaktivierungsuntersuchungen wurde bereits gezeigt, dass R855H an einem MMTV-GH-Reportergenkonstrukt beachtliche Aktivität auszulösen vermag (Elhaji et al. 2004). Auch die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen ein hohes Maß an Reporterogenaktivität bei Einsatz des MMTVs, welches sogar die Wildtypaktivität übertreffen kann. Mit den Promotoren (ARE)₂TATA und GRE-Oct ist die Aktivität in Relation zum AR-WT deutlich niedriger.

V866M ist meistens mit einem Phänotyp des CAIS assoziiert. Sie ist die Mutation mit der niedrigsten Aktivität. Sie wurde untersucht, um zu zeigen, ob das CAIS von einer liganden- und promotorunabhängigen allgemein stark reduzierten Aktivität am Zielgen

herrührt oder ob auch hier ein bestimmtes Muster der Aktivität zu erkennen ist. Unter den gegebenen Bedingungen induzierte die Mutation promotorunabhängig erst bei supraphysiologischen Ligandenkonzentrationen Reporterogenaktivität, was sich mit bisher veröffentlichten Daten deckt. Nach Stimulation mit 100 nM DHT erreichte sie bei insgesamt niedrigem Aktivitätsniveau am GRE-Oct-Promotor nahezu WT-Aktivität und ist damit einmalig aktiver als die anderen Mutationen.

CSCCC(N)C(=O)O Methionin besitzt eine lange Seitenkette, Valin CC(C)C(N)C(=O)O hingegen eine kurze verzweigte Seitenkette, weshalb angenommen wird, dass die Substitution mit Methionin mit einer strukturellen Veränderung des ARs einhergeht, die eine stark verminderte Rezeptorfunktion zur Folge hat (siehe Abbildung 20).

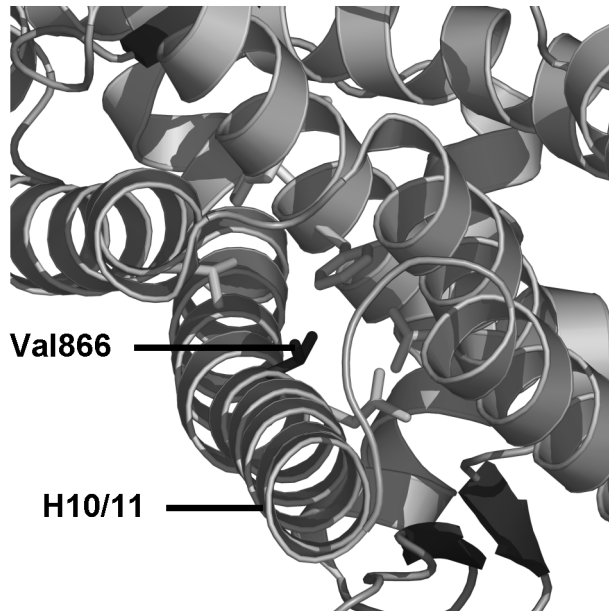


Abbildung 20. 3D-Struktur von V866M

Des Weiteren hat die LBD Einfluss auf die AR-Dimerisation (Wong et al. 1993), auf das Kernlokalisierungssignal, welches durch die freie LBD maskiert wird, und auf die N/C-terminalen Interaktionen.

$^{23}\text{FQNLF}^{27}$ des NH_2 -Terminus interagiert androgenabhängig mit der AF-2 der LBD (Schaufele et al. 2005), $^{433}\text{WHTLF}^{437}$ geht androgenunabhängig eine Verbindung außerhalb der AF-2 an der LBD ein. Durch beide wird die α -Helix der LBD stabilisiert und die Androgendissoziation vom Rezeptor verhindert (He et al. 1999/2000). Die funktionelle Bedeutung der N/C-Interaktionen machen spontane Mutationen deutlich, die in diese Interaktion interferieren und zu einer zunehmenden Ligandendissoziation, die mit Transaktivierungsverlust einhergeht, führen. Eine von Deeb et al. (2008) in der hinge-Region entdeckte Mutation (Arginin629Tryptophan) beeinträchtigte bei normaler AR-Bindung und nukleärer Lokalisation des AR die N/C-terminalen Interaktionen in einem solchen Ausmaß, dass sich bei der Geburt ein deutlich unterentwickeltes männliche Genitale zeigte. Gute N/C-Interaktionen sind in der Lage, die Sensitivität des ARs für niedrige Androgenkonzentrationen zu erhöhen, indem die Dissoziationsrate abnimmt. Einschränkend ist zu sagen, dass die in transienten Transfektionsuntersuchungen für die

Liganden beobachtete Aktivierungsfähigkeit viel stärker sein kann als die *in vivo* (Kemppainen et al. 1999).

Diese Phase des Transaktivierungsprozesses wird durch Cofaktoren im engeren Sinn beeinflusst (Rosenfeld, Glass 2001, McPhaul 2003). So konnte zumindest für den Östrogenrezeptor (ER) gezeigt werden, dass das HSP90 den bei Mutation in der Ligandenbindungsdomäne entstehenden Bindungsverlust für den Liganden anteilig ausgleichen kann (Aumais et al., 1997). Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den AR ist wegen der Homologie in der Gruppe der Steroidrezeptoren, trotz eines anderen HRE des ERs, anzunehmen. Bei der Mutation R855H des AR verbessert der Coaktivator TIF-2 die verminderte N/C-terminale Interaktionen zum Teil (Skordis et al. 2005). Ein FXXLF-Motiv ist bei der Interaktion des ARs mit einigen Coaktivatoren (ARA70, ARA55, ARA54, FHL2) von funktioneller Bedeutung (Heinlein und Chang 2002, Zhou et al. 2002). Importin alpha bindet ähnlich SV40 für den ligandenabhängigen Transport an das Kernlokalisierungssignal (Cutress et al. 2008). Für die Mutation M780I beschrieben Knoke et al. eine inverse Beziehung von Transkriptionsaktivität und Länge des CAG-Wiederholungselementes (1999). Für eine andere Punktmutation in der Hinge-Region (A645D) zeigten Werner et al., dass bei einem kurzen GGN-Wiederholungselement ein kurzes CAG-Wiederholungselement die reduzierte Transkriptionsaktivität auf AR-WT-Niveau *in vitro* erhöhen kann (2006). Dies sind nur Beispiele für Angriffsorte und Effekte von Cofaktoren und Interaktionen, welche in großer Vielfalt vorhanden sind und aktivierend oder inhibierend auf den Ablauf einwirken können (Gonzales MI et al. 2001).

Zusammenfassend sind Mutationen der LBD durch die von ihnen hervorgerufenen funktionellen Veränderungen von großer Bedeutung für den Transaktivierungsprozess. Sie haben entscheidenden Einfluss auf die Androgenbindungskapazität, die Stabilisierung des aktiven Transaktivierungskomplexes und die Interaktion mit Cofaktoren, welche für den Transkriptionserfolg unerlässlich sind. Sinkt die Androgenbindungskapazität, wird der Transaktivierungskomplex instabiler oder können die Cofaktoren nicht binden oder führen durch veränderte Bindung zu verminderter Aktivität, sinkt die Wahrscheinlichkeit eines Transkriptionserfolges durch die Transaktivierung.

5.2. Die AR-DNA-Bindung

Die drei verwendeten Reportergenkonstrukte sind nur ein artifizielles Modell für die natürlich vorkommenden Promotorregionen der Zielgene. Die HREs der Reportergenkonstrukte in dem hier dargestellten Versuchsaufbau sind nicht androgenspezifisch, sondern finden sich auch in Elementen, die Progesteron oder Glukokortikoide binden. Verantwortlich sind die zugrundeliegenden Aminosäuresequenzen. Die androgenspezifischen Sequenzen stellen sich nach Haelens (2003) wie folgt dar: XXXTGXnnnAXXXXX und sind bedeutend für die androgenspezifische Transkriptionskontrolle. Demgegenüber weist die für MRE, GRE, PRE und ARE übereinstimmende Sequenz die Aminosäurefolge GGTACAnnnTGTYCY auf (Truss und Beato 1993). Diese Aminosäure-Sequenz wird auch Konsensus-Sequenz genannt. Im Vergleich der Sequenzen finden sich große Ähnlichkeiten aller Reportergenkonstrukte zu der unspezifischen AS-Folge, so dass sie nicht für ein ARE repräsentativ sein können und wahrscheinlich eine geringere Affinität zur DBD zeigen als die AREs (Haelens et al. 2003). Die Affinität zur DBD korreliert nicht immer direkt mit der Transkriptionsaktivität *in vitro* (Nelson et al. 1999). Die die AREs flankierenden Sequenzen beeinflussen den Komplex aus AR-Homodimer, Hormon, Promotor, Enhancer, RNA-Polymerase II und Coaktivatoren (Hebbar PB et al. 2003, Préfontaine et al. 1999) im Sinne von weiteren Coaktivatoren (Haelens et al. 2003, Ham et al. 1988). Das Zusammenspiel aller um die AREs vorhandenen Faktoren führt *in vitro* und *in vivo* zu der differenzierten Wirkung der Androgene im Gewebe.

Trotz ihrer unspezifischen HREs zeigten die Reportergenkonstrukte *in vitro* sehr differenzierte Aktivierungsprofile. Am auffälligsten waren die Daten am (ARE)₂TATA-Promotor, der den Aktivierungsverlust der Konstrukte mit deutlicher Strukturänderung besonders hervorhebt. Dies ist an den Aktivierungsdaten der AR-Mutation M780I mit Stanazolol gut zu erkennen. Während die Mutation mit Testosteron, Dihydrotestosteron oder Androstendion eine hohe Aktivität zeigte, war in Kombination mit Stanazolol nur ein geringer Aktivitätsanstieg zu verzeichnen. Auf den Einfluss der dreidimensionalen Konstellation des Transkriptionskomplexes wurde in Zusammenhang der Mutationen mit der LBD bereits eingegangen. Für die verwendeten Promotoren lagen keine dreidimensionalen Modelle vor. MMTV wies in der Abfolge der HRE einen differenzierteren Aufbau als (ARE)₂TATA und GRE-Oct auf. Diese Komplexität zeigte sich auch in den Untersuchungen mit größerer Empfindlichkeit gegenüber den Umgebungsbedingungen und ließ gelegentlich Daten mit relativ großen

Standardabweichungen am MMTV-Promotor, beobachten. Die einzelnen HREs von MMTV sind der Konsensus-Sequenz sehr ähnlich. Im Komplex mit einer strukturell gering veränderten Mutation, wie R855H, und Androgenen zeigten diese ein hohes Transaktivierungspotential.

Auch die HREs des (ARE)₂TATA-Promotors stimmen zum großen Teil mit der Konsensus-Sequenz überein. Es kann angesichts der erhobenen Daten angenommen werden, dass durch den schlichten Aufbau dieses Reportergens weniger inhibierende Aktionen hervorgerufen wurden und somit alle Konstrukte eine hohe absolute Luciferaseaktivität zeigen konnten. Die Wildtyp-Aktivität lag deutlich über der der AR-Mutationen.

Angenommen die Übereinstimmung der HRE mit der Konsensussequenz und die Struktur des Promotors ließen eine Aussage über die Luciferaseaktivität zu, so wäre für den GRE-Oct-Promotor, der eine geringe Übereinstimmung seiner HREs mit der Konsensus-Sequenz aufweist, nur eine geringe Luciferaseaktivität zu erwarten. Dies bestätigt sich in unseren Ergebnissen. Für alle Konstrukte konnte nur ein geringes Maß der Transaktivierung gemessen werden. Dabei trat das Aktivierungsdefizit der Mutation V866M in Relation zu den anderen Mutationen weniger deutlich als bei den zuvor genannten Versuchen hervor. Die Struktur ist hier nur bedingt berücksichtigt. Der Aufbau des GRE-Oct-Promotors aus Untereinheiten ist bekannt (s. Material und Methoden), ein 3D-Modell existiert nicht. So sind sterische Beeinträchtigungen des Komplexes nur zu vermuten. Es kann jedoch festgehalten werden, dass keine Kombination von AR-Konstrukt und Ligand mit diesem Promotor zu einer hohen Änderung der Transaktivierung im Vergleich zu den Negativkontrollen ohne Ligand geführt hat, so dass eher der geringen Übereinstimmung der HRE mit der Konsensussequenz Bedeutung für den Transaktivierungsprozess zukommt.

5.3. Der Androgenrezeptor und die Liganden

Androgene üben ihre biologischen Wirkungen normalerweise über die Bindung zum AR als ligandenaktivierten Transkriptionsfaktor aus. Ist kein oder kein funktionstüchtiger AR vorhanden, ist es den Androgenen jedoch auch möglich, Effekte nicht-genomischer Art auszulösen, beispielsweise über second messenger wie Proteinkinase A und C (Lee und Chang 2003). Sie können auch an andere Steroidrezeptoren als den AR binden. Die hier

durchgeführten Voruntersuchungen zur AR-unabhängigen Aktivierung von Reportergenen schließen zumindest die zweite Variante für den gewählten Versuchsaufbau aus.

Liganden beeinflussen die zelluläre Lokalisation des ARs. Sie ermöglichen indirekt, über Verdrängung der Hitzeschockproteine (HSP) und Demaskierung des NLS, den Übertritt vom Cytoplasma in den Zellkern. Dabei ist die Transportgeschwindigkeit abhängig vom Liganden und dessen Konzentration (George 1997, Laudent und Gronemeyer). Sie steht außerdem unter dem Einfluss der LBD und kann bei Mutationen reduziert werden (Guiochon-Mantel et al. 1995). Die von den Liganden initiierte Phosphorylierung des ARs moduliert zudem die Transkriptionsaktivität (Heinlein und Chang 2002). Von Dotzlaw et al. (2003) wird angenommen, dass Liganden, Agonisten oder Antagonisten, nicht nur die Rezeptorkonformation, sondern auch die Funktion von Cofaktoren steuern. Die hier eingesetzten Liganden sind alle Agonisten, die die Transkription unterschiedlich stark aktivieren. Die Unterschiede in den Aktivierungsprofilen können durch Unterschiede in der Einbeziehung von Cofaktoren zustande kommen. Diese wurde hier nicht experimentell erfasst.

