

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Schrappe)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ANDROGENREGULIERTE TRANSKRIPTE IN GENITALEN  
HAUTFIBROBLASTEN**

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

vorgelegt von  
**JAN OELBE**  
aus Hildesheim

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holterhus

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Mönig

Tag der mündlichen Prüfung: 12.08.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.04.2013

gez.: Prof. Dr. Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Geschlechtsentwicklung	1
1.2	Geschlechtliche Determinierung	1
1.3	Geschlechtliche Differenzierung	2
1.4	Die Androgenwirkung	3
	1.4.1 Der Androgenrezeptor	3
	1.4.2 Störungen der Androgenwirkung	4
	1.4.3 Diagnostik der Androgenresistenz	5
1.5	Fragestellung	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1	Materialien	8
	2.1.1 Geräte	8
	2.1.2 Chemikalien und Kits	8
	2.1.3 Verbrauchsartikel	8
	2.1.4 Primer	9
2.2	Patienten und vorangegangene Experimente	9
	2.2.1 Patientenkollektiv und Zellkulturen	9
	2.2.2 Microarray-Untersuchungen und Stanford Microarray Database (SMD)	10
2.3	Methoden	13
	2.3.1 Reverse Transkription	13
	2.3.2 qRT-PCR	14
	2.3.2.1 Prinzip	14
	2.3.2.2 Durchführung	15
	2.3.3 Agarosegelelektrophorese	17
	2.3.4 Significance Analysis of Microarrays (SAM)	18
	2.3.5 Wilcoxon-Rangsummentest	19
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>20</b>
3.1	qRT-PCR für Phosphoglucomutase 5 Pseudogen 1 (PGM5P1)	20
3.2	Significance Analysis of Microarrays (SAM)	23
3.3	qRT-PCR für Phosphatidat-Phosphatase Typ 2B (PPAP2B)	25
3.4	Schmelzkurvenanalysen	27
3.5	Agarosegelelektrophorese der Produkte der qRT-PCR für PPAP2B	27

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>29</b>
4.1	Methodenkritik qRT-PCR	29
4.2	Phosphoglucomutase 5 Pseudogen 1 (PGM5P1)	30
4.3	Wiederholung der Significance Analysis of Microarrays (SAM)	32
4.4	Phosphatidat-Phosphatase Typ 2B (PPAP2B)	32
4.4.1	Ergebnisse	32
4.4.2	Informationen über das Gen	33
4.4.3	Mögliche biologische Funktionen	34
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>49</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>50</b>

## Abkürzungen

aa	<i>amino acids</i> ; Aminosäuren
AMH	Anti-Müller-Hormon
APOD	Apolipoprotein D
AR	Androgenrezeptor
ARE	androgenresponsives Element
AZA	5-Aza-2'-Deoxycytidin
bp	Basenpaare
C1P	Ceramid-1-Phosphat
CAIS	<i>complete androgen insensitivity syndrome</i> ; komplette Androgenresistenz
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CXorf6	<i>chromosome X open reading frame 6</i>
DAG	Diacylglycerol
DAX-1	<i>dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1</i>
DBD	DNA-bindende Domäne
DHH	<i>Desert hedgehog homolog</i>
DHT	Dihydrotestosteron
DMRT1	<i>Doublesex and mab-3 related transcription factor 1</i>
DSD	<i>disorders of sex development</i> ; Störungen der Geschlechtsentwicklung
EtOH	Ethanol
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fetales Kälberserum
FGF9	<i>fibroblast growth factor 9</i>
hCG	humanes Choriongonadotropin
HRE	hormonresponsives Element
HSP	Hitzeschockprotein
kb	Kilo-Basenpaare
LBD	ligandenbindende Domäne
LH	luteinisierendes Hormon
LNCaP	<i>lymph node carcinoma of the prostate</i> ; humane Prostatakarzinom-Zellen
LPA	Lysophosphatidsäure
LPP3	Lipidphosphat-Phosphohydrolase

## Abkürzungen

---

MAIS	<i>minimal androgen insensitivity syndrome</i> ; minimale Androgenresistenz
MM	Master-Mix
NTD	N-terminale Domäne
PA	Phosphatidsäure
PAIS	<i>partial androgen insensitivity syndrome</i> ; partielle Androgenresistenz
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PGM5	Phosphoglucomutase 5
PGM5P1	Phosphoglucomutase 5 Pseudogen 1
PKC	Proteinkinase C
PLD	Phospholipase D
PPAP2B	Phosphatidsäure-Phosphatase Typ 2B
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> ; quantitative Echtzeit-PCR
Rspo1	R-spondin-1
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i> ; Signifikanzanalyse für Microarrays
SDHA	<i>Succinate dehydrogenase complex, subunit A</i>
SF1	Steroidogener Faktor 1
SMD	Stanford Microarray Database
SOX9	<i>Sry-related HMG box 9</i> ; Transkriptionsfaktor
SRY	<i>sex determining region Y</i> ; hodendeterminierender Faktor
WNT4	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>
WT1	Wilms-Tumor-Protein

# 1 Einleitung

## 1.1 Geschlechtsentwicklung

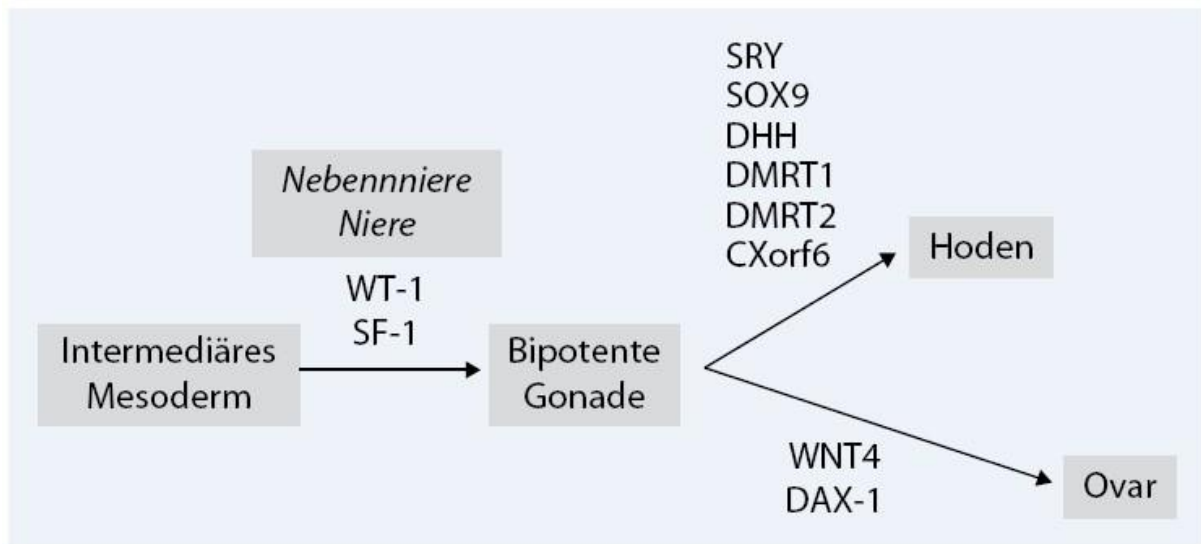
Die Geschlechtsentwicklung des Menschen beginnt mit der Verschmelzung von Ei- und Samenzelle und der Festlegung des genetischen Geschlechts. In der Embryonalentwicklung kommt es zur geschlechtlichen Determinierung der zunächst bipotenten Gonadenanlage in weibliche Ovarien oder männliche Hoden. Es folgt die geschlechtliche Differenzierung mit hormonabhängiger Ausbildung von innerem und äußerem Genitale. Die Entwicklung setzt sich nach der Geburt bis zum Erreichen der Geschlechtsreife in der Pubertät fort.