Schon lange beschäftigen sich Forscher mit den differenziellen Wirkungen der zwei bedeutenden physiologischen Androgene T und DHT am AR. Die kinetischen Unterschiede sind bekannt, DHT besitzt eine höhere Bindungsaffinität und eine geringere Dissoziationskonstante. Es wurde postuliert, dass DHT vor allem in spezifischen androgenen Zielgeweben seine Effekte zeigt, in welchen die Testosteronkonzentration zu niedrig ist, um den AR zu aktivieren (Deslypere et al. 1992), verstärkt würde dies durch die längere Wirkdauer des DHT durch die im Vergleich zu Testosteron günstigere Kinetik (McPhaul et al. 2001). Es ließ sich jedoch nicht in jeder Untersuchung durch eine Erhöhung der Testosteronkonzentration oder Erniedrigung der DHT-Konzentration derselbe Effekt des jeweils anderen Androgens erzielen. Hsiao et al. (2000) führten die T- bzw. DHT-spezifischen Wirkungen auf spezifische AREs und Cofaktoren für den T-AR- bzw. DHT-AR-Komplex zurück (McPhaul 2001).

Die strukturellen Differenzen von Stanazolol und dem hochpotenten DHT unterstützen die These der größten Konformationsänderung des AR-Konstruktes bei Anlagerung von Stanazolol. Auf die damit verbundene steigende Dissoziationsrate und verminderte N/C-terminale Interaktionen wurde bereits eingegangen.

Deslypere et al. nahmen eine Umwandlung von Androstendion zu Testosteron in den CHO-Zellen an (1992), so dass die für Androstendion gemessenen Aktivitäten durch Testosteron mitbewirkt worden sein könnten. Es ist bisher nicht bekannt, dass die CHO-

Zellen eine 17- β -Hydroxylase-Aktivität für diese Reaktion besäßen. In den vorgestellten Untersuchungen wurde in den transfizierten CHO-Zellen mit Androstendionzusatz die Bestimmung der Testosteronkonzentration nicht durchgeführt, so dass die Aussage hier weder bestätigt noch widerlegt werden kann.

Für den Versuchsaufbau kann von einem gleichmäßigen Transport des ligandengebundenen ARs in den Kern ausgegangen werden, im Westernblot zeigten sich für alle Konstrukte äquivalente Molekülmassen. Dieses ist auf Grund der Ligandenabhängigkeit bereits die erste Variable des Ablaufes. Cutress et al. (2008) untersuchten einen Cofaktor für den Kerntransport und stellten bei AR-Mutationen neben einer reduzierten Bindungskapazität für den Cofaktor und damit einhergehenden verminderten Kerntransport eine sehr variable Transkriptionsaktivität fest.

5.4. Das Zellkulturmodell – Möglichkeiten und Grenzen

In den hier beschriebenen Versuchen wurden CHO-Zellen mit dem Konstrukt des Androgenrezeptorwildtyps oder einer von vier Mutationen des Androgenrezeptors zusammen mit einem von drei Reportergenen transfiziert. Die Mutationen führten in vivo zu einem partiellen bis kompletten AIS. Die Reportergene dienten als Modell für natürlich vorkommende HREs, welche der Androgenrezeptor-DNA-Bindung dienen. Zur Messung der Transaktivierung waren die Plasmide mit der Information für eine Luciferase ausgestattet. CHO-Zellen exprimieren keinen endogenen Androgenrezeptor und können Testosteron nicht zu DHT umwandeln. Nach der Transfektion wurde den Zellkulturen eines der vier androgenen Hormone (T, DHT, Androstendion, Stanozolol) zugesetzt. Die Messung der Transaktivierungsaktivität erfolgte über die Bestimmung der Luciferaseaktivität in einem Luminometer. Damit war es möglich, den natürlichen Ablauf von der Aktivierung des Androgenrezeptors, die Einschleusung in den Zellkern, die Bindung an die DNA bis zur Umsetzung der genetischen Information auf der DNA nachzuvollziehen und quantitativ auszuwerten. Die Ergebnisse der Transaktivierung wiesen für jeden Liganden ein spezifisches Aktivierungsprofil auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass jeder Komplex aus AR und Ligand über spezielle sterische Änderungen zu einer für ihn typischen Aktivierung geführt hat.

Da der AR zunächst in die CHO-Zellen, die über keinen endogenen AR verfügen, transfiziert wurde, sollte die gleiche AR-Konzentration in jeder Versuchseinheit zur

Verfügung gestanden haben. Ein Maß dafür sind die Banden der AR-Konstrukte im Westernblot. Ebenso ist davon auszugehen, dass in allen Versuchseinheiten gleiche Konzentrationen der Promotoren vorhanden waren. Bezüglich der Liganden wurden von Hsiao et al. und Deslypere et al. trotz fehlender 5 α -Reduktase die Umwandlungen von Testosteron zu DHT in den CHO-Zellen beschrieben. Hsiao et al. ergänzten daher ihr Medium zu den Versuchen mit Testosteron mit Finasterid, einem selektiven 5 α -Reduktase-Inhibitor. Darunter ließ sich zum Teil eine niedrigere Aktivität unter Testosteron als ohne Finasterid nachweisen. Auf eine Zugabe von Finasterid wurde hier verzichtet, eine Untersuchung auf DHT in den mit Testosteron behandelten Zellen wurde nicht durchgeführt. So kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass ein Teil der für Testosteron gemessenen Transaktivierung durch DHT bedingt wurde. Deslypere et al. berichteten außerdem von nicht veröffentlichten Ergebnissen, bei welchen nach Zugabe von Stanozolol zu CHO-Zellen Testosteron nachzuweisen gewesen wäre. Das Vorhandensein einer 17- β -Hydroxysteroiddehydrogenase in CHO-Zellen ist bisher nicht beschrieben.

Die Promotoren sind in den hier vorgestellten Versuchen stellvertretend für die natürlich vorkommenden Promotoren ausgewählt. Es wurden drei verschiedene Promotoren ausgewählt, um die Variabilität und die differenzielle Aktivierung mit den Liganden deutlicher darstellen zu können. *In vivo* werden die Promotoren andere Strukturen aufweisen, welcher wiederum zu spezifischen Profilen der Transaktivierung durch die Interaktionen mit der DNA und weiteren beteiligten Faktoren führen werden.

Die Liganden sind natürlich vorkommende Hormone, von denen Testosteron und DHT in ihrer Funktion für die Ausbildung des Genitales bereits mehrfach untersucht wurden. Für alle Liganden konnte hier ein konzentrations- und promotorabhängiges spezifisches Aktivierungsprofil für jedes AR-Konstrukt festgestellt werden. Es wurde ein weiterer Konzentrationsbereich untersucht. *In vivo* liegen die Konzentrationen für Testosteron und DHT im einstelligen Nanomolar-Bereich. Mit den hier verwendeten Hormonkonzentrationen ist so eine Aussage über die Aktivität im sub- und supraphysiologischen Konzentrationsbereich möglich. Vor allem die Aktivität bei supraphysiologischen Konzentrationen ist sehr interessant für die weiteren Untersuchungen, da Hormonsubstitution *in vivo* eine Möglichkeit zum Defektausgleich oder Defektreduktion, beispielsweise bei verminderter Transaktivierung auf Grund einer Mutation des AR in der Ligandenbindungsdomäne, darstellen kann. Als Alternative zu den natürlich vorkommenden Hormonen wird gezielt nach selektiven Androgenrezeptor-

Modulatoren (SARM) gesucht (Yin et al. 2003). Sie sollen Androgenwirkungen am AR ersetzen oder verstärken können.

Es wurden hier ausgewählte AR-Konstrukte mit Punktmutation in der Ligandenbindungsdomäne untersucht. In der Auswertung wurde der Schwerpunkt auf die Ligandenbindung an das AR-Konstrukt gelegt. Die zu verzeichnenden Aktivitätsdefizite wurden mit Hilfe von 3D-Darstellungen diskutiert und sterische Veränderungen als Ursache der verminderten Transaktivierung beschrieben. Dieser spezielle Teil der Betrachtungen weicht *in vitro* wahrscheinlich nicht stark von dem Ablauf *in vivo* ab, da die direkt beteiligten Faktoren (AR, Ligand, LBD) die gleichen sind. Auf Grund der veränderten LBD ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine Schlüsselsituation des Transaktivierungsprozesses handelt.

Die weiteren Umgebungsbedingungen werden durch die Lokalisation des Prozesses *in vivo* bestimmt werden. Das Zellkulturmodell ermöglichte hier eine störungsarme Analyse des Transaktivierungsprozesses. Durch andere Zellen wird ein anderes Milieu wirksam werden und in den Transaktivierungsprozess in Form von veränderten Umgebungsbedingungen, Bindungsspezifitäten (Ho KC et al. 1993) differierenden Liganden und Cofaktoren eingreifen (Gonzales MI et al. 2001, Goo YH et al. 2004). Dies konnte hier nicht näher betrachtet werden, wird jedoch mitentscheidend für die Übertragung der hier gewonnen Erkenntnisse auf die natürlichen Abläufe und damit auf die Genotyp-Phänotyp-Korrelation sein.

Die Arbeitsgruppe Hiort, Lübeck, führte transiente Transfektionversuche in primären humanen Fibroblasten durch (Holterhus PM et al. 2004). Dabei konnten sowohl für AR-negative Fibroblasten eines CAIS-Patienten als auch für AR-positive Fibroblasten eine dem Phänotyp entsprechende Transaktivierungsaktivität gemessen werden. Für die Messung der Aktivität des intrinsischen AR der AR-positiven Fibroblasten war die Methode hingegen nicht geeignet.

Hannema et al. (2004) untersuchten mehrere mit CAIS verbundene Androgenrezeptormutationen hinsichtlich ihrer Aktivität im Genitalgewebe, darunter waren auch R855H und V866M. Als morphologisches Korrelat diente die Entwicklung von Wolf'schem Gang zu Nebenhoden und Samenleiter verglichen mit dem Entwicklungsstand der Strukturen männlicher Feten in der 16. - 20. Gestationswoche. Es zeigte sich, dass vor allem bei Aminosäuresubstitutionen im Bereich der LBD des AR entgegen der Annahme einer Regression der Strukturen bei einigen Mutationen eine Entwicklung über den Stand der 20. Gestationswoche nachzuweisen war. Dafür war eine residuelle Funktionstüchtigkeit des ARs notwendig. Erklärt wurde die Entwicklung der männlichen inneren Genitalien durch

eine lokal erhöhte Androgenkonzentration durch direkte Sekretion aus dem Hoden mit parakriner Wirkungsvermittlung im Gegensatz zur Abhängigkeit von der systemischen Androgenkonzentration der äußeren Genitalien. Außerdem spielen wahrscheinlich weitere Faktoren wie beispielsweise Coaktivatoren eine Rolle. Da es sich angesichts der männlichen inneren Genitale bei komplett weiblichem äußeren Genitale nicht um ein komplettes Androgenresistenzsyndrom handelte, schlugen die Autoren eine Erweiterung der Klassifikation des AIS um das schwere AIS vor, da definitionsgemäß das PAIS mit partiell männlichem äußeren Genitale einhergeht.

5.5. Ausblick

Die hier präsentierten experimentellen Ergebnisse zeigten an einem artifiziellen System, dass für die untersuchten AR-Mutationen spezifische Transaktivierungsprofile erhoben werden können. Es handelte sich bei dem von den AR-Mutationen bewirkten Ausmaß der Aktivierung des Transkriptionsprozesses an einem Reportergen nicht nur um eine rein quantitative Einschränkung gegenüber dem AR-Wildtyp. Viel mehr ließ sich die Transaktivierung einer Mutation als eine von dem Liganden, der Ligandenkonzentration und dem Promotor abhängige Eigenschaft der Mutation im Sinne eines verminderten Aktivierungsprofils beschreiben.

Die *in vitro* erhobenen Erkenntnisse zur Funktionalität der Mutationen des Androgenrezeptors könnten als Ausgangspunkt für die Erforschung des *in vivo* ablaufenden Transaktivierungsprozesses dienen. Mit dem Wissen um die mutationsspezifischen Expressionsdaten *in vitro* drängt sich die Frage nach den Liganden, Promotoren und Bedingungen im natürlichen Zielgewebe der Androgene auf. Um das Verständnis der Funktion des Androgenrezeptors und seiner Mutationen weiter zu verfeinern, könnten die hier in CHO-Zellen durchgeführten Versuche im genitalen Zielgewebe der Androgene untersucht werden. Dort kämen die natürlichen Promotoren zur Wirkung sowie die dort vorhandenen Ligandenkonzentrationen und Cofaktoren. Zur Ligandenkonzentration ist anzumerken, dass sich diese während der intrauterinen Entwicklung des Genitales wie auch im weiteren Leben ändert, was in den Experimenten berücksichtigt werden müsste. Außerdem ließe sich die Wirkung von künstlich veränderten Liganden oder selektiven Androgenrezeptormodulatoren studieren.

Wie entscheidend die Bedingungen im Zielgewebe die Untersuchungsergebnisse beeinflussen können, zeigten Holterhus et al. (2007). Sie stießen bei der Erforschung der

unterschiedlichen androgenabhängigen Genexpressionsmuster von phänotypisch männlichen 46,XY Individuen und phänotypisch weiblichen 46,XY-Individuen mit CAIS mittels Microarray-Analysen auf den Einfluss der Topologie der Zellen. Nachdem die Fibroblasten zunächst von der Vorhaut bzw. den Labia majora stammten, die verschiedene embryonale Ursprünge (Genitalhöcker bzw. Labialwülste) aufweisen, veränderten sich die Differenzen in den Expressionsmustern bei der Nutzung von Fibroblasten des gleichen embryonalen Ursprungs. Ferner legten die Ergebnisse nahe, dass die Genexpressionsprofile von Genitalhautfibroblasten mit dem Phänotyp korrelieren und so als diagnostischer Marker genutzt werden könnten.

Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation beschäftigt die meisten Arbeiten mit dem AR. Die aktuellen funktionellen Untersuchungen mit AR-Konstrukten mit Mutationen an den Aminosäuren 754 und 690 von Tadokoro et al. (2009) bestätigen die These dieser Korrelation. Zuccarello et al. (2008) schlossen aus detaillierten funktionellen Untersuchungen mit AR-Mutationen, die zu unterschiedlich schweren AIS führen, dass Standarduntersuchungen wie Westernblot, Elektrophorese und Hormon-Response-Kurven nur für schwere AR-Mutationen ausreichende Aussagen zu dieser Korrelation ermöglichen. Mit milderen AIS-Formen assoziierte AR-Mutationen müssten dagegen einer weitreichenden Diagnostik mit vielen verschiedenen Reportergenkonstrukten unterzogen werden. Einen weiteren Schritt gingen Szafran et al. (2008), die auf der Ebene der einzelnen Zelle mittels „high throughput imaging“, welches von ihrer Arbeitsgruppe 2006 (Marcelli et al.) vorgestellt worden war, den Einfluss von Liganden, Zellzyklus und mutationsspezifischen Effekten auf die AR-Funktion analysierten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die genannten Faktoren das Transkriptionsergebnis spezifisch beeinflussen und konnten Angaben zu den Interaktionen verschiedener Faktoren machen. Dies sei mittels der angewandten Methode simultan darstellbar, wobei die Aussagekraft der Einzelzell-Untersuchung mit intrazellulärer Darstellung der Prozesse weit über die der bisherigen Fluoreszenzmikroskopie hinausgehe. Als nächster Schritt werden Untersuchungen an Genitalhautfibroblasten durchgeführt werden. Eine Anwendungsmöglichkeit werde in einer individuell auf den Patienten zugeschnittenen Therapie bei AR-bedingten Erkrankungen wie dem AIS gesehen.

Dass bei der exakten Bestimmung dieser Korrelation eine akribische Charakterisierung der AR-Mutationen unerlässlich sein wird, zeigten erneut Analysen an AR-Konstrukten mit Mutationen in der LBD von Werner et al. (2008).

Als ein potentieller und spezifischer Marker der Funktion des AR hat sich Apolipoprotein D in Microarray-Analysen erwiesen (Appari et al. 2009), der zukünftig eine funktionsbasierte diagnostische Evaluation des AIS ermöglichen könnte. Er würde zur Differenzierung zwischen AR-bedingtem und beispielsweise durch Enzymdefekte bedingtem AIS dienen.

Nachdem bereits humane Genitalhautfibroblasten für Transfektionsuntersuchungen und Aktivierungsstudien genutzt werden, sind Tiermodelle ein weiterer Schritt zur Beurteilung der Wirkung von AR-Mutationen während der Embryogenese. Angenommen, die hier beobachteten Muster wären auch in diesem, dem natürlichen Ablauf der Genitalexpression näheren Modell, nachweisbar, wäre dies ein weiterer Schritt zum Verständnis der Korrelation von Genotyp und Phänotyp.

6. LITERATUR

Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, Hawkins JR, Martin H, Rowland J, Shimura N, Tait D, Hughes IA: Phenotypic features, androgen receptor binding and mutational analysis in 278 clinical cases as androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 658-665 (2000)

Appari M, Werner R, Wünsch L, Cario G, Demeter J, Hiort O, Riepe F, Brooks JD, Holterhus PM: Apolipoprotein D (APOD) is a putative biomarker of androgen receptor function in androgen insensitivity syndrome. *J Mol Med* 87(6): 623-632 (2009)

Aumais JP, Lee HS, Lin R, White JH: Selective interaction of hsp90 with an estrogen receptor ligand-binding domain containing a point mutation. *J Biol Chem* 272(18): 12229-12235 (1997)

Batch JA, Williams DM, Davies HR, Brown BD, Evans BAJ, Hughes IA, Patterson MN: Androgen receptor gene mutations identified by SSCP in fourteen subjects with androgen insensitivity syndrome. *Hum Mol Genetics* 1: 497-503 (1992)

Bauer ER, Daxenberger A, Petri T, Sauerwein H, Meyer HH: Characterisation of the affinity of different anabolics and synthetic hormones to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progestin receptor. *APMIS* 108(12): 838-846 (2000)

Berrevoets CA, Doesburg P, Steketee K, Trapman J, Brinkmann AO: Functional Interactions of the AF-2 Activation Domain Core Region of the Human Androgen Receptor with the Amino-Terminal Domain and with the Transcriptional Coactivator TIF2 (Transcriptional Intermediary Factor 2). *Mol Endocrinol* 12: 1172-1183 (1998)

Berrevoets CA, Umar A, Trapman J, Brinkmann AO: Differential modulation of androgen receptor transcriptional activity by the nuclear receptor co-repressor (N-CoR). *Biochem J* 379: 731-738 (2004)

Bevan CL, Brown BB, Davies HR, Evans BAJ, Hughes IA, Patterson MN: Functional analysis of six androgen receptor mutations identified in patients with partial androgen insensitivity syndrome. *Hum Mol Genet* 5: 265-273 (1996)

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523 (1979)

Boehmer AL, Brinkmann O, Brüggewirth H, van Assendelft C, Otten BJ, Verleun-Mooijman MC, Niermeijer MF, Brunner HG, Rouwé CW, Waelkens JJ, Oostdijk W, Kleijer WJ, van der Kwast TH, de Vroede MA, Drop SL. Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86(9): 4151-4160 (2001)

Bourguet W, Germain P, Gronemyer H: Nuclear receptor ligand-binding domains: Three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *TiPS* 21: 381-388 (2000)

Bouvattier C, Carel JC, Lecointre C, David A, Sultan C, Bertrand AM, Morel Y, Chaussain JL: Postnatal changes of T, LH, and FSH in 46,XY infants with mutations in the AR gene. *J Clin Endocrinol Metab* 87(1): 29-32 (2002)

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254 (1976)

Brennan J, Capel B: One tissue, two fates: molecular genetic events that underline testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 5(7): 509-521 (2004)

Brinkmann AO: Lessons to be learned from the androgen receptor. *Eur J Dermatol* 11(4): 301-303 (2001)

Brinkmann AO: Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 179(1-2): 105-109 (2001)

Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Steketee K, Berrevoets CA, Trapman J: Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69: 307-313 (1999)

Brinkmann AO, Jenster G, Ris-Stapler C, van der Korput JA, Brüggewirth HT, Boehmer AL, Trapman J: Androgen receptor mutations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6): 443-448 (1995)

Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, Willard HF: Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 44(2): 264-269 (1989)

Brown TR, Lubahn DB, Wilson EM, French FS, Migeon CJ, Corden JL: Functional characterization of naturally occurring mutant androgen receptors from subjects with complete androgen insensitivity. *Mol Endocrinol* 4(12): 1759-1772 (1990)

Brown TR, Scherer PA, Chang YT, Migeon CJ, Ghirri P, Muroto K, Zhou Z: Molecular genetics of human androgen insensitivity. *Eur J Pediatr* 152 Suppl 2: 62-69 (1993)

Brown TR, Rothwell SW, Migeon CJ: Comparison of methyltrienolone and dihydrotestosterone binding and metabolism in human genital skin fibroblasts. *J Steroid Biochem* 14: 1013-1022 (1981)

Brüggenwirth HT, Boehmer ALM, Lobaccaro JM, Chiche L, Sultan C, Trapman J, Brinkmann AO: Substitution of Ala⁵⁶⁴ in the First Zinc Cluster of the Deoxyribonucleic Acid (DNA)-Binding Domain of the Androgen Receptor by Asp, Asn or Leu Exerts Differential Effects on DNA Binding. *Endocrinology* 139: 103-110 (1998)

Brüggenwirth HT, Boehmer AL, Ramnarain S, Verleun-Mooijman MC, Satijn DP, Trapman J, Grootegoed JA, Brinkmann AO. Molecular analysis of the androgen-receptor gene in a family with receptor-positive partial androgen insensitivity: an unusual type of intronic mutation. *Am J Hum Genet* 61(5): 1067-1077 (1997)

Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(19): 7211-7215 (1988)

Chang et al: 73rd Endo Soc Meeting Abstr 28, 1991

Chen S, Wang J, Yu G, Liu W, Pearce D: Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. *J Biol Chem* 272 (22): 14087-14092 (1997)

Claessens F, Gewirth DT: DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem* 40: 59-72 (2004)

Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W: Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76(1-5): 23-30 (2001)

Cutress ML, Whitaker HC, Mills IG, Stewart M, Neal DE: Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J Cell Sci* 121(7): 957-968 (2008)

Dai JL, Burnstein KL: Two androgen response elements in the androgen receptor coding region are required for cell-specific up-regulation of receptor messenger RNA. *Mol Endocrinol* 10(12): 1582-1594 (1996)

Deeb A, Jääskeläinen J, Dattani M, Whitaker HC, Costigan C, Hughes IA: A novel mutation in the human androgen receptor suggests a regulatory role for the hinge region in amino-terminal and carboxy-terminal interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 93(10): 3691-3696 (2008)

Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ: Testosterone and 5 α -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol* 88: 15-22 (1992)

Doesburg P, Kuil CW, Berrevoets CA, Steketee K, Faber PW, Mulder E, Brinkmann AO, Trapman J: Functional in vivo interaction between the amino-terminal, transactivation domain and the ligand binding domain of the androgen receptor. *Biochemistry* 36: 1052-1064 (1997)

Dotzlaw H, Papaioannou M, Moehren U, Claessens F, Baniahmad A: Agonist-Antagonist induced coactivator and corepressor interplay on the human androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 213 (1): 79-85 (2003)

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14863-14868 (1998)

Elhaji YA, Wu JH, Gottlieb B, Beitel LK, Alvarado C, Batist G, Trifiro MA: An examination of how different mutations at arginine 855 of the androgen receptor result in different androgen insensitivity phenotypes. *Mol Endocrinol* 18(8): 1876-1886 (2004)

Elhaji YA, Stoica I, Dennis S, Purisima EO, Lumbroso R, Beitel LK, Trifiro MA: Impaired helix 12 dynamics due to proline 892 substitutions in the androgen receptor are associated with complete androgen insensitivity. *Human Molecular Genetics* 15(6): 921-931 (2006)

Elhaji et al. 83rd US Endo Soc Meeting, Abstr P2-37, 2001

Fang Y, Fliss AE, Robins DM, Caplan AJ: Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo. *J Biol Chem* 271(45): 28697-28702 (1996)

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

Galli-Tsinopoulou A, Hiort O, Schuster T, Messer G, Kuhnle U: A novel point mutation in the hormone binding domain of the androgen receptor associated with partial and minimal androgen insensitivity syndrome. *J Ped Endocrin Metab* 16: 149-154 (2003)

George FW: Androgen metabolism in the prostate of the finasteride-treated, adult rat: a possible explanation for the differential action of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone during development of the male urogenital tract. *Endocrinology* 138(3): 871-877 (1997)

Gobinet J, Poujol N, Sultan C: Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 198(1-2): 15-24 (2002)

Gonzales MI, Robins DM: Oct-1 preferentially interacts with androgen receptor in a DNA-dependent manner that facilitates recruitment of SRC-1. *J Biol Chem* 276(9): 6420-6428 (2001)

Goo YH, Na SY, Zhnag H, Xu J, Hong SH, Cheong JH, Lee SK, Lee JW: Interactions between Activating Signal Cointegrator-2 and the Tumor Suppressor Retinoblastoma in Androgen Receptor Transactivation. *J Biol Chem* 279(8): 7131-7135 (2004)

Guiochon-Mantel A, Savouret JF, Quignon F, Delabre K, Milgrom E, De The H: Effect of PML and PML-RAR on the transactivation properties and subcellular distribution of steroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 9(12): 1791-1803 (1995)

Gottlieb B, Beitel LK, Wu J, Elhaji YA, Trifiro M: The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat* 23(6): 527-533 (2004)

Haelens A, Verrijdt G, Callewaert L, Christiaens V, Schauwaers K, Peeters B, Rombauts W, Claessens F: DNA recognition by the androgen receptor: evidence for an alternative DNA-dependent dimerization, and an active role of sequences flanking the response element on transactivation. *Biochem J* 369: 141-151 (2003)

Ham J, Thomson A, Needham M, Webb P, Parker M: Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumor virus. *Nucleic Acids Res* 16(12): 5263-5276 (1988)

Hannema SE, Scott IS, Hodapp J, Martin H, Coleman N, Schwabe JW, Hughes IA: Residual activity of mutant androgen receptors explains wolffian duct development in the complete androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrin Metab* 89(11): 5815-5822 (2004)

He B, Kemppainen JA, Voegel JJ, Gronemeyer H, Wilson EM: Activation Function 2 in the Human Androgen Receptor Ligand Binding Domain Mediates Interdomain Communication with the NH₂-terminal Domain. *J Biol Chem* 274(52): 37219-37225 (1999)

He B, Kemppainen JA, Wilson EM: FXXLF and WXXLF Sequences mediate the NH₂-terminal Interaction with the Ligand Binding Domain of the Androgen Receptor. *J Biol Chem* 275(30): 22986-22994 (2000)

Hebbbar PB, Archer TK: Nuclear factor 1 is required for both hormone-dependent chromatin remodeling and transcriptional activation of the mouse mammary tumor virus promoter. *Mol Cell Biol* 23(3): 887-898 (2003)

Heinlein CA, Chang C: Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview. *Endocrine Rev* 23(2): 175-200 (2002)

Hiort O, Holterhus PM: Androgen insensitivity and male infertility. *Int J Androl* 26: 16-20 (2003)

Hiort O, Holterhus PM: The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrin* 142: 101-110 (2000)

Hiort O, Holterhus PM, Nitsche EM: Physiology and pathophysiology of androgen action. *Bailliere's Clin Endocrin Metab* 12(1): 115-132 (1998)

Hiort O, Holterhus PM, Sinnecker GHG, Kruse K: Androgenresistenzsyndrome – Klinische und molekulare Grundlagen. *Deutsches Ärzteblatt* 96: 686-692 (1999)

Hiort O, Sinnecker GH, Holterhus PM, Nitsche EM, Kruse K. Inherited and de novo androgen receptor gene mutations: investigation of single-case families. *J Pediatr* 132(6): 939-43 (1998)