Auf den verschiedenen Ebenen dieser Vorgänge kann es zu Störungen der Geschlechtsentwicklung (*disorders of sex development, DSD*) kommen.

## 1.2 Geschlechtliche Determinierung

Bei der Befruchtung der Eizelle durch die männliche Samenzelle wird das genetische Geschlecht des Embryos in Form eines männlichen 46-XY- oder weiblichen 46-XX-Karyotyps festgelegt. Zunächst hiervon unabhängig entsteht im etwa 4 Wochen alten Embryo die indifferente Gonadenanlage, welche sich später in Richtung der männlichen Hoden oder der weiblichen Ovarien entwickeln kann. In der Vergangenheit konnten verschiedene Faktoren identifiziert werden, die für die Entwicklung der indifferenten Gonadenanlage eine Rolle spielen (Abb. 1) (Holterhus 2009). Störungen können an dieser Stelle zu einer inkompletten oder kompletten Gonadendysgenese führen. Im letzteren Fall sind die Gonaden lediglich als bindegewebige Stränge angelegt („Streak“-Gonaden) (Ostrer 1993).

Beim männlichen Karyotyp stößt die Expression des auf dem Y-Chromosom lokalisierten hodendeterminierenden Faktors (*sex determining region Y, SRY*) bis zur 7. Woche post conceptionem die Hodenentwicklung an. Das Transkript besitzt ein DNA-bindendes Motiv und kann nachgeschaltete autosomale Gene regulieren, die für die Hodenentwicklung von entscheidender Bedeutung sind (Sinclair et al. 1990, Koopman et al. 1991). Verschiedene Gene beeinflussen in einem komplexen Zusammenspiel aktiv die Hodenentwicklung (z.B. SOX9, WT1, SF1, DMRT1, DHH, CXorf6). Mutationen in diesen Genen können zu Gonadendysgenesien in Kombination mit typischen Störungen und Fehlbildungen z.B. der Nieren und des Skelettsystems führen (Hiort und Holterhus 2000, Holterhus 2009).



**Abb. 1: Genetische Mechanismen der Gonadenentwicklung (Holterhus 2009)**

Für die Entwicklung des Ovars sind weniger Faktoren bekannt (DAX-1, WNT4, Rspo1). Ohne die von SRY in Gang gesetzte Kaskade der Hodenentstehung entwickelt sich die indifferente Gonadenanlage zu den weiblichen Ovarien (Hughes 2001, Chassot et al. 2008)

### 1.3 Geschlechtliche Differenzierung

Nach der Entwicklung der Hodenanlage wird mit Beginn der Sexualhormonproduktion die geschlechtliche Differenzierung von innerem und äußerem Genitale eingeleitet. Entscheidend sind hier die Testosteron-Bildung in den Leydig-Zellen und die Anti-Müller-Hormon-Bildung (AMH) in den Sertoli-Zellen des Hodens bzw. die Wirkungen der Hormone in den Zielgeweben. Bei der weiblichen Differenzierung ist primär die Abwesenheit dieser Hormone wichtig und nicht etwa die Wirkung ovarieller Hormone (Hughes 2001, Holterhus 2009).

Als Grundlage der inneren Genitalentwicklung werden in der frühen Embryonalzeit zwei paarige Geschlechtsgänge, die Wolff- und die Müller-Gänge, angelegt. Durch SF1 und SOX9 wird die Bildung von AMH induziert, welches über zwei membranständige Rezeptoren wirkt. Beim männlichen Embryo führt dies zur Regression der Müller-Gänge. Gleichzeitig können sich die Wolff-Gänge testosteronabhängig zu Samenleiter, Nebenhoden, Samenbläschen und Prostata differenzieren. Im Fall eines weiblichen Embryos hingegen kommt es zur Rückbildung der Wolff-Gänge, die Müller-Gänge entwickeln sich zu Eileiter, Uterus, und oberem Drittel der Vagina (Josso et al. 2006, Zusammenfassung bei Holterhus 2009).



Die Anlage des äußeren Genitales ist ebenfalls zunächst geschlechtlich indifferent. Ab der 9. Schwangerschaftswoche können die Leydig-Zellen der Hodenanlage durch die Produktion von Testosteron die männliche Differenzierung anstoßen (Abb. 2). Die Testosteron-Biosynthese erfolgt zuerst autonom, später unter der Kontrolle von plazentarem humanen Choriongonadotropin (hCG) und schließlich unter der Kontrolle von luteinisierendem Hormon (LH) der fetalen Hypophyse. Für eine erfolgreiche männliche Differenzierung des äußeren Genitales sind zudem die Umwandlung von Testosteron zu Dihydrotestosteron (DHT) durch die  $5\alpha$ -Reduktase Typ II in den Zielgeweben und ein funktionsfähiger Androgenrezeptor (AR) nötig (Hughes 2002). Als Folge entwickelt sich aus dem Genitalhöcker der Penis und die Labioskrotalwülste verschmelzen zu Corpus cavernosum und Skrotum (Holterhus 2009).