Hiort O, Sinnecker GHG, Holterhus PM, Nitsche EM, Kruse K: The clinical and molecular spectrum of androgen insensitivity syndromes. *Am J Med Genetics* 63: 218-222 (1996)

Hiort O, Wodtke A, Struve D, Zöllner A, Sinnecker GHG: Detection of point mutations in the androgen receptor gene using non-isotopic single strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mol Genet* 7(3): 1163-1166 (1994)

Ho KC, Marschke KB, Tan JA, Power SGA, Wilson EM, French FS: A Complex Response Element in Intron 1 of the Androgen-regulated 20-kDa Protein Gene Displays Cell Type-dependent Androgen Receptor Specificity. *J Biol Chem* 266(36): 27226-27235 (1993)

Holterhus PM, Brüggewirth HT, Hiort O, Kleinkauf-Houcken A, Kruse K, Sinnecker GHG, Brinkmann AO: Mosaicism due to a somatic mutation of the androgen receptor gene determines phenotype in androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82(11): 3584-3589 (1997)

Holterhus PM, Deppe U, Werner R, Richter-Unruh A, Bebermeier JH, Wünsch L, Krege S, Schweikert HU, Demeter J, Riepe F, Hiort O, Brooks JD: Intrinsic androgen-dependent gene expression patterns revealed by comparison of genital fibroblasts from normal males and individuals with complete and partial androgen insensitivity syndrome. *BMC Genomics* 8:376 (2007)

Holterhus PM, Hiort O, Demeter J, Brown PO, Brooks JD: Differential gene-expression patterns in genital fibroblasts of normale males and 46,XY females with androgen insensitivity syndrome: evidence for early programming involving the androgen receptor. *Genome Biology* 4(6): R37 (2003)

Holterhus PM, Piefke S, Hiort O: Anabolic steroids, testosterone-precursors and virilizing androgens induce distinct activation profiles of androgen responsive promoter constructs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82: 269-275 (2002)

Holterhus PM, Salzburg J, Werner R, Hiort O: Transactivation Properties of Wild-Type and Mutant Androgen Receptors in Transiently Transfected Primary Human Fibroblasts. *Horm Res* 63: 152-158 (2005)

Holterhus PM Sinnecker GHG, Hiort O: Phenotypic diversity and testosterone-induced normalization of mutant M780I androgen receptor function in a kindred with androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3245-3250 (2000)

Holterhus PM, Wiebel J, Sinnecker GHG, Brüggewirth HT, Sippel WG, Brinkmann AO, Kruse K, Hiort O: Clinical and Molecular Spectrum of Somatic Mosaicism in Androgen Insensitivity Syndrome. *Pediatr Res* 46: 684-690 (1999)

Hong H, Fang H, Xie Q, Perkins R, Sheehan DM, Tong W: Comparative molecular field analysis (CoMFA) model using a large diverse set of natural, synthetic and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *SAR and QSAR in Environmental Research* 14(5-6): 373-388 (2003)

Hsiao P, Thin TH, Lin D, Chang C: Differential regulation of testosterone vs. 5 α -dihydrotestosterone by selective androgen response elements. *Mol Cell Biochem* 206: 169-175 (2000)

<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm> (Januar 2009)

<http://www.androgendb.mcgill.ca> (Januar 2009)

Hu X, Funder JW: The evolution of mineralocorticoid receptors. *Mol Endocrinol* 20(7): 1471-1478 (2006).

Hur E, Pfaff SJ, Payne ES, Grøn H, Buehrer BM, Fletterick RJ: Recognition and Accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface. *PLOS Biology* 2(9): 1303-1312 (2004)

Hughes IA: Diversity in development actions of androgens. *Clin Endocrinol* 54(6): 707-708 (2001)

Hughes IA, Lim HN, Martin H, Morgan NP; Dovey L, Ahmed SF, Hawkins JR: Developmental aspects of androgen action. *Mol Cell Endocrinol* 185: 33-41 (2001)

Hyytinen ER, Haapala K, Thompson J, Lappalainen I, Roiha M, Rantala I, Helin HJ, Jänne OA, Vihinen M, Palvimo JJ, Koivisto PA. Pattern of somatic androgen receptor gene mutations in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Lab Invest* 82(11): 1591-1598 (2002)

Jakubiczka S, Nedel S, Werder EA, Schleiermacher E, Theile U, Wolff G, Wieacker P: Mutations of the Androgen Receptor Gene in Patients With Complete Androgen Insensitivity. *Hum Mut* 9: 57-61 (1997)

Jänne OA, Palvimo JJ, Kallio P, Mehto M: Androgen Receptor and Mechanism of Androgen Action. *Ann Med* 25: 83-89 (1993)

Jääskeläinen J, Deeb A, Schwab JW, Mongan NP, Martin H, Hughes IA: Human androgen receptor gene ligand-binding-domain mutations leading to disrupted interaction between the N- and C-terminal domains. *J Mol Endocrinol* 36(2): 361-368 (2006)

Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO: Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem J* 293(3): 761-768 (1993)

Jenster G, Spencer TE, Burcin MM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: Steroid receptor induction of gene transcription: A two-step model. *PNAS* 94: 7879-7884 (1997)

Jenster G, van der Korput HAGM, Trapman J, Brinkmann AO: Identification of Two Transcription Activation Units in the N-terminal Domain of the Human Androgen Receptor. *J Biol Chem* 270(13): 7341-7346 (1995)

Jenster G, van der Korput HA, van Vroonhoven C, van der Kwast TH, Trapman J, Brinkmann AO: Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 5(10):1396-1404 (1991)

Kazemi-Esfarjani P, Beitel LK, Trifiro M, Kaufmann M, Rennie P, Sheppard P, Matusik R, Pinsky L: Substitution of Valine-865 by Methionine or Leucine in the Human Androgen Receptor Causes Complete Androgen Insensitivity, Respectively with Distinct Androgen Receptor Phenotypes. *Mol Endocrinol* 7: 37-46 (1993)

Keenan BS, Meyer WJ 3rd, Hadjian AJ, Jones HW, Migeon CJ. Syndrome of androgen insensitivity in man: absence of 5 alpha-dihydrotestosterone binding protein in skin fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 38(6):1143-1146 (1974)

Kemppainen JA, Lane MV, Sar M, Wilson EM: Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport and transcriptional activation. *J Biol Chem* 267(2): 968-974 (1992)

Kemppainen JA, Langley E, Wong CI, Bobseine K, Kelce WR, Wilson EM: Distinguishing Androgen Receptor Agonists and Antagonists: Distinct Mechanisms of Activation by Medroxyprogesterone Acetate and Dihydrotestosterone. *Mol Endocrinol* 13: 440-454 (1999)

Kennedy WR, Alter M, Sung JH: Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. A sex-linked recessive trait. *Neurology* 18(7): 671-680 (1968)

Knoke I, Allera A, Wieacker P: Significance of the CAG repeat length in the androgen receptor gene (AR) for the transactivation function of an M780I mutant AR. *Hum Genet* 104: 257-261 (1999)

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685 (1970)

La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352(6330): 77-79 (1991)

Laudent V, Gronemeyer H: *The Nuclear Receptor FactsBook*. Academic press, London, UK, 2001, ISBN 0124377351

Ledig S, Jakubiczka S, Neulen J, Aulepp U, Burck-Lehmann U, Mohnike K, Thiele H, Zierler H, Brewer C, Wieacker P: Novel and recurrent mutations in patients with androgen insensitivity syndromes. *Horm Res* 63(6): 263-269 (2005).

Lee HJ, Chang C: Recent advances in androgen receptor action. *CMLS* 60: 1613-1622 (2003)

Lee JW, Lee YC, Na SY, Jung DJ, Lee SK: Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. *CMLS* 58: 289-297 (2001)

Liu GZ, Wang H, Wang Z: Identification of a Highly Conserved Domain in the Androgen Receptor That Suppresses the DNA-binding Domain-DNA Interactions. *J Biol Chem* 278(17): 14956-14960 (2003)

Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, French FS, Wilson EM: The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol* 2(12): 1265-1275 (1988)

Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon CL, Wilson EM, French FS: Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and the identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *PNAS* 86: 9534-9538 (1989)

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM: The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell* 83: 835-839 (1995)

Marcelli M, Ittmann M, Mariani S, Sutherland R, Nigam R, Murthy L, Zhao Y, DiConcini D, Puxeddu E, Esen A, Eastham J, Weigel NL, Lamb DJ: Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 60(4): 944-949 (2000)

Marcelli M, McPhaul MJ: Clinical and molecular basis of androgen resistance. *Recent Prog Med* 83(11): 605-613 (1992)

Marcelli M, Stenoien DL, Szafran AT, Simeoni S, AgoulNIK IU, Weigel NL, Moran T, Mikic I, Price JH, Mancini MH: Quantifying effects of ligands on androgen receptor nuclear translocation, intranuclear dynamics and solubility. *J Cell Biochem* 98(4): 770-780 (2006)

Marcelli M, Tilley WD, Zoppi S, Griffin JE, Wilson JD, McPhaul MJ: 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* 73(2): 318-325 (1991)

Marcelli M, Zoppi S, Wilson CM, Griffin JE, McPhaul MJ: Amino acid substitutions in the hormone-binding domain of the human androgen receptor alter the stability of the hormone receptor complex. *J Clin Invest* 94(4): 1642-1650 (1994)

Matias PM, Donner P, Coelho R, Thomaz M, Peixoto C, Macedo S, Otto N, Joschko S, Scholz P, Wegg A, Bäsler S, Schäfer M, Egner U, Carrondo MA: Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 275(34): 26164-26171 (2000)

McPhaul MJ: Factors that Mediate and Modulate Androgen Action. *JID Symposium Proceedings* 8: 1-5 (2003)

McPhaul MJ, Marcelli M, Tilley WD, Griffin JE, Wilson JD: Androgen resistance caused by mutations in the androgen receptor gene. *FASEB* 5: 2910-2915 (1991)

McPhaul MJ, Marcelli M, Zoppi S, Griffin JE, Wilson JD: The Spectrum of Mutations in the Androgen Receptor Gene that Causes Androgen Resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 17-23 (1993)

McPhaul MJ, Marcelli M, Zoppi S, Wilson CM, Griffin JE, Wilson JD: Mutations in the Ligand-binding Domain of the Androgen Receptor Gene Cluster in Two Regions of the Gene. *J Clin Invest* 90: 2097-2101 (1992)

McPhaul MJ, Young M: Complexities of androgen action. *J Am Acad Dermatol* : S87-S94 (2001)

Melo KF, Mendonça BB, Billerbeck AE, Costa EM, Inácio M, Silva FA, Leal AM, Latronico AC, Arnhold IJ: Clinical, hormonal, behavioural, and genetic characteristics of androgen insensitivity syndrome in a Brazilian cohort: five novel mutations in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 88(7): 3241-50 (2003)

Melo KF, Mendonça BB, Billerbeck AE, Costa EM, Latronico AC, Arnhold IJ: Androgen insensitivity syndrome: clinical, hormonal and molecular analysis of 33 cases. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 49(1): 87-97 (2005).

Nelson CC, Hendy SC, Shukin RJ, Cheng H, Bruchovsky N, Koop BF Rennie PS: Determinants of DNA Sequence Specificity of the Androgen, Progesterone, and Glucocorticoid Receptors: Evidence for Differential Steroid Receptor Response Elements. *Mol Endocrinol* 13: 2090-2107 (1999)

Nitsche EM, Hiort O: The molecular basis of androgen insensitivity. *Horm Res* 54: 327-333 (2000)

Ong YC, Wong HB, Adaikan G, Yong EL: Directed pharmacological therapy of ambiguous genitalia due to an androgen receptor gene mutation. *Lancet* 354: 1444-1445 (1999)

Pinsky L, Trifiro M, Kaufman M, Beitel LK, Mhatre A, Kazemi-Esfarjani P, Sabbaghian N, Lumbroso R, Alvarado C, Vasiliou M: Androgen resistance due to mutation of the androgen receptor. *Clin Invest Med* 15(5): 456-472 (1992)

Poujol N, Wurtz JM, Tahiri B, Lumbroso S, Nicolas JC, Moras D, Sultan C: Specific recognition of androgens by their nuclear receptor. *J Biol Chem* 275(31): 24022-24031 (2000)

Préfontaine GG, Walther R, Giffin W, Lemieux ME, Pope L, Haché RJG: Selective binding of steroid hormone receptors to octamer transcription factors determines transcriptional synergism at the mouse mammary tumor virus promoter. *J Biol Chem* 274(38): 26713-26719 (1999)

Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS: Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocrine Rev* 16(3): 271-321 (1995)

Reid KJ, Hendy SC, Saito J, Sorensen P, Nelson CC: Two Classes of Androgen Receptor Elements Mediate Cooperativity through Allosteric Interactions. *J Biol Chem* 276(4): 2943-2952 (2001)

Rodien P, Mebarki F, Mowszowicz I, Chaussain JL, Young J, Morel Y, 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* 81: 2994-2998 (1996)

Rosenfeld MG, Glass CK: Coregulator Codes of Transcriptional Regulation by Nuclear Receptors. *J Biol Chem* 276(10): 36865-36868 (2001)

Sack JS, Kish KF, Wang C, Attar RM, Kiefer SE, An Y, Wu GY, Scheffler JE, Salvati ME, Krystek SR, Weinmann R, Einspahr HM: Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *PNAS* 98(9): 4904-4909 (2001)

Sambrook, Russel: *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 3d Edition, Cold Spring, Harbour Laboratory, 2001

Schaufele F, Carbonell X, Guerbador M, Borngraeber S, Chapman MS, Ma AAK, Miner JN, Diamond MI: The structural basis of androgen receptor activation: Intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *PNAS* 102(28): 9802-9807 (2005)

Schoenmakers E, Alen P, Verrijdt G, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W, Claessens F: Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains. *Biochem J* 341(3): 515-521 (1999)

Schoenmakers E, Verrijdt G, Peteers B, Verhoeven G, Rombauts W, Claessens F: Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *J Biol Chem* 275(16): 12290-12297 (2000)

Shaffer PL, Jivan A, Dollins DE, Claessens F, Gewirth DT: Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *PNAS* 101(14): 4758-4763 (2004)

Shang Y, Myers M, Brown M: Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell* 9: 601-610 (2002)

Sinnecker GH, Hiort O, Nitsche EM, Holterhus PM, 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* 156(1): 7-14 (1997)

Skordis N, Lumbroso S, Perikleous M, Sismani C, Patsalis PC, Sultan C: Complete Androgen Insensitivity Syndrome Caused by the R855H Mutation in the Androgen Receptor Gene. *J Ped Endocrin Metab* 18: 309-313 (2005)

Steketee K, Berrevoets CA, Dubbink HJ, Doesburg P, Hersmus R, Brinkmann AO, Trapman J: Amino-acids 3-13 and amino acids in and flanking the ²³FxxLF²⁷ motif modulate the interaction between the N-terminal and ligand-binding domain of the androgen receptor. *Eur J Biochem* 269: 5780-5791 (2002)

Sultan C, Paris F, Terouanne B, Balaguer p, Georget V, Poujol N, Jeandel C, Lumbroso S, Nicolas JC: Disorders linked to insufficient androgen action in male children. *Human Reproduction Update* 7(3): 314-322 (2001)

Szafran AT, Szwarc M, Marcelli M, Mancini MA: Androgen receptor functional analyses by high throughput imaging: determination of ligand, cell cycle, and mutation-specific effects. *PLoS One*. 3(11):e3605 (2008)

Tadokoro R, Bunch T, Schwabe JW, Hughes IA, Murphy JC: Comparison of the molecular consequence of different mutations at residue 745 and 690 of the androgen receptor (AR) and androgen insensitivity syndrome (AIS) phenotype. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 71(2):253-260 (2009)

Takahashi H, Furusato M, Allsbrook WC JR, Nishii H, Wakui S, Barrett JC, Boyd J: Prevalence of androgen receptor gene mutations in latent prostatic carcinomas from Japanese men. *Cancer Res* 55(8): 1621-1624 (1995)

Thigpen AE, Cala KM, Russell DW: Characterization of Chinese hamster ovary cell lines expressing human steroid 5 alpha-reductase isozymes. *J Biol Chem* 268(23): 17404-17412 (1993)

Trapman J, Klaassen P, Kuiper GG, van der Korput JA, Faber PW, van Rooij HC, Geurts van Kessel A, Voorhorst MM, Mulder E, Brinkmann AO: Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 153(1): 241-8 (1988)

Truss M, Beato M: Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 14(4): 459-479 (1993)

Thyen U, Lanz K, Holterhus PM, Hiort O: Epidemiology and initial management of ambiguous genitalia at birth in Germany. *Horm Research* 66(4): 204-205 (2006)

Verrijdt G, Haelens A, Claessens F: Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. *Mol Gen Metab* 78(3): 175-185 (2003)

Weidemann W, Linck B, Haupt H, Mentrup B, Romalo G, Stockklauser K, Brinkmann AO, Schweikert HU, Spindler KD: Clinical and biochemical investigations and molecular analysis of subjects with mutations in the androgen receptor gene. *Clin Endocrinology* 45: 733-739 (1996)

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

Werner R, Zhan J, Gesing J, Struve D, Hiort O: In-vitro characterization of androgen receptor mutations associated with complete androgen insensitivity syndrome reveals distinct functional deficits. *Sex Dev* 2(2): 73-83 (2008)

Wieacker PF, Knoke I, Jakubiczka S: Clinical and molecular aspects of androgen receptor defects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106: 446-452 (1998)

Wilson JD, Griffin JE, Russell DW: Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev* 14(5): 577-93 (1993)

Wong CI, Zhou ZX, Sar M, Wilson EM : Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH₂-terminal and steroid-binding domains. *J Biol Chem* 268(25): 19004-19012 (1993)

Yen PM, Liu Y, Palvimo JJ, Trifiro M, Whang J, Pinsky L, Jänne OA, Chin WW: Mutant and Wild-Type Androgen Receptors Exhibit Cross-Talk on Androgen-, Glucocorticoid- and Progesterone-Mediated Transcription. *Mol Endocrinol* 11: 162-171 (1997)

Yin D, Gao W, Kearby JD, Xu H, Chung K, He Y, Marhefka CA, Veverka KA, Miller DD, Dalton JT: Pharmacodynamics of selective androgen receptor modulators. *J Pharmacol Exp Ther* 304(3): 1334-1340 (2003)

Zhou ZX, He B, Hall SH, Wilson EM, French FS: Domain Interactions between Coregulator ARA₇₀ and the Androgen Receptor (AR). *Mol Endocrinol* 16(2): 287-300 (2002)

Zhou ZX, Lane MV, Kemppainen JA, French FS, Wilson EM: Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol* 9(2): 208-218 (1995)

Zhou ZX, Sar M, Simental JA, Lane MV, Wilson EM: A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. *J Biol Chem* 269(18): 13115-13123 (1994)

Zuccarello D, Ferlin A, Vinanzi C, Prana E, Garolla A, Callewaert L, Classens F, Brinkmann AO, Foresta C: Detailed functional studies an androgen receptor mild mutations demonstrate their association with male infertility. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 68(4): 580-588 (2008)

7. ANHANG

7.1. LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

JENNY SCHÜTT

* 31.12.1979 in Bergen auf Rügen

SCHULISCHE AUSBILDUNG

09/86-08/91 64. Polytechnische Oberschule Rostock

09/91-07/98 Christophorus-Gymnasium Rostock

07/98 Allgemeine Hochschulreife

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

10/98-09/01 Studium der Humanmedizin, Universität Rostock

10/01-11/05 Studium der Humanmedizin, Universität Lübeck

07/02-09/04 Experimentelle Datenerhebung für die Dissertation

PUBLIKATIONEN/POSTER

SCHÜTT J, WERNER R, RÖPKE A, WIEACKER P, HIORT O, HOLTERHUS PM:
Unterschiedliche natürliche Mutationen der Ligandenbindungsdomäne des
Androgenrezeptors verursachen qualitativ spezifische Aktivierungsprofile
androgenregulierter Reportergene. Poster, Kongress der Arbeitsgemeinschaft für
pädiatrische Endokrinologie (APE), 2003

WERNER R, SCHÜTT J, HANNEMA S, RÖPKE A, WIEACKER P, HIORT O, HOLTERHUS PM:
Androgen receptor gene mutations in androgen insensitivity syndrome cause distinct
patterns of reduced activation of androgen-responsive promoter constructs. J Steroid
Biochem Mol Biol. 101(1):1-10, 2006

7.2. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde an der Kinderklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein/Campus Lübeck im Rahmen der von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Forschergruppe „Intersexualität – vom Gen zur Geschlechtsidentität“ durchgeführt. Ich danke allen an dem Erfolg dieser Dissertation Beteiligten herzlich.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus für den theoretischen Rahmen und Hintergrund des Themas, die Betreuung der wissenschaftlichen Arbeit, die kreativen Anregungen sowie die sehr aufmerksame und freundliche Unterstützung während des gesamten Entstehungsprozesses. Er ist in seinen wissenschaftlichen wie klinischen Leistungen als auch in seinem persönlichen Umgang als wissenschaftlicher Betreuer ein großes Vorbild.

Ich danke Prof. Dr. med. Olaf Hiort für die Aufnahme in die Forschergruppe, die mir die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden und wissenschaftliches Denken ermöglichte und mir einen Einblick in den Ablauf von Forschungsprojekten gestattete.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. rer. nat. Ralf Werner, welcher mit seinem unermüdlichen Forscherdrang und seinem großen wissenschaftlichen Erfahrungsschatz jede Hürde zu nehmen wusste. Trotz seiner sehr guten Arbeitsauslastung stand er mir immer mit Rat und Tat zur Seite und trug mit konstruktiver Kritik und vielfältigen Inspirationen entscheidend zum Gelingen des gesamten Projektes bei.

Dr. rer. nat. Ute Hoppe und Dr. rer. nat. Jan-Hendrik Bebermeier danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die aufmunternden Worte in steinigten Passagen des Entstehungsprozesses.

Ich danke Dr. Sabine E. Hannema von der University of Cambridge für die Bereitstellung der 3D-Strukturen von Androgenrezeptormutationen.

Nicht zuletzt geht mein Dank an alle Mitglieder der Arbeitsgemeinschaft Hiort/Holterhus für die nette und produktive Arbeitsatmosphäre.

Vielen lieben Dank an meine Familie, die immer für mich da ist.

7.3. ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Jenny Schütt, diese Arbeit selbständig angefertigt und keine weiteren außer der angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

München, den

Jenny Schütt

7.4. TABELLEN UND ORIGINALDATEN

Tabelle. Charakteristika der verschiedenen Mutationen L712F, M780I, R855H und V866M nach der AR-Gen-Mutations-Datenbasis (androgendb.mcgill.ca, Stand 09/2008).

Mut.: Mutation, AS: Aminosäureaustausch, Base: Veränderung des Basentriplets, AIS: Androgeninsensitivitätssyndrom, k = komplettes (AIS), p = partielles (AIS), m = minimales (AIS), Ca = Tumor, B_{max}: maximale Bindungskapazität des AR-Konstruktes, K_d: Dissoziationskonstante, T.lab: Thermolabilität, •=niedrig, ••=normal, •••=hoch, ♀♂=ambivalentes Genitale

Mut.	AS	Base	AIS	B _{max}	K _d	T.lab.	Phänotyp	Referenz	Nummer
712	Leu→Phe	CTT→TTT	p	••	•••		♀♂	Hiort 1996	108
712	Leu→Phe	CTT→TTT	p	••	•••		♀♂	Holterhus 2000	505
712	Leu→Phe	CTT→TTT	p	••	•••		♀♂	Holterhus 2000	506
712	Leu→Phe	CTT→TTT	p	••	•••		♀♂	Holterhus 2000	507
780	Met→Ile	ATG→ATA	p	••	•••		♀♂	Bevan 1996	189
780	Met→Ile	ATG→ATA	p	••	•••	•••	♀♂	Pinsky 1992	190
780	Met→Ile	ATG→ATA	p					Brinkmann 1995	191
780	Met→Ile	ATG→ATA	p	••	•••		♀♂	Rodien 1996	192
780	Met→Ile	ATG→ATA	k	•	••(•)		♀,♀	Rodien 1996	305 (2x)
780	Met→Ile	ATG→ATA	k				♀	Jakubiczka 1997	193
780	Met→Ile	ATG→ATA	k	•	•••		♀	Hannema 2004	464
780	Met→Ile	ATG→ATA	k				♀	Hannema 2004	660
780	Met→Ile	ATG→ATA	p				♀♂	Bouvattier 2002	682
780	Met→Ile	ATG→ATA	p				♀♂	Boehmer 2001	743
780	Met→Ile	ATG→ATA	m				♂	Ferlin 2006	774
855	Arg→His	CGC→CAC					♀	Hannema 2004	661
855	Arg→His	CGC→CAC	p	••	•••		♀♂	Elhaji 2001	528
855	Arg→His	CGC→CAC	k				♀	Bouvattier 2002	684
855	Arg→His	CGC→CAC	k				♀	Skordis 2005	688
855	Arg→His	CGC→CAC	p				♀♂	Boehmer 2001	745
855	Arg→His	CGC→CAC	p	••	•••		♀♂	Boehmer 2001	746
855	Arg→His	CGC→CAC	m				♂	Ferlin 2006	777
855	Arg→His	CGC→CAC	p	••	•••			Chang 1991	251
855	Arg→His	CGC→CAC	p	••	•••		♀♂	Batch 1992	252

855	Arg→His	CGC→CAC	p				♀♂	Hiort 1996	253
855	Arg→His	CGC→CAC	p	0			♀♂	Weidemann	254
855	Arg→His	CGC→CAC	p	•	•••	••	♀♂	Marcelli 1994	255
855	Arg→His	CGC→CAC	p				♀♂	Boehmer 1997	301
855	Arg→His	CGC→CAC	p	0			♀♂	Weidemann1996	250/254
855	Arg→His	CGC→CAC	p				♀♂	Boehmer 1997	302
855	Arg→His	CGC→CAC	k	•			♀	McPhaul 1992	249
855	Arg→His	CGC→CAC	p	0-••			♀♂	Melo 2003	344
855	Arg→His	CGC→CAC	p				♀♂	Melo 2005	834
866	Val→Met	GTG→ATG	k	••	•••		♀	Kazemi-E 1993	263
866	Val→Met	GTG→ATG	k	••	•••		♀	Weidemann1996	264
866	Val→Met	GTG→ATG	k	••	•••		♀	Lubahn 1989	265
866	Val→Met	GTG→ATG	p					McPhaul 1992	266
866	Val→Met	GTG→ATG	p		•••		♀♂	Hiort 1998	267
866	Val→Met	GTG→ATG	Ca				♂	Takahashi 1995	373
866	Val→Met	GTG→ATG	k				♀	Hannema 2004	473
866	Val→Met	GTG→ATG	k	0			♀	Hannema 2004	474
866	Val→Met	GTG→ATG	k	0			♀	Hannema 2004	475
866	Val→Met	GTG→ATG	k	0			♀	Holterhus	607
866	Val→Met	GTG→ATG	P				♀	Ledig 2005	738
866	Val→Met	GTG→ATG	k				♀	Ledig 2005	739
866	Val→Met	GTG→ATG	Ca				♂	Hyytinen 2002	574
866	Val→Met	GTG→ATG	m				♂	Ferlin 2006	

AR-Wildtyp und Mutationen mit Testosteron am MMTV-Promotor (RLU)