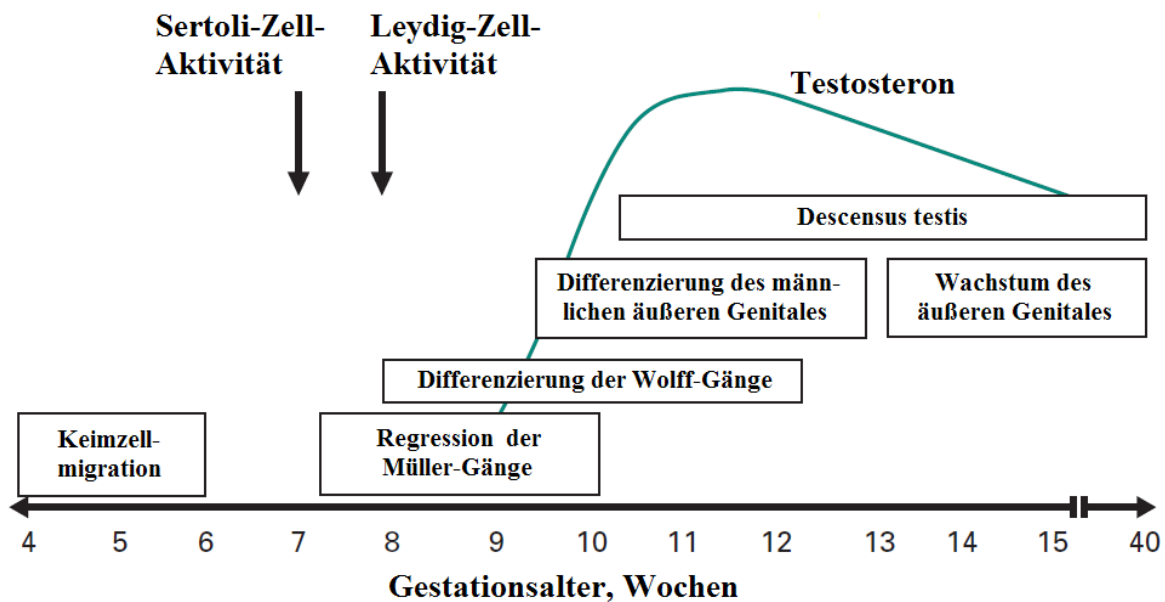


Abb. 2: Zeitleiste der männlichen fetalen Geschlechtsentwicklung (nach Hughes 2002)

## 1.4 Die Androgenwirkung

### 1.4.1 Der Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor ist ein Steroidhormonrezeptor und gehört zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren (Mangelsdorf et al. 1995, Beato et al. 2000). Seine wichtigsten biologischen Liganden sind Testosteron und Dihydrotestosteron. Das Gen besteht aus 8 Exons und liegt auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Brown et al. 1989, Lubahn et al. 1989). Der Androgenrezeptor umfasst verschiedene Domänen, die typisch für nukleäre Rezeptoren

sind: eine N-terminale Domäne (NTD), eine DNA-bindende Domäne (DBD), eine Gelenkregion, eine ligandenbindende Domäne (LBD) sowie kernlokalisierende und transaktivierende Einheiten. Während die LBD und DBD evolutionär hoch konserviert sind, ist die NTD sehr variabel. Die DBD bildet zwei Zinkfinger-Motive, die für DNA-Bindung und Rezeptor-Dimerisierung verantwortlich sind (Koochekpour 2010).

Ohne Bindung eines Liganden liegt der AR in erster Linie assoziiert mit Hitzeschockproteinen (HSP) im Zytoplasma vor. Die Bindung eines Androgens führt zu Konformationsänderungen des Rezeptors und als Folge zur Dissoziation von den HSP, Interaktion mit Ko-Regulatoren, Wanderung in den Zellkern und Rezeptordimerisierung. Im Zellkern bindet der Rezeptor-Androgen-Komplex an hormonresponsive Elemente (HRE) der DNA, genauer an androgenresponsive Elemente (ARE). Durch die Funktion als Transkriptionsfaktor kann nun die Expression androgenregulierter Gene gesteuert werden.

Neben den oben beschriebenen Abläufen auf DNA-Ebene gibt es auch eine sogenannte nicht-genomische Aktivität des AR. Diese Signalwege zeichnen sich durch ihre hohe Geschwindigkeit aus und finden im Zytoplasma bzw. an der Plasmamembran statt. Hierzu gehören die intrazelluläre Calcium-Freisetzung und die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen wie die MAP-Kinase sowie die Proteinkinasen A, B und C (Bennett et al. 2009).

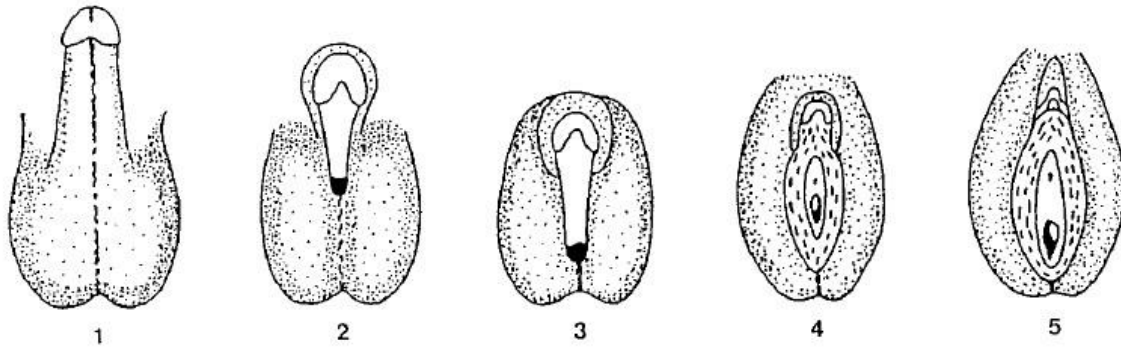
### 1.4.2 Störungen der Androgenwirkung

Mutationen im X-chromosomal-rezessiven Androgenrezeptorgen sind vermutlich die häufigste Störung der Geschlechtsentwicklung bei Kindern mit männlichem XY-Genotyp. Es kommt zu einem vollständigen oder partiellen Ausfall der Androgenrezeptorfunktion mit unterschiedlichem klinischen Erscheinungsbild (Quigley et al. 1995).

Bei der kompletten Androgenresistenz (*complete androgen insensitivity syndrome*, CAIS) besteht ein weibliches äußeres Genitale bei gleichzeitig fehlenden Müller-Strukturen aufgrund der AMH-Produktion der Hoden, welche in der Bauchhöhle oder im Leistenkanal liegen. Die Vagina endet blind, Derivate der Wolff-Gänge sind nicht vorhanden.

Bei der partiellen Androgenresistenz (*partial androgen insensitivity syndrome*, PAIS) kann ein kontinuierliches Spektrum von überwiegend weiblichen Phänotypen bis hin zum überwiegend männlichen externen Genitale auftreten (Abb. 3).

Wenn sich die Androgenresistenz allein in einer Infertilität äußert, spricht man von einer minimalen Androgenresistenz (*minimal androgen insensitivity syndrome*, MAIS) (Holterhus 2009).