	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT
30ng AR	5,62	5,92	4,82	7,50	10,69
200ng MMTV	5,49	5,55	4,39	7,95	11,19
5ng phRGTK	4,26	5,59	6,09	6,64	7,53
Mittelwert	5,12	5,69	5,10	7,36	9,80
Standardabw.	0,61	0,17	0,72	0,54	1,62
in %	11,96	2,91	14,18	7,39	16,52
	EtOH	L712F	M780I	R855H	V866M
	0,91	0,45	0,44	0,38	0,62
	1,13	0,68	0,56	0,48	0,64
	0,69	0,59	0,30	0,45	0,69
Mittelwert	0,91	0,57	0,43	0,44	0,65
Standardabw.	0,18	0,10	0,11	0,04	0,03
in %	19,90	16,73	24,53	9,56	4,52
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	0,58	0,67	0,50	0,55	0,57
	0,51	0,57	0,45	0,44	0,58
	0,48	0,37	0,44	0,47	0,53
Mittelwert	0,52	0,54	0,47	0,49	0,56
Standardabw.	0,04	0,12	0,03	0,05	0,02
in %	7,69	23,14	5,72	9,89	3,40
Induktion	0,57	0,94	1,07	1,12	0,86
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	0,99	0,59	0,59	0,52	0,66
	0,95	0,64	0,46	0,48	0,91
	1,21	0,67	0,49	0,39	0,70
Mittelwert	1,05	0,63	0,51	0,47	0,76
Standardabw.	0,11	0,04	0,06	0,05	0,11
in %	10,54	5,69	11,14	11,70	14,65
Induktion	1,16	1,11	1,18	1,07	1,17
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	3,17	1,07	0,58	0,70	0,45
	3,84	0,79	0,50	0,79	0,51
	5,11	0,79	0,70	0,71	0,54
Mittelwert	4,04	0,88	0,60	0,74	0,50
Standardabw.	0,81	0,13	0,08	0,04	0,04
in %	19,93	15,17	13,76	5,66	7,07
Induktion	4,44	1,55	1,38	1,69	0,77
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	7,64	3,08	2,55	3,30	0,53
	11,57	2,78	2,15	6,03	0,59
	8,31	2,81	2,58	7,00	0,58
Mittelwert	9,17	2,89	2,42	5,44	0,57
Standardabw.	1,72	0,13	0,20	1,56	0,03
in %	18,71	4,66	8,14	28,73	5,14
Induktion	10,09	5,05	5,58	12,49	0,88
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	7,84	3,98	6,40	7,69	0,74
	12,54	3,59	3,37	9,55	0,66
	7,18	3,03	5,75	5,80	0,81
Mittelwert	9,19	3,53	5,18	7,68	0,74
Standardabw.	2,39	0,39	1,30	1,53	0,06
in %	25,99	11,03	25,14	19,95	8,42
Induktion	10,11	6,18	11,91	17,62	1,14
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	6,14	5,21	4,06	8,86	1,76
	7,36	4,01	4,02	10,83	1,51
	5,31	4,42	4,07	8,31	1,13
Mittelwert	6,27	4,55	4,05	9,33	1,47
Standardabw.	0,84	0,50	0,02	1,08	0,26
in %	13,42	10,96	0,54	11,62	17,57
Induktion	6,90	7,95	9,32	21,42	2,26

AR-Wildtyp und Mutationen mit Testosteron am (ARE)₂TATA-Promotor (RLU)

	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT
30ng AR	143,21	147,20	131,93	112,70	131,61
200ng TATA	130,19	159,44	163,38	266,60	119,80
5ng phRGTK	130,78	135,16	176,48	199,37	121,68
Mittelwert	134,73	147,27	157,26	192,89	124,36
Standardabw.	6,00	9,91	18,69	63,00	5,18
in %	4,46	6,73	11,89	32,66	4,17
	EtOH	L712F	M780I	R855H	V866M
	5,08	4,63	2,67	3,63	1,78
	3,63	3,65	2,55	3,92	1,81
	2,99	2,77	2,60	3,35	2,00
Mittelwert	3,90	3,68	2,60	3,63	1,86
Standardabw.	0,87	0,76	0,05	0,23	0,10
in %	22,42	20,57	1,85	6,38	5,21
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	2,75	2,81	1,94	2,37	1,48
	2,42	2,85	2,17	2,30	1,34
	2,82	2,84	2,55	2,31	1,61
Mittelwert	2,66	2,83	2,22	2,32	1,48
Standardabw.	0,17	0,02	0,26	0,03	0,11
in %	6,49	0,71	11,50	1,37	7,66
Induktion	0,68	0,77	0,85	0,64	0,79
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	4,52	2,96	2,29	1,83	1,41
	4,10	2,59	3,32	2,21	2,03
	3,77	3,54	1,77	1,98	1,92
Mittelwert	4,13	3,03	2,46	2,01	1,79
Standardabw.	0,31	0,39	0,64	0,16	0,27
in %	7,48	12,91	26,05	7,72	14,95
Induktion	1,06	0,82	0,95	0,55	0,96
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	22,21	4,16	2,87	4,08	1,59
	24,75	4,69	2,82	3,09	1,44
	15,95	4,36	2,78	2,78	1,46
Mittelwert	20,97	4,40	2,82	3,32	1,50
Standardabw.	3,70	0,22	0,04	0,56	0,07
in %	17,64	4,99	1,25	16,73	4,50
Induktion	5,37	1,20	1,08	0,91	0,80
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	96,66	20,71	12,33	18,42	2,01
	103,80	22,53	10,70	14,95	1,41
	102,86	22,10	10,14	14,54	1,35
Mittelwert	101,11	21,78	11,06	15,97	1,59
Standardabw.	3,17	0,78	0,93	1,74	0,30
in %	3,13	3,56	8,41	10,91	18,77
Induktion	25,91	5,91	4,25	4,39	0,86
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	160,13	77,89	42,48	63,57	1,75
	168,37	84,19	49,09	65,89	1,69
	156,57	97,60	44,83	61,79	1,97
Mittelwert	161,69	86,56	45,47	63,75	1,80
Standardabw.	4,94	8,22	2,74	1,68	0,12
in %	3,06	9,49	6,02	2,63	6,75
Induktion	41,44	23,51	17,46	17,54	0,97
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	158,23	102,79	74,63	94,38	4,31
	162,83	105,05	74,40	101,11	5,79
	133,56	98,86	74,62	89,29	6,16
Mittelwert	151,54	102,23	74,55	94,93	5,42
Standardabw.	12,85	2,56	0,10	4,84	0,80
in %	8,48	2,50	0,14	5,10	14,78
Induktion	38,84	27,76	28,63	26,12	2,91

AR-Wildtyp und Mutationen mit Testosteron am GRE-Oct-Promotor (RLU)

	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT
30ng AR	8,93	9,24	12,77	8,00	8,76
200ng GRE-OCT	8,67	8,59	14,32	7,68	8,10
5ng phRGTK	9,38	8,98	12,64	7,96	8,82
Mittelwert	8,99	8,94	13,24	7,88	8,56
Standardabw.	0,29	0,27	0,76	0,14	0,33
in %	3,25	2,99	5,76	1,79	3,82
	EtOH	L712F	M780I	R855H	V866M
	3,97	3,68	4,76	2,42	2,86
	4,07	3,27	4,43	2,52	2,84
	3,65	3,76	3,90	2,27	3,21
Mittelwert	3,90	3,57	4,36	2,40	2,97
Standardabw.	0,18	0,22	0,35	0,11	0,17
in %	4,60	6,06	8,12	4,37	5,69
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	3,07	3,34	3,70	2,62	2,77
	3,04	3,49	3,50	2,61	2,52
	3,66	3,96	3,35	2,63	2,87
Mittelwert	3,26	3,60	3,52	2,62	2,72
Standardabw.	0,29	0,26	0,14	0,01	0,15
in %	8,79	7,28	4,07	0,26	5,41
Induktion	0,84	1,01	0,81	1,09	0,92
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	4,15	3,32	3,31	2,49	2,80
	4,21	3,46	3,24	2,51	2,73
	4,23	4,04	3,24	2,62	2,94
Mittelwert	4,20	3,61	3,26	2,54	2,82
Standardabw.	0,03	0,31	0,03	0,06	0,09
in %	0,81	8,64	0,99	2,32	3,14
Induktion	1,08	1,01	0,75	1,06	0,95
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	7,05	4,22	3,26	2,58	2,60
	7,92	3,66	3,21	2,69	3,15
	6,86	4,16	3,16	2,85	2,60
Mittelwert	7,28	4,02	3,21	2,71	2,78
Standardabw.	0,46	0,25	0,04	0,11	0,26
in %	6,35	6,24	1,26	4,18	9,25
Induktion	1,87	1,13	0,74	1,13	0,94
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	8,90	6,66	4,58	4,96	2,68
	8,54	6,75	4,60	4,84	2,90
	7,85	6,64	4,50	4,51	3,06
Mittelwert	8,43	6,68	4,56	4,77	2,88
Standardabw.	0,44	0,05	0,05	0,19	0,15
in %	5,18	0,73	1,03	4,01	5,33
Induktion	2,16	1,87	1,05	1,98	0,97
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	8,20	6,94	4,99	5,88	3,78
	8,10	6,13	4,88	5,89	3,93
	9,65	7,10	4,95	6,23	3,98
Mittelwert	8,65	6,72	4,94	6,00	3,90
Standardabw.	0,71	0,43	0,05	0,16	0,08
in %	8,18	6,35	0,93	2,70	2,16
Induktion	2,22	1,88	1,13	2,50	1,31
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	8,74	6,46	5,65	6,32	5,68
	9,91	6,58	6,04	6,06	5,38
	8,75	6,44	5,37	6,63	5,36
Mittelwert	9,13	6,49	5,68	6,34	5,47
Standardabw.	0,55	0,06	0,27	0,23	0,14
in %	6,03	0,95	4,81	3,65	2,62
Induktion	2,34	1,82	1,30	2,64	1,84

AR-Wildtyp und Mutationen mit DHT am MMTV-Promotor (RLU)

	pSVAR0	L712F	M780I	R855H	V866M
30ng AR	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
200ng MMTV	1,03	0,40	0,71	0,47	0,34
5ng phRGTK	0,42	0,35	0,25	0,34	0,29
	0,63	0,28	0,23	0,34	0,90
Mittelwert	0,69	0,34	0,40	0,39	0,51
Standardabw.	0,25	0,05	0,22	0,06	0,28
in %	36,70	15,17	55,52	16,35	54,37
	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
	1,07	0,39	0,37	0,48	0,44
	0,57	0,24	0,42	0,31	0,46
	0,74	0,44	0,33	0,59	0,30
Mittelwert	0,79	0,36	0,37	0,46	0,40
Standardabw.	0,20	0,08	0,04	0,12	0,07
in %	25,67	23,59	9,97	25,05	17,96
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	0,50	0,49	0,39	0,47	0,38
	0,66	0,43	0,33	0,61	0,45
	0,71	0,25	0,41	0,25	0,34
Mittelwert	0,62	0,39	0,38	0,44	0,39
Standardabw.	0,09	0,10	0,03	0,15	0,05
in %	14,38	26,07	9,27	33,27	12,14
Induktion	0,79	1,09	1,02	0,96	0,98
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	2,26	0,50	0,37	0,38	0,34
	2,70	0,46	0,61	0,57	0,74
	1,63	0,52	0,31	0,47	0,35
Mittelwert	2,19	0,49	0,43	0,47	0,47
Standardabw.	0,44	0,02	0,13	0,08	0,19
in %	20,04	4,76	29,88	16,78	39,32
Induktion	2,76	1,38	1,16	1,02	1,18
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	3,86	2,34	0,96	1,63	0,27
	4,00	2,70	1,24	1,47	1,47
	4,74	2,48	2,05	2,46	0,29
Mittelwert	4,20	2,50	1,41	1,85	0,68
Standardabw.	0,39	0,15	0,46	0,44	0,56
in %	9,20	5,90	32,81	23,55	82,72
Induktion	5,29	7,04	3,83	4,02	1,70
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	3,88	3,08	3,33	3,62	0,41
	4,39	5,90	3,67	3,63	0,60
	7,18	1,99	4,31	4,16	0,71
Mittelwert	5,15	3,66	3,77	3,80	0,57
Standardabw.	1,45	1,65	0,41	0,25	0,12
in %	28,21	45,12	10,80	6,60	21,62
Induktion	6,49	10,27	10,21	8,25	1,43
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	4,89	3,17	3,07	4,38	1,38
	4,99	2,96	4,10	3,51	1,31
	4,50	3,62	5,69	3,97	1,52
Mittelwert	4,79	3,25	4,29	3,95	1,41
Standardabw.	0,21	0,27	1,08	0,36	0,09
in %	4,39	8,45	25,15	9,01	6,20
Induktion	6,04	9,12	11,60	8,57	3,52
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	5,54	2,93	3,48	4,63	2,12
	5,50	3,28	3,99	3,07	4,06
	4,75	3,48	3,92	4,04	4,72
Mittelwert	5,26	3,23	3,79	3,91	3,63
Standardabw.	0,36	0,23	0,23	0,65	1,10
in %	6,89	7,08	5,94	16,52	30,34
Induktion	6,63	9,07	10,27	8,49	9,08