**Abb. 3: Einteilung der Androgenresistenz nach Phänotyp (Sinnecker et al. 1997)**

- (1) vollständig männliches äußeres Genitale; Spermatogenese und pubertäre Virilisierung können beeinträchtigt sein
- (2) überwiegend männlich mit Hypospadie oder Mikropenis
- (3) ambivalent; Mikrophallus erscheint wie Klitoris, geteiltes Skrotum wie Labia majora
- (4) überwiegend weiblich; Klitorishypertrophie, partielle labiale Fusion
- (5) vollständig weibliches äußeres Genitale

### 1.4.3 Diagnostik der Androgenresistenz

Bei der kompletten Androgenresistenz findet die Diagnosestellung oft erst im Pubertätsalter nach ausbleibender Menarche statt, wenn nicht früher Nachforschungen zum Beispiel aufgrund tastbarer Gonaden oder eines Leistenbruchs bei Vorsorgeuntersuchungen angestellt wurden. Im Gegensatz dazu macht sich die partielle Androgenresistenz typischerweise durch das ambivalente Genitale bei der Geburt bemerkbar. In beiden Fällen liegen normale bis erhöhte Werte von LH und Testosteron vor. Die Diagnose kann anhand der Sequenzierung des Androgenrezeptorgens gesichert werden (Holterhus 2010). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass eine geringe Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp vorliegt. Selbst bei gleichen Mutationen im AR-Gen kann die Ausprägung der verminderten Androgenwirkung große Unterschiede aufweisen (Rodien et al. 1996, Evans et al. 1997, Holterhus et al. 2000).

Insbesondere im Bezug auf die Therapie und Geschlechtszuweisung bei Neugeborenen mit ambivalentem Genitale spielt die Abschätzung der vorhandenen AR-Restfunktion eine wichtige Rolle. In der Vergangenheit wurde die verminderte Androgenbindungskapazität von kultivierten Genitalhautfibroblasten diagnostisch ausgenutzt. Die Aussagefähigkeit dieses Tests beschränkt sich jedoch auf Patienten mit Veränderungen im ligandenbindenden Teil des Rezeptors (McPhaul et al. 1993). Eine Möglichkeit der in-vivo-Testung ist die bei

funktionsfähigem AR stattfindende Herunterregulation des sexualhormonbindenden Globulins (SHBG) nach Einnahme des synthetischen Androgens Stanozolol. Bei vollständigem Ausfall der Rezeptorfunktion findet keine Herabregulation statt (Sinnecker et al. 1989, 1997). Eine Interpretation der Ergebnisse ist mangels ausreichenden Verständnisses der Regulationswege jedoch schwierig (Holterhus 2010).

In einem anderen Ansatz mit kultivierten Genitalhautfibroblasten wurde versucht androgenregulierte Gene zu identifizieren. Diese Experimente wurden mit männlichen Vorhautfibroblasten durchgeführt und schlugen entweder fehl oder zeigten uneinheitliche Ergebnisse (Berkovitz et al. 1990, Stillman et al. 1991, Nitsche et al. 1996). Begründet werden kann dies zum Teil damit, dass die Genitalhautfibroblasten ausdifferenzierte Zellen sind, die ihre Regulation durch Androgene nach abgeschlossener Entwicklung weitgehend verloren haben (Holterhus et al. 2003, Bebermeier et al. 2006).

In neueren Versuchen wurden die Genexpressionsmuster von Genitalhautfibroblasten des Skrotums untersucht, welches embryologisch den gleichen Ursprung wie die Labia majora hat. Hierbei konnten signifikante Unterschiede zu den vorher untersuchten Vorhautfibroblasten festgestellt werden. Zudem wurde aufgrund der übereinstimmenden embryonalen Anlagen die Vergleichbarkeit zwischen Skrotum-Fibroblasten normaler männlicher Kontrollen und Labia majora-Fibroblasten von CAIS-Patientinnen bestätigt. Aus diesen Untersuchungen konnte geschlossen werden, dass Androgene über den AR geschlechtsdifferente Transkriptionsprofile lang anhaltend programmieren (*androgen memory*) (Holterhus et al. 2007).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im Verlauf erstmals kultivierte Skrotum-Fibroblasten auf ihre Androgen-Responsivität hin untersucht. In Microarray-Analysen konnten in der Tat mehrere signifikante Transkripte identifiziert werden, für eines dieser Transkripte, Apolipoprotein D (APOD), konnte mittels qRT-PCR die hochsignifikante Heraufregulation durch DHT über den AR bestätigt werden. Eine mögliche Rolle von APOD im Pheromon-Stoffwechsel unterstützt diese Ergebnisse (Appari et al. 2009).

### 1.5 Fragestellung

In der männlichen Geschlechtsentwicklung spielt die Wirkung der Androgene eine entscheidende Rolle. Beim vollständigen Ausfall der Androgenrezeptorfunktion, der kompletten Androgenresistenz (CAIS), kommt es zu einer weiblichen Differenzierung des äußeren Genitales trotz männlichem XY-Genotyp. Erwachsene Frauen mit CAIS haben eine ungestörte weibliche Geschlechtsidentität (Holterhus 2010).

Komplexer werden die Verhältnisse im Falle eines teilweisen Funktionsverlusts der Androgenrezeptorfunktion bei der partiellen Androgenresistenz (PAIS). Neugeborene mit einer solchen Störung können ein ambivalentes äußeres Genitale aufweisen, was eine unmittelbare Geschlechtszuweisung erschwert oder unmöglich macht. Besonders wichtig ist es hierbei, die verbliebene Androgenwirkung zu ermitteln, von der die Therapie aber auch die Geschlechtszuweisung abhängen. Leider ist die Genotyp-Phänotyp-Korrelation schlecht und bisherige diagnostische Vorgehensweisen zeigen unterschiedliche Probleme. Kürzlich konnte das Apolipoprotein D (APOD) als ein stark androgenreguliertes Gen in kultivierten Genitalhautfibroblasten des Skrotums identifiziert werden. Möglicherweise lässt sich dieses Gen in Zukunft als Biomarker zur Abschätzung der Androgenrezeptor-Restfunktion benutzen. Neben APOD wurden in Microarray-Analysen der Kieler Arbeitsgruppe Pädiatrische Endokrinologie noch zwei weitere androgenregulierte Transkripte (Phosphoglucomutase 5 Pseudogen 1 und der transkribierte Locus AA459734) entdeckt, die bisher jedoch noch nicht durch qRT-PCR-Untersuchungen bestätigt wurden (Appari et al. 2009).

Neben den beschriebenen diagnostischen Aspekten spielt die Identifikation androgenregulierter Gene im Genitalgewebe auch für das Verständnis der menschlichen Geschlechtsentwicklung eine Rolle. Die Entdeckung neuer Gene, welche an der geschlechtlichen Differenzierung beteiligt sind, könnte auch Hinweise für bisher nicht aufgeklärte Pathomechanismen bei Störungen der Geschlechtsentwicklung geben. Denkbar wäre eine klinische Ausprägung der Androgenresistenz bei intaktem Androgenrezeptor und isoliertem Defekt eines nachgeschalteten, androgenregulierten Gens.

Aus den genannten Punkten ergeben sich für diese Arbeit folgende Fragen:

- Lassen sich die Microarray-Ergebnisse auch für die anderen potentiell androgenregulierten Transkripte durch qRT-PCR-Untersuchungen bestätigen?
- Gibt es darüber hinaus noch weitere Gene, die in kultivierten Skrotum-Fibroblasten signifikant durch Androgene reguliert werden?
- Sind ggf. für weitere androgenregulierte Gene aufgrund bekannter biologischer Funktionen mögliche Zusammenhänge mit der Geschlechtsentwicklung zu finden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Pipetten	Research, Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	5415D, Eppendorf, Hamburg Galaxy Mini, VWR International, Darmstadt
Schüttler	Vortex Mixer, VWR International, Darmstadt
PCR-Cycler	Mastercycler, Eppendorf, Hamburg
qRT-PCR System	LightCycler, Roche Diagnostics, Mannheim
Elektrophoresekammer	Horizon 11.14, Biometra, Göttingen
Spannungsquelle	ST305, Gibco BRL, Eggenstein
UV-Dokumentationanlage	CN-TFX, MWG-Biotech, Ebersberg

#### 2.1.2 Chemikalien und Kits

cDNA Synthese Kit	First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, St. Leon-Rot
SYBR Green Kit	QuantiTech SYBR Green PCR Kit, Quiagen, Hilden
Agarose	UltraPure Agarose, Invitrogen, Darmstadt
Ethidiumbromid	UltraPure 10 mg/ml Ethidium bromide, Invitrogen, Darmstadt
DNA-Längenmarker	1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, Darmstadt
TRIS Puffer	Trizma Base, Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Essigsäure (Eisessig) 100%, Merck, Darmstadt
EDTA	EDTA 0,5M pH8, Sigma-Aldrich, Steinheim

#### 2.1.3 Verbrauchsartikel

LightCycler Kapillaren	LightCycler Capillaries (20µl), Roche Diagnostics, Mannheim
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips, Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Gefäße	Multiply (0,2 und 0,5ml), Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.4 Primer

TIB Molbiol, Berlin

SDHA	for.	5'-ACCAGGTCACACACTGTTGC-3'
	rev.	5'-CGTAGAAATGCCACCTCCA-3'
PGM5P1	for. (#63)	5'-GACATATGCAATGACTCTTCTGGA-3'
	rev. (#63)	5'-AAGCCATTTTGGCCTAGGAT-3'
PPAP2B	for. (#40)	5'-TGATGTTCTGGCAGGATTTG-3'
	rev. (#40)	5'-TGAAGAGGTCAGACACGAAGAA-3'

## 2.2 Patienten und vorangegangene Experimente

Die Untersuchungen zur androgenregulierten Genexpression in kultivierten Genitalhautfibroblasten wurden von den Ethikkommissionen der Universitäten in Kiel und Lübeck bewilligt (in Kiel z.B. unter Aktenzeichen D410/08 und in Lübeck unter Aktenzeichen 96-063).

### 2.2.1 Patientenkollektiv und Zellkulturen

Die Grundlage für diese Arbeit bildet eine große Anzahl zuvor durchgeführter Zellkultur-Experimente mit Genitalhautfibroblasten (Appari et al. 2009), deren Ablauf im Folgenden kurz beschrieben wird. Die Fibroblasten stammen zum einen aus der Skrotalhaut von männlichen Kontrollen mit normalem äußeren Genitale und zum anderen aus der Haut des Labioskrotalbereichs bzw. der Labia majora von Patienten / Patientinnen mit partieller oder kompletter Androgenresistenz (Zusammenfassung der Zellreihen in Tabelle 1).

Die Fibroblasten wurden bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium bestand aus *phenol red free DMEM* (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) mit 10% FBS, 100 U/ml Penicillin / Streptomycin, 2mM L-Glutamin (Sigma, St. Louis, USA) und 20mM HEPES Puffer (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland).

Über einen Zeitraum von 18 Tagen erfolgte eine sechsmalige Behandlung mit 10nM DHT in Ethanol (EtOH) bzw. nur mit dem Lösungsmittel EtOH. In einigen Experimenten war zusätzlich der Einfluss des demethylierend wirkenden AZA (gelöst in Essigsäure) untersucht worden (Appari et al. 2009). Anschließend wurde die Gesamt-RNA nach Behandlung mit TRIzol (Invitrogen, Paisley, Großbritannien) mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen und bei -80°C aufbewahrt. Die so erhaltenen RNA-Proben

wurden nach reverser Transkription in cDNA für die qRT-PCR-Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet.

### 2.2.2 Microarray-Untersuchungen und Stanford Microarray Database (SMD)

Eine weitere Voraussetzung für diese Arbeit stellt die genomweite Untersuchung der mRNA-Proben auf androgenregulierte Transkripte mittels Microarrays dar. Mit Hilfe von *spotted cDNA microarrays* (Stanford Functional Genomics Facility, Stanford, USA) konnten gleichzeitig mehr als 30000 menschliche Transkripte analysiert werden. Es wurden Typ 2-Experimente durchgeführt, bei denen die Proben zusammen mit einer *universal human reference RNA* (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) auf die Arrays aufgebracht wurden, nachdem beide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert worden waren. Hierdurch konnte die Proben-RNA im Verhältnis zu einer konstanten Referenz-RNA bestimmt werden. Die mittels GenePix 4000B Microarray Scanner (Axon, Foster City, USA) gewonnenen Daten aus den Arrays wurden in der Stanford Microarray Database (SMD) der University of Stanford online gespeichert. Hier stehen sie jederzeit zum vollständigen oder spezifisch gefilterten Download bereit. Auf diese Weise wird ein systematischer Umgang mit der riesigen Datenmenge möglich. Die Daten sind zudem in der GEO (*Gene Expression Omnibus*) Datenbank für jeden zugänglich (Datenreihe GSE11847).