AR-Wildtyp und Mutationen mit DHT am (ARE)₂TATA-Promotor (RLU)

	pSVAR0	L712F	M780I	R855H	V866M
30ng AR	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
200ng TATA	2,56	1,55	1,34	1,51	1,21
5ng phRGTK	2,37	1,64	1,57	1,37	1,15
	2,42	1,56	1,39	1,64	1,14
Mittelwert	2,45	1,58	1,43	1,51	1,17
Standardabw.	0,08	0,04	0,10	0,11	0,03
in %	3,17	2,49	6,68	7,30	2,45
	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
	2,00	1,60	1,33	1,43	1,58
	1,88	1,74	1,55	1,43	1,10
	1,92	1,47	1,35	1,17	1,16
Mittelwert	1,93	1,60	1,41	1,34	1,28
Standardabw.	0,05	0,11	0,10	0,12	0,21
in %	2,60	7,03	6,95	9,09	16,41
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	3,03	1,61	1,64	1,38	1,36
	2,75	1,68	1,57	1,59	1,09
	2,47	1,56	1,54	1,63	1,15
Mittelwert	2,75	1,62	1,58	1,53	1,20
Standardabw.	0,23	0,05	0,04	0,11	0,12
in %	8,35	2,99	2,64	6,99	9,76
Induktion	1,42	1,01	1,12	1,14	0,94
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	11,16	2,38	2,08	1,74	1,43
	10,53	2,33	1,92	1,79	1,13
	10,72	2,55	1,65	1,60	1,38
Mittelwert	10,80	2,42	1,88	1,71	1,31
Standardabw.	0,26	0,10	0,18	0,08	0,13
in %	2,44	3,93	9,60	4,56	9,86
Induktion	5,58	1,51	1,34	1,27	1,03
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	71,15	14,37	7,44	7,04	1,28
	70,12	14,31	7,08	7,48	1,28
	69,66	15,61	7,35	7,98	1,26
Mittelwert	70,31	14,76	7,29	7,50	1,28
Standardabw.	0,62	0,60	0,15	0,38	0,01
in %	0,89	4,05	2,11	5,13	0,79
Induktion	36,35	9,20	5,18	5,58	0,99
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	157,77	64,64	44,40	53,53	1,50
	143,10	57,20	43,21	65,70	1,31
	161,69	66,77	44,02	52,51	1,72
Mittelwert	154,19	62,87	43,88	57,24	1,51
Standardabw.	8,00	4,10	0,50	5,99	0,17
in %	5,19	6,52	1,13	10,47	11,05
Induktion	79,72	39,19	31,16	42,63	1,18
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	169,65	106,81	104,21	167,15	5,42
	172,62	114,54	105,10	153,46	5,50
	171,50	111,41	107,23	153,00	6,20
Mittelwert	171,26	110,92	105,51	157,87	5,71
Standardabw.	1,22	3,17	1,27	6,56	0,35
in %	0,72	2,86	1,20	4,16	6,12
Induktion	88,55	69,15	74,94	117,58	4,45
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	180,59	122,13	120,15	172,35	28,80
	165,68	125,76	119,30	158,60	30,98
	187,24	122,56	114,53	153,63	30,77
Mittelwert	177,84	123,48	117,99	161,53	30,19
Standardabw.	9,01	1,62	2,47	7,92	0,98
in %	5,07	1,31	2,10	4,90	3,25
Induktion	91,95	76,98	83,80	120,30	23,55

AR-Wildtyp und Mutationen mit DHT am GRE-Oct-Promotor (RLU)

	pSVAR0	L712F	M780I	R855H	V866M
30ng AR	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
200ng GRE-OCT	2,53	2,46	1,77	1,60	1,98
5ng phRGTK	2,80	2,26	1,39	1,41	1,28
	2,56	1,99	1,71	1,18	1,27
Mittelwert	2,63	2,23	1,62	1,39	1,51
Standardabw.	0,12	0,19	0,16	0,17	0,33
in %	4,62	8,63	10,13	12,44	22,02
	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
	2,49	2,72	1,50	1,49	1,67
	2,11	2,32	1,40	1,49	1,94
	2,09	2,06	1,41	1,43	1,66
Mittelwert	2,23	2,37	1,43	1,47	1,76
Standardabw.	0,19	0,27	0,04	0,03	0,13
in %	8,33	11,47	3,03	1,72	7,22
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	2,48	2,19	1,61	1,38	1,76
	2,65	2,69	1,69	1,66	1,88
	3,01	2,36	1,67	1,32	1,96
Mittelwert	2,71	2,41	1,66	1,45	1,87
Standardabw.	0,22	0,21	0,04	0,15	0,08
in %	8,10	8,74	2,15	10,08	4,27
Induktion	1,22	1,02	1,15	0,99	1,06
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	3,45	3,21	1,87	1,47	1,69
	3,79	3,41	1,75	1,52	1,63
	3,52	3,02	2,03	1,18	1,91
Mittelwert	3,59	3,21	1,88	1,39	1,74
Standardabw.	0,15	0,16	0,11	0,15	0,12
in %	4,08	4,89	5,99	10,99	6,79
Induktion	1,61	1,36	1,31	0,94	0,99
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	4,43	4,02	2,63	2,31	1,51
	4,55	4,60	3,00	1,91	1,61
	4,96	4,61	2,52	2,41	1,55
Mittelwert	4,65	4,41	2,72	2,21	1,56
Standardabw.	0,23	0,27	0,21	0,21	0,04
in %	4,87	6,23	7,56	9,67	2,75
Induktion	2,08	1,86	1,89	1,50	0,89
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	5,28	3,47	2,94	3,32	2,20
	5,02	4,69	2,86	3,69	2,09
	4,58	3,96	3,02	3,34	2,02
Mittelwert	4,96	4,04	2,94	3,45	2,10
Standardabw.	0,29	0,50	0,06	0,17	0,08
in %	5,79	12,40	2,18	4,83	3,57
Induktion	2,22	1,71	2,05	2,35	1,20
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	5,03	3,89	2,88	3,84	3,25
	5,53	5,25	3,83	3,53	3,27
	5,22	3,92	3,11	4,09	3,66
Mittelwert	5,26	4,35	3,28	3,82	3,39
Standardabw.	0,21	0,63	0,40	0,23	0,19
in %	3,96	14,59	12,30	6,06	5,53
Induktion	2,36	1,84	2,28	2,60	1,93
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	5,76	5,06	3,76	4,15	5,16
	5,16	4,28	3,64	4,27	5,02
	4,82	4,16	3,01	3,66	4,60
Mittelwert	5,25	4,50	3,47	4,03	4,93
Standardabw.	0,39	0,40	0,33	0,27	0,24
in %	7,38	8,85	9,40	6,59	4,80
Induktion	2,35	1,90	2,42	2,74	2,80

AR-Wildtyp und Mutationen mit Androstendion am MMTV-Promotor (RLU)

	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT
30ng AR	10,86	3,61	5,54	6,57	13,49
200ng MMTV	10,44	14,25	5,02	11,86	8,33
5ng phRGTK	10,02	5,79	6,88	6,03	21,51
Mittelwert	10,44	7,88	5,81	8,15	14,44
Standardabw.	0,34	4,59	0,78	2,63	5,43
in %	3,29	58,23	13,47	32,26	37,56
	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
	1,45	0,50	0,40	1,18	0,58
	2,39	0,47	0,23	0,42	0,74
	0,83	0,44	0,28	0,49	1,01
Mittelwert	1,56	0,47	0,30	0,70	0,78
Standardabw.	0,64	0,02	0,07	0,34	0,18
in %	41,15	4,93	24,24	49,41	22,68
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	0,75	0,39	0,30	0,34	0,52
	0,98	1,25	0,24	0,61	0,59
	0,66	0,43	0,41	0,51	0,70
Mittelwert	0,79	0,69	0,32	0,48	0,60
Standardabw.	0,13	0,40	0,07	0,11	0,07
in %	16,96	57,44	21,99	22,98	12,24
Induktion	0,51	1,46	1,05	0,70	0,78
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	1,40	0,44	0,41	0,40	1,03
	1,20	0,48	0,31	0,47	0,46
	0,42	0,54	0,33	0,72	1,03
Mittelwert	1,00	0,48	0,35	0,53	0,84
Standardabw.	0,42	0,04	0,05	0,14	0,27
in %	41,99	8,57	13,11	25,92	32,13
Induktion	0,64	1,02	1,15	0,76	1,08
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	2,94	0,78	0,42	0,55	1,03
	2,72	0,52	0,55	0,54	0,55
	2,61	0,68	0,40	0,41	0,57
Mittelwert	2,75	0,66	0,45	0,50	0,72
Standardabw.	0,14	0,11	0,07	0,07	0,22
in %	5,02	16,13	15,02	13,10	30,86
Induktion	1,77	1,40	1,49	0,72	0,93
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	4,74	1,51	1,69	2,23	0,49
	4,61	2,36	1,99	4,62	0,72
	7,09	2,93	1,57	2,51	1,51
Mittelwert	5,48	2,27	1,75	3,12	0,91
Standardabw.	1,14	0,58	0,17	1,07	0,44
in %	20,77	25,61	9,92	34,22	48,36
Induktion	3,52	4,80	5,76	4,48	1,17
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	6,84	2,47	6,42	5,94	1,06
	5,81	4,37	4,69	6,35	0,79
	5,88	2,88	3,36	5,57	0,52
Mittelwert	6,18	3,24	4,82	5,95	0,79
Standardabw.	0,47	0,82	1,25	0,32	0,22
in %	7,60	25,30	25,97	5,34	27,95
Induktion	3,97	6,86	15,89	8,55	1,02
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	6,08	3,90	5,08	6,06	1,31
	5,82	3,80	4,69	9,33	1,19
	8,50	5,40	4,83	5,73	1,50
Mittelwert	6,80	4,37	4,86	7,04	1,33
Standardabw.	1,21	0,73	0,16	1,63	0,13
in %	17,74	16,77	3,36	23,10	9,73
Induktion	4,37	9,26	16,02	10,11	1,72

AR-Wildtyp und Mutationen mit Androstendion am (ARE)₂TATA-Promotor (RLU)

	pSVAR0	pSVAR0	pSVAR0	pSVAR0	pSVAR0
30ng AR	10nM DHT	10nM DHT	10nM DHT	10nM DHT	10nM DHT
200ng TATA	248,83	329,71	338,50	336,16	245,23
5ng phRGTK	290,65	300,73	342,32	370,55	236,78
	287,99	310,27	367,70	378,88	245,77
Mittelwert	275,82	313,57	349,51	361,86	242,59
Standardabw.	19,12	12,06	12,96	18,49	4,12
in %	6,93	3,85	3,71	5,11	1,70
		L712F	M780I	R855H	V866M
	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
	4,92	3,13	2,90	3,12	1,70
	3,63	2,65	3,23	2,75	1,65
	3,45	2,80	2,92	2,56	1,56
Mittelwert	4,00	2,86	3,01	2,81	1,64
Standardabw.	0,66	0,20	0,15	0,23	0,06
in %	16,45	7,02	4,96	8,23	3,65
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	4,09	2,65	2,94	2,82	2,18
	3,29	3,64	2,92	2,06	1,83
	3,39	2,93	3,51	2,19	1,56
Mittelwert	3,59	3,07	3,13	2,36	1,86
Standardabw.	0,36	0,42	0,27	0,33	0,25
in %	9,91	13,61	8,76	14,00	13,56
Induktion	0,90	1,07	1,04	0,84	1,13
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	3,91	2,79	3,78	1,84	2,14
	4,64	3,57	4,01	1,96	1,74
	3,77	2,50	3,33	2,17	1,77
Mittelwert	4,11	2,95	3,71	1,99	1,88
Standardabw.	0,38	0,46	0,28	0,14	0,18
in %	9,26	15,45	7,65	7,04	9,65
Induktion	1,03	1,03	1,23	0,71	1,15
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	23,05	4,38	3,53	2,26	1,92
	20,04	4,15	4,21	2,39	1,78
	18,77	3,55	3,79	2,32	2,08
Mittelwert	20,62	4,02	3,85	2,32	1,93
Standardabw.	1,79	0,35	0,28	0,05	0,12
in %	8,70	8,72	7,31	2,24	6,26
Induktion	5,16	1,41	1,28	0,83	1,18
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	120,34	16,63	10,97	8,58	1,78
	143,50	16,65	11,03	8,55	1,90
	122,24	17,89	12,06	8,53	1,93
Mittelwert	128,69	17,06	11,35	8,55	1,87
Standardabw.	10,50	0,59	0,50	0,02	0,06
in %	8,16	3,47	4,39	0,24	3,46
Induktion	32,18	5,96	3,77	3,04	1,14
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	286,16	82,89	66,88	67,15	1,84
	257,69	90,04	70,83	66,48	2,07
	284,46	85,96	61,32	62,67	2,18
Mittelwert	276,10	86,30	66,34	65,43	2,03
Standardabw.	13,04	2,93	3,90	1,97	0,14
in %	4,72	3,39	5,88	3,01	7,02
Induktion	69,04	30,15	22,01	23,29	1,24
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	285,07	170,02	180,20	149,58	4,20
	306,20	157,95	177,01	148,62	3,73
	276,86	166,00	149,59	146,54	4,78
Mittelwert	289,38	164,66	168,93	148,25	4,24
Standardabw.	12,36	5,02	13,74	1,27	0,43
in %	4,27	3,05	8,13	0,86	10,09
Induktion	72,36	57,53	56,05	52,78	2,59

AR-Wildtyp und Mutationen mit Androstendion am GRE-Oct-Promotor (RLU)

	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT
30ng AR	7,75	8,39	7,86	6,17	6,46
200ng GRE-OCT	7,31	8,30	8,69	7,14	6,33
5ng phRGTK	9,24	8,08	7,55	7,63	8,14
Mittelwert	8,10	8,26	8,03	6,98	6,98
Standardabw.	0,82	0,13	0,48	0,61	0,82
in %	10,16	1,57	5,96	8,67	11,81
		L712F	M780I	R855H	V866M
	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
	3,31	3,45	2,73	3,03	2,23
	3,97	3,44	2,86	2,39	2,61
	3,94	3,97	2,45	2,43	2,32
Mittelwert	3,74	3,62	2,68	2,61	2,39
Standardabw.	0,31	0,25	0,17	0,29	0,16
in %	8,17	6,79	6,35	11,16	6,79
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	3,05	2,84	2,87	2,68	2,60
	3,61	3,62	3,13	2,53	2,22
	3,16	3,46	3,27	2,71	2,63
Mittelwert	3,27	3,31	3,09	2,64	2,48
Standardabw.	0,24	0,34	0,17	0,08	0,19
in %	7,33	10,17	5,40	2,91	7,52
Induktion	0,88	0,91	1,15	1,01	1,04
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	3,98	3,29	3,56	2,61	2,32
	4,22	3,48	2,61	2,42	2,27
	3,67	3,08	3,26	2,44	2,11
Mittelwert	3,96	3,28	3,15	2,49	2,23
Standardabw.	0,23	0,17	0,40	0,09	0,09
in %	5,74	5,09	12,59	3,46	4,06
Induktion	1,06	0,91	1,17	0,95	0,93
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	5,15	3,15	2,61	2,24	2,29
	5,83	3,96	2,90	2,42	2,60
	5,74	4,01	3,42	2,98	2,08
Mittelwert	5,57	3,71	2,98	2,55	2,33
Standardabw.	0,30	0,39	0,34	0,32	0,21
in %	5,43	10,60	11,29	12,39	9,22
Induktion	1,49	1,02	1,11	0,97	0,97
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	8,20	6,49	4,01	4,42	2,37
	8,27	5,20	4,10	4,85	3,06
	8,51	6,56	3,85	4,90	2,13
Mittelwert	8,33	6,08	3,99	4,72	2,52
Standardabw.	0,13	0,62	0,10	0,21	0,40
in %	1,59	10,23	2,55	4,50	15,70
Induktion	2,23	1,68	1,49	1,81	1,06
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	8,72	6,94	4,98	5,52	2,92
	9,50	6,48	5,18	6,53	2,65
	10,11	6,29	5,57	6,46	2,53
Mittelwert	9,44	6,57	5,24	6,17	2,70
Standardabw.	0,57	0,27	0,25	0,46	0,16
in %	6,02	4,13	4,67	7,50	6,10
Induktion	2,53	1,82	1,96	2,36	1,13
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	9,32	6,97	5,76	6,96	3,47
	9,57	7,22	5,16	6,45	4,12
	8,71	7,52	5,60	5,90	4,43
Mittelwert	9,20	7,24	5,51	6,43	4,01
Standardabw.	0,36	0,23	0,25	0,43	0,40
in %	3,96	3,13	4,61	6,73	9,94
Induktion	2,46	2,00	2,06	2,46	1,68