#### Tabelle 1: Auflistung der Fibroblasten-Zellreihen

Normalwerte für die Androgenbindung: Dissoziationskonstante  $K_d$  0,03-0,13nM, Bindungskapazität  $B_{max}$  13-116fmol/mg Protein

Zellreihe/ Passage- zahl	Anatomischer Ursprung	Anatomischer Phänotyp des äußeren Genitales / AIS-Einteilung	Alter bei Biopsie (Jahre; Monate)	Klinischer Hintergrund und funktionelle Daten (Androgen-Bindung, AR- Genotyp, Bemerkungen)
S 3 3	Skrotum, rechts	normal männlich	12;7	Torsion des linken Hoden vier Wochen zuvor; OP- Indikation: prophylaktische Orchidopexie auf der rechten Seite; keine Androgen-Bindungsdaten



S 4 6	Skrotum, links	normal männlich	1;3	Kleinere Abweichung des Penis-Schafts aber keine Hypospadie; Maldezensus testis beidseits; OP-Indikation: Orchidopexie; $K_d$ 0,12nM $B_{max}$ 28fmol/mg Protein
S 5 8	Skrotum, rechts	normal männlich	1;7	Vermuteter Leistenhoden rechts; OP-Indikation: Orchidopexie; bei der OP kein Hodengewebe auf der rechten Seite vorhanden; $K_d$ 0,09nM $B_{max}$ 28fmol/mg Protein
S 9 7	Skrotum, Raphe	normal männlich	34;0	Infertilität; Azoospermie; OP-Indikation: testikuläre Spermienextraktion; $K_d$ 0,08nM $B_{max}$ 55fmol/mg Protein
S 12 9	Skrotum, links	normal männlich	9;2	Maldezensus testis links; OP-Indikation: Orchidopexie links; $K_d$ 0,07nM $B_{max}$ 37fmol/mg Protein
S 13 5	Skrotum, Raphe	normal männlich	58;1	Infertilität; Azoospermie; OP-Indikation: testikuläre Spermienextraktion; keine Androgen-Bindungsdaten
S 15 7	Skrotum, Raphe	normal männlich	5;2	Phimose; OP-Indikation: Zirkumzision; keine Androgen-Bindungsdaten

ARD 446 6	Skrotum	überwiegend männlich (AIS2)	7;8	Stille Mutation GGG>GGA in Codon 795 des AR-Gens; K <sub>d</sub> 0,07nM B <sub>max</sub> 26fmol/mg Protein
ARD 001	Labia majora / Skrotum	ambivalent (AIS3)	0;9	Mutation einer Splice-Stelle AGC>AGT in Codon 888 (Exon); führt zu aberrantem Splicen
ARD 084 9	Labia majora / Skrotum	ambivalent (AIS3)	0;8	Keine Mutation in der gesamten kodierenden Region des AR-Gens; reduzierte AR-mRNA, reduziertes AR-Protein und reduzierte Ligandenbindung; K <sub>d</sub> 0,05nM B <sub>max</sub> 6fmol/mg Protein
ARD 534 10	Labia majora / Skrotum	ambivalent (AIS3)	2;4	Arg608Lys
ARD 377 4	Labia majora / Skrotum	überwiegend weiblich (AIS4)	1;2	Ile841Ser; K <sub>d</sub> 0,55nM B <sub>max</sub> 17fmol/mg Protein
ARD 659 4	Labia majora	überwiegend weiblich (AIS4)	3;10	Ala870Gly
ARD 402	Labia majora	normal weiblich (CAIS)	1;0	2-bp Deletion in Exon 1; Leserasterverschiebung; vorzeitiges Stopp-Codon; negative Androgen-Bindung; sehr niedrige AR-mRNA-Transkription, kein AR-Protein im Western Blot

ARD 411 7	Labia majora	normal weiblich (CAIS)	0;4	Arg855Cys; negative Androgen-Bindung
ARD 465	Labia majora	normal weiblich (CAIS)	5;5	Glu287stop; niedrige Expression des wild-typ AR; postzygotische Mutation (somatisches Mosaik); K <sub>d</sub> 0,11nM B <sub>max</sub> 3,6fmol/mg Protein
ARD 682 8	Labia majora	normal weiblich (CAIS)	14;10	Gln59stop; negative Androgen-Bindung; kein AR-Protein im Western Blot
ARD 1097 4	Labia majora	normal weiblich (CAIS)	1;3	Pro390Ser+Arg855Gly; negative Androgen- Bindung
ARD 1144 4	Labia majora	normal weiblich (CAIS)	4;3	keine Mutation festgestellt; pathologische Androgen- Bindung; K <sub>d</sub> 1,59nM B <sub>max</sub> 14fmol/mg Protein

(Tabelle übernommen und übersetzt aus Appari et al. 2009)

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Reverse Transkription

Für die qRT-PCR-Untersuchung mussten die gewonnenen RNA-Proben zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Deutschland) verwendet.

Zunächst wurden 2µl Oligo(dT) Primer zu 1000ng Gesamt-RNA gegeben und das Volumen anschließend mit Wasser auf 26µl aufgefüllt. Nach gutem Mischen und kurzem Zentrifugieren folgte eine Inkubation bei 70°C für 5 Minuten. Anschließend wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt und bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert.

<b>Vorbereitung des Master-Mix</b>	
8µl	5X Reaktions-Puffer
1µl	RiboLock™ RNase Inhibitor
4µl	10 mM dNTP Mix

Danach wurden 13µl Master-Mix zu den RNA-Ansätzen gegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 25°C wurde 1 µl M-MuLV Reverse Transkriptase hinzugegeben, gefolgt von 10 Minuten Inkubation bei 25°C und dann einer Stunde bei 42°C. Zuletzt folgte die Denaturierung für 10 Minuten bei 70°C mit anschließender Abkühlung auf 4°C. Die Konzentration der gewonnenen cDNA-Proben betrug 25ng/µl, die Lagerung erfolgte bei -20°C. Für die qRT-PCR-Untersuchungen wurden die Proben auf eine Konzentration von 3,125ng/µl (1:8) verdünnt.

## **2.3.2 qRT-PCR**

### **2.3.2.1 Prinzip**

Das Prinzip der qRT-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*) beruht auf der herkömmlichen PCR, wobei zusätzlich die DNA-Amplifikation quantitativ und in Echtzeit erfasst wird.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe des QuantiTech SYBR Green PCR Kit (Quiagen, Deutschland) im LightCycler (Roche Diagnostics, Deutschland) durchgeführt. Der verwendete Farbstoff SYBR Green I bindet doppelsträngige DNA und bildet einen Farbstoff-DNA-Komplex mit spezifischen Absorptions- und Emissions-Maxima. Durch Messung der Fluoreszenz, welche in der exponentiellen Phase der PCR proportional zu den gebildeten Produkten zunimmt, kann die Amplifikation quantitativ erfasst werden. Um die Fluoreszenzwerte interpretieren zu können, wurden vor den eigentlichen Messungen der Proben Standardkurven mit bekannten DNA-Konzentrationen (Verdünnungsreihe) hergestellt. Da die gemessene Amplifikation auch von der Menge und der Qualität der eingesetzten DNA abhängt, wurde eine relative Quantifizierungsstrategie gewählt. Hierbei wird parallel zum untersuchten Gen die Amplifikation eines sogenannten Housekeeping-Gens gemessen und die Amplifikation des Ziel-Gens anschließend ins Verhältnis zu der des Housekeeping-Gens gesetzt. Vom Housekeeping-Gen wird eine konstante Expression erwartet, die unabhängig vom Zellzyklus und von experimentellen Behandlungen der Zellen ist. Für diesen Zweck wurde hier das Gen SDHA (*Succinatdehydrogenase complex, subunit A*) gewählt.

Zum Ausgleich unterschiedlicher Detektionssensitivitäten zwischen den einzelnen LightCycler-Läufen und zur Normalisierung aller Proben innerhalb eines Laufs wurde über alle Experimente hinweg ein einheitlicher Kalibrator (S 15, Essigsäure, EtOH) eingesetzt. Das Ergebnis wird schließlich auf folgende Weise ausgedrückt:

$$Expression_{Ziel-Gen} = \frac{\frac{Ziel - Gen_{Probe}}{Housekeeping - Gen_{Probe}}}{\frac{Ziel - Gen_{Kalibrator}}{Housekeeping - Gen_{Kalibrator}}}$$

Zur Überprüfung der spezifischen Amplifikation wurde jeder qRT-PCR-Lauf mit einer Schmelzkurvenanalyse abgeschlossen. Hierbei wurde bei gleichzeitiger Fluoreszenzmessung die Temperatur im LightCycler kontinuierlich immer weiter erhöht, bis es zu einer Denaturierung aller Produkte kam. Um eine Amplifikation genomischer DNA zu verhindern, wurden die Primer so gewählt, dass der amplifizierte Bereich ein Intron überspannt (*intron spanning primers*).

### 2.3.2.2 Durchführung

Zuerst wurde je ein Master-Mix für das Ziel-Gen und für das Housekeeping-Gen entsprechend der Anzahl der benötigten Reaktions-Ansätze hergestellt.

Master-Mix (MM) je Reaktions-Ansatz	
10µl	SYBR Green PCR Mix
2µl	Primer Mix (100pmol/µl)
6µl	Wasser

Jeweils 18µl Master-Mix wurden in 200µl 8x-PCR-Tubes im Kühlblock pipettiert. Danach wurden pro DNA-Probe drei Ansätze für das Ziel-Gen und drei Ansätze für das Housekeeping-Gen hergestellt, indem je 2µl der Proben (DNA-Konzentration 3,125ng/µl) zum vorgelegten Master-Mix gegeben wurden. Danach folgte ein kurzes Mischen und eine kurze Zentrifugation.

Im Anschluss wurden die vollständigen 20µl Reaktionsansätze in die LightCycler Kapillaren pipettiert, verschlossen und für 30 Sekunden bei 0,8rpm zentrifugiert. Danach konnte der Rotor des LightCyclers mit den Kapillaren bestückt und die qRT-PCR gestartet werden.

<b>Pipettierschema (Beispiel) für LightCycler</b>				
<b>Kapillare</b>	<b>Probe</b>	<b>Gen</b>	<b>MM (µl)</b>	<b>cDNA (µl)</b>
1	Kalibrator	PPAP2B	18	2
2	Kalibrator	PPAP2B	18	2
3	Kalibrator	PPAP2B	18	2
4	Kalibrator	SDHA	18	2
5	Kalibrator	SDHA	18	2
6	Kalibrator	SDHA	18	2
7	S 12, DHT	PPAP2B	18	2
8	S 12, DHT	PPAP2B	18	2
9	S 12, DHT	PPAP2B	18	2
10	S 12, DHT	SDHA	18	2
11	S 12, DHT	SDHA	18	2
12	S 12, DHT	SDHA	18	2
13	S 12, EtOH	PPAP2B	18	2
14	S 12, EtOH	PPAP2B	18	2
15	S 12, EtOH	PPAP2B	18	2
16	S 12, EtOH	SDHA	18	2
17	S 12, EtOH	SDHA	18	2
18	S 12, EtOH	SDHA	18	2
19	S 13, DHT	PPAP2B	18	2
20	S 13, DHT	PPAP2B	18	2
21	S 13, DHT	PPAP2B	18	2
22	S 13, DHT	SDHA	18	2
23	S 13, DHT	SDHA	18	2
24	S 13, DHT	SDHA	18	2
25	S 13, EtOH	PPAP2B	18	2
26	S 13, EtOH	PPAP2B	18	2
27	S 13, EtOH	PPAP2B	18	2
28	S 13, EtOH	SDHA	18	2
29	S 13, EtOH	SDHA	18	2
30	S 13, EtOH	SDHA	18	2
31	Wasser (Kontrolle)	SDHA	18	-
32	Wasser (Kontrolle)	PPAP2B	18	-

<b>qRT-PCR Protokoll für PPAP2B</b>		
1) Denaturierung	95°C	900s
2) Cycling (50x)	94°C	15s
	58°C	25s
	72°C	25s
3) Schmelzkurve	bis 95°C	Anstieg 0,1°C/s

### 2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Durch die Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Im Vergleich mit bekannten DNA-Proben lässt sich die Größe der Fragmente abschätzen. Die Agarosegelelektrophorese wurde verwendet, um die spezifische Amplifikation in den qRT-PCR Produkten zu überprüfen.

Es wurde ein 2%-iges Agarosegel verwendet, welches durch Erhitzen (Mikrowelle) von 2g Agarose in 100ml TAE-Puffer (1x), Hinzufügen von 5µl Ethidiumbromid und anschließendem Ausgießen in Gelträger hergestellt wurde. Von den DNA-Proben, die nach dem qRT-PCR-Lauf aus den Kapillaren zu entnehmen waren, wurden jeweils 5µl mit 1,2µl Auftragspuffer vermischt und danach in die Auftragstaschen des Gels pipettiert. Daneben wurde ein DNA-Längenmarker (1kb Plus Ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100V über 30 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurden die entstandenen Banden mittels Kamera unter UV-Licht dokumentiert.