AR-Wildtyp und Mutationen mit Stanozolol am MMTV-Promotor (RLU)

	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT
30ng AR	8,24	3,90	3,31	0,50	2,80
200ng MMTV	6,12	2,86	4,43	0,81	1,96
5ng phRGTK	13,20	2,27	0,94	0,55	5,28
Mittelwert	9,19	3,01	2,90	0,62	3,35
Standardabw.	2,96	0,68	1,45	0,14	1,41
in %	32,26	22,48	50,21	22,11	42,07
		L712F	M780I	R855H	V866M
	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
	0,32	2,01	0,57	0,46	0,83
	0,34	0,70	0,48	0,63	0,45
	0,40	0,87	0,96	0,30	0,46
Mittelwert	0,35	1,19	0,67	0,46	0,58
Standardabw.	0,03	0,58	0,21	0,13	0,17
in %	9,19	48,65	31,24	28,97	30,16
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	0,65	0,62	0,79	0,50	0,67
	0,95	0,54	0,96	0,74	0,43
	0,91	1,16	0,60	0,40	0,36
Mittelwert	0,84	0,77	0,78	0,55	0,49
Standardabw.	0,13	0,28	0,15	0,14	0,13
in %	15,89	35,67	19,16	26,15	26,89
Induktion	2,38	0,65	1,17	1,18	0,84
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	1,02	0,76	0,56	0,61	0,47
	0,94	0,97	0,74	0,30	0,66
	0,91	0,51	1,25	0,61	1,11
Mittelwert	0,96	0,75	0,85	0,51	0,75
Standardabw.	0,05	0,19	0,29	0,14	0,27
in %	4,84	25,17	34,03	28,26	35,91
Induktion	2,72	0,62	1,27	1,10	1,29
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	4,20	0,76	0,46	0,36	0,66
	3,21	0,72	0,47	0,51	0,43
	3,63	0,89	0,50	0,37	0,35
Mittelwert	3,68	0,79	0,48	0,41	0,48
Standardabw.	0,41	0,07	0,02	0,07	0,13
in %	11,02	9,38	3,29	16,67	27,50
Induktion	10,45	0,66	0,72	0,90	0,83
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	3,97	2,30	0,75	3,10	0,44
	5,78	5,57	0,67	1,72	0,75
	4,59	2,95	0,67	1,47	0,42
Mittelwert	4,78	3,61	0,70	2,09	0,54
Standardabw.	0,75	1,41	0,04	0,72	0,15
in %	15,69	39,23	5,33	34,24	28,54
Induktion	13,58	3,02	1,04	4,53	0,93
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	9,03	4,53	4,29	3,83	0,51
	8,28	3,33	6,31	10,43	0,48
	4,86	5,09	2,04	13,33	0,81
Mittelwert	7,39	4,32	4,21	9,19	0,60
Standardabw.	1,81	0,74	1,74	3,98	0,15
in %	24,52	17,02	41,40	43,24	25,44
Induktion	20,99	3,62	6,29	19,89	1,03
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	7,91	3,68	4,58	4,35	0,78
	6,63	6,41	3,28	6,64	0,76
	8,20	4,53	3,26	6,40	0,96
Mittelwert	7,58	4,87	3,71	5,80	0,83
Standardabw.	0,68	1,14	0,62	1,03	0,09
in %	8,99	23,47	16,76	17,74	11,17
Induktion	21,52	4,08	5,53	12,53	1,44

AR-Wildtyp und Mutationen mit Stanozolol am (ARE)₂TATA-Promotor (RLU)

	pSVAR0	pSVAR0	pSVAR0	pSVAR0	pSVAR0
	10nM DHT	10nM DHT	10nM DHT	10nM DHT	10nM DHT
30ng AR	245,30	237,29	233,67	237,15	213,19
200ng TATA	249,70	236,86	228,41	236,13	249,82
5ng phRGTK	231,20	213,96	232,42	243,35	242,34
Mittelwert	242,07	229,37	231,50	238,88	235,12
Standardabw.	7,89	10,90	2,24	3,19	15,80
in %	3,26	4,75	0,97	1,34	6,72
		L712F	M780I	R855H	V866M
	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
	8,07	3,40	1,55	1,93	1,43
	7,38	2,67	1,56	1,68	1,45
	6,39	1,84	1,72	1,46	1,47
Mittelwert	7,28	2,64	1,61	1,69	1,45
Standardabw.	0,69	0,64	0,08	0,19	0,02
in %	9,50	24,08	4,79	11,27	1,16
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	4,01	1,96	1,51	1,72	1,48
	3,84	1,71	1,83	1,52	1,34
	4,60	2,08	1,95	1,59	1,23
Mittelwert	4,15	1,92	1,76	1,61	1,35
Standardabw.	0,32	0,15	0,18	0,08	0,11
in %	7,82	8,07	10,46	5,10	7,82
Induktion	0,57	0,73	1,10	0,95	0,93
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	5,49	1,85	1,43	1,73	1,05
	4,59	2,44	1,96	2,01	1,39
	4,46	1,90	1,43	1,43	1,50
Mittelwert	4,84	2,06	1,61	1,72	1,31
Standardabw.	0,46	0,26	0,25	0,24	0,19
in %	9,42	12,83	15,66	13,81	14,39
Induktion	0,67	0,78	1,00	1,02	0,91
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	14,27	2,89	1,78	1,97	1,48
	16,61	3,08	1,67	1,98	1,28
	16,09	2,75	1,50	2,49	1,37
Mittelwert	15,66	2,91	1,65	2,14	1,38
Standardabw.	1,00	0,13	0,11	0,25	0,08
in %	6,40	4,61	6,89	11,45	6,02
Induktion	2,15	1,10	1,03	1,27	0,95
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	81,13	14,92	2,00	8,13	1,42
	92,33	13,43	2,56	9,73	1,47
	95,18	17,07	2,72	8,07	1,46
Mittelwert	89,55	15,14	2,42	8,65	1,45
Standardabw.	6,06	1,50	0,31	0,77	0,02
in %	6,77	9,88	12,64	8,88	1,40
Induktion	12,30	5,74	1,51	5,12	1,00
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	184,20	76,17	11,91	55,82	1,45
	192,00	70,74	12,00	58,06	1,45
	192,50	72,91	10,32	52,18	1,63
Mittelwert	189,57	73,27	11,41	55,35	1,51
Standardabw.	3,80	2,24	0,77	2,43	0,08
in %	2,00	3,05	6,78	4,38	5,43
Induktion	26,04	27,78	7,10	32,79	1,04
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	216,45	111,40	39,74	122,75	2,19
	221,36	123,77	33,84	113,08	2,35
	226,94	102,57	31,40	112,17	2,37
Mittelwert	221,58	112,58	34,99	116,00	2,30
Standardabw.	4,29	8,69	3,50	4,79	0,08
in %	1,93	7,72	10,00	4,13	3,42
Induktion	30,43	42,68	21,78	68,71	1,59

AR-Wildtyp und Mutationen mit Stanozolol am GRE-Oct-Promotor (RLU)

	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT	pSVAR0 10nM DHT
30ng AR	6,72	7,18	6,91	6,68	6,37
200ng GRE-OCT	8,55	6,84	4,99	6,04	5,06
5ng phRGTK	6,85	6,59	7,73	5,31	6,98
Mittelwert	7,38	6,87	6,55	6,01	6,14
Standardabw.	0,83	0,24	1,15	0,56	0,80
in %	11,32	3,53	17,54	9,27	13,06
		L712F	M780I	R855H	V866M
	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH
	3,98	3,24	2,74	2,54	2,46
	3,33	3,40	2,39	2,31	2,51
	3,96	3,50	2,92	1,86	2,07
Mittelwert	3,76	3,38	2,68	2,24	2,34
Standardabw.	0,30	0,11	0,22	0,28	0,20
in %	8,03	3,12	8,17	12,51	8,40
	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM	0,001nM
	3,04	2,58	2,76	2,30	2,06
	2,65	2,87	2,58	2,18	2,06
	2,88	2,57	2,86	2,21	2,64
Mittelwert	2,86	2,67	2,73	2,23	2,25
Standardabw.	0,16	0,14	0,11	0,05	0,27
in %	5,57	5,19	4,19	2,35	12,19
Induktion	0,76	0,79	1,02	1,00	0,96
	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM	0,01nM
	4,13	3,27	2,61	2,27	2,17
	3,81	2,91	2,39	2,08	2,31
	3,25	3,65	3,30	1,78	3,16
Mittelwert	3,73	3,28	2,77	2,04	2,55
Standardabw.	0,36	0,30	0,39	0,20	0,44
in %	9,77	9,14	14,00	10,01	17,28
Induktion	0,99	0,97	1,03	0,91	1,09
	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM	0,1nM
	5,39	3,14	2,49	2,27	2,24
	4,40	3,60	2,61	2,12	2,00
	7,09	2,97	2,41	2,36	2,34
Mittelwert	5,63	3,24	2,51	2,25	2,19
Standardabw.	1,11	0,26	0,08	0,10	0,14
in %	19,80	8,11	3,30	4,30	6,39
Induktion	1,50	0,96	0,93	1,01	0,94
	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM	1,0nM
	7,47	6,09	2,82	4,61	2,23
	6,97	5,18	3,27	3,91	2,21
	7,59	4,96	3,01	4,02	2,22
Mittelwert	7,35	5,41	3,03	4,18	2,22
Standardabw.	0,27	0,49	0,18	0,31	0,01
in %	3,64	9,02	6,05	7,34	0,33
Induktion	1,95	1,60	1,13	1,87	0,95
	10nM	10nM	10nM	10nM	10nM
	6,73	5,91	4,40	5,25	2,24
	7,96	5,41	4,37	4,93	2,17
	7,59	5,10	5,24	5,19	2,67
Mittelwert	7,43	5,47	4,67	5,12	2,36
Standardabw.	0,51	0,34	0,40	0,14	0,22
in %	6,92	6,15	8,60	2,72	9,44
Induktion	1,98	1,62	1,74	2,29	1,01
	100nM	100nM	100nM	100nM	100nM
	8,11	6,43	4,57	5,50	3,01
	6,62	5,58	4,82	6,13	2,75
	6,50	5,71	5,04	5,02	3,28
Mittelwert	7,08	5,90	4,81	5,55	3,01
Standardabw.	0,73	0,38	0,19	0,45	0,22
in %	10,34	6,36	4,01	8,13	7,21
Induktion	1,88	1,75	1,79	2,48	1,29

Aminosäuresequenz des humanen AR

1MEVQLGLGRV11YPRPPSKTYR21GAFQNLFSV31REVIQNPGPR41HPEAASAA
PP51GASLLLLQQQ61QQQQQQQQQQ71QQQQQQQQQET81SPRQQQQQQG91EDGS
PQAHRR101GPTGYLVLDE111EQQPSQPQSA121LECHPERGCV131PEPGAAVAAS
141KGLPQQLPAP151PDEDDSAAPS161TSLLLGPTFP171GLSSCSADLK181DILSEA
STMQ191LLQQQQQEAV201SEGSSSGRAR211EASGAPTSSK221DNYLGGTSTI231
SDNAKELCKA241VSVSMGLGVE251ALEHLSPGEQ261LRGDCMYAPL271LGVPP
AVRPT281PCAPLAECKG291SLLDDSAAGKS301TEDTAEYSPF311KGGYTKGLEG32
1ESLGCSGSAA331AGSSGTLELP341STLSLYKSGA351LDEAAAYQSR361DYYNFP
LALA371GPPPPPPPPH381PHARIKLENP391LDYGSAAWAAA401AAQCRYGDLA411
SLHGAGAAGP421GSGSPSAAAS431SSWHTLFTAE441EGQLYGPCGG451GGGGG
GGGGG461GGGGGGGGGG471GGEAGAVAPY481GYTRPPQGLA491GQESDFTAP
D501VWYPGGMVSR511VPYPSPTCVK521SEMGPWMDSY531SGPYGDMRLE541T
ARDHVLPID551YYFPPQKTCL561ICGDEASGCH571YGALTCGSCK581VFFKRAA
EGK591QKYLCASRND601CTIDKFRRKN611CPSCRLRKCY621EAGMTLGARK631
LKKLGNLKLQ641EEGEASSTTS651PTEETTQKLT661VSHIEGYECQ671PIFLNVLE
AI681EPGVVCAGHD691NNQPDSFAAL701LSSLNELGER711QLVHVVKWAK721A
LPGFRNLHV731DDQMAVIQYS741WMGLMVFAMG751WRSFTNVNSR761MLYF
APDLVF771NEYRMHKSRM781YSQCVRMRHL791SQEFGWLQIT801PQEFLCMKA
L811LLFSIIPVDG821LKNQKFFDEL831RMNYIKELDR841IIACKRKNPT851SCSRR
FYQLT861KLLDSVQPIA871RELHQFTFDL881LIKSHMVSVD891FPEMMAEIIIS901
VQVPKILSGK911VKPIYFHTQ919