<b>TAE-Puffer (50x)</b>	
Trizma Base	484g
Essigsäure	154,2ml
EDTA 0,5M pH8	200ml
auffüllen auf 2l mit H <sub>2</sub> O	

#### 2.3.4 Significance Analysis of Microarrays (SAM)

Da sich aus Microarray-Experimenten eine unüberschaubar große Datenmenge ergibt, wurde von Mitarbeitern der Universität Stanford eine statistische Technik bzw. ein Programm entwickelt, um signifikante Unterschiede in der Expression einzelner Transkripte zu identifizieren (Tusher et al. 2001). Mit Hilfe dieses Programms wurden die zuvor durchgeführten Microarray-Experimente mit kultivierten Genitalhautfibroblasten (Appari et al. 2009) erneut analysiert und als Folge ein neu identifiziertes Gen per qRT-PCR untersucht. Es wurden nur Microarray-Spots in die Analyse einbezogen, deren Fluoreszenz-Signal in zumindest einem der beiden Kanäle (Probe oder Referenz) 1,5-fach oder höher über der Hintergrund-Intensität lag (Download-Filter der Stanford Microarray Database). Dies führte zu einer Gesamtzahl von 38876 Transkripten. Für die Analyse wurden die logarithmierten und für jedes Transkript zentrierten Mittelwerte der Rot/Grün Ratios verwendet. Mit Hilfe der Software Cluster 3.0 (Eisen et al. 1998, de Hoon et al. 2004) wurde die Auswahl auf solche Spots begrenzt, die bei mindestens 80% der Microarrays verwertbare Daten und in mindestens 2 von 16 Experimenten Expressionsunterschiede um das 2-fache oder mehr lieferten. Dies ergab einen Datensatz von 6674 Sequenzen für die weitere Analyse.

Als Rechenalgorithmus wurde die Option *two class paired* gewählt, bei der ein übereinstimmendes Patienten- bzw. Zellreihenkollektiv auf zwei unterschiedliche Weisen behandelt worden ist (hier DHT oder EtOH). Um dabei die Gene zu identifizieren, die unter dem Einfluss der Androgenbehandlung stehen, wurde die Analyse auf die Experimente mit normalen männlichen Kontrollen (Skrotum-Fibroblasten mit intaktem Androgenrezeptor), d.h. 8 der 16 Experimente, angewendet.

Die SAM Prozedur bestimmt für jedes Transkript einen (beobachteten) Score, der mit zunehmender mittlerer Expressionsdifferenz zwischen behandelten und unbehandelten Proben größer und mit zunehmender Standardabweichung der mittleren Expressionsdifferenz kleiner wird. Zusätzlich wird ein erwarteter Score berechnet, indem eine große Anzahl an Permutationen (zufällige Zuweisung der Experimente in behandelt oder unbehandelt) durchgeführt und anschließend der Mittelwert aller so ermittelter Scores gebildet wird. Die beobachteten Scores werden gegenüber den erwarteten Scores graphisch aufgetragen. Durch Festlegung eines Grenzwertes Delta (Differenz zwischen beobachtetem und erwartetem Score) werden die signifikant positiven Gene bestimmt. Zusätzlich wird eine Falsch-Erkennungs-Rate angegeben, die ein Maß für die fälschlicherweise als signifikant positiv erkannten Transkripte darstellt. Sie berücksichtigt, wie viele Transkripte auch bei den durch Permutation ermittelten Daten als signifikant erkannt werden würden (Tusher et al. 2001).



### **2.3.5 Wilcoxon-Rangsummentest**

Zur Berechnung der Signifikanzniveaus zwischen den unterschiedlichen Patientengruppen in den qRT-PCR-Untersuchungen wurden Wilcoxon-Rangsummentests angewendet. Hierbei handelt es sich um einen parameterfreien statistischen Test, der auch auf Daten angewendet werden kann, die keiner Normalverteilung folgen. Zur Durchführung wird zuerst unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit jedem Wert ein Rang zugeordnet. Anschließend werden die Rangsummen der verschiedenen Gruppen berechnet und in Tabellen mit kritischen Werten die Signifikanzniveaus bestimmt. Zur einfacheren Berechnung wurde hierfür die Software „Das Statistiklabor“ der Freien Universität Berlin benutzt.

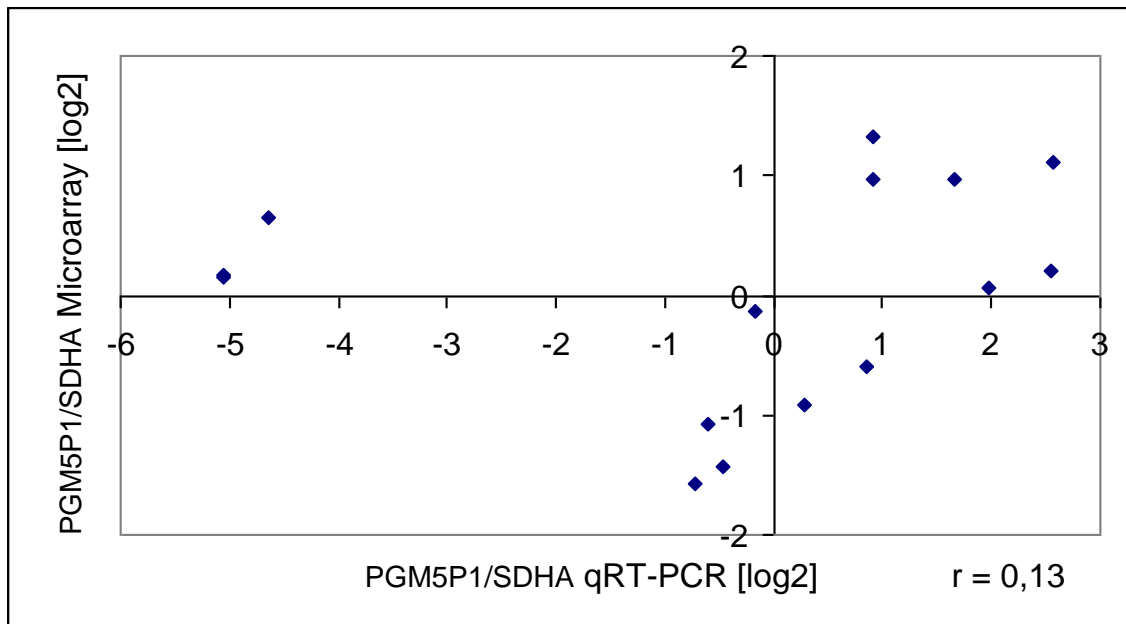
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 qRT-PCR für PGM5P1

Bei der qRT-PCR-Untersuchung des in früheren Experimenten (Appari et al. 2009) mittels Microarray-Analyse identifizierten Gens Phosphoglucomutase 5 Pseudogen 1 (PGM5P1), das ich zuerst untersuchte, ergab sich eine unerwartet schlechte Korrelation zwischen Microarray- und qRT-PCR-Daten ( $r=0,13$ ; Pearson-Korrelationskoeffizient) (Abb. 4).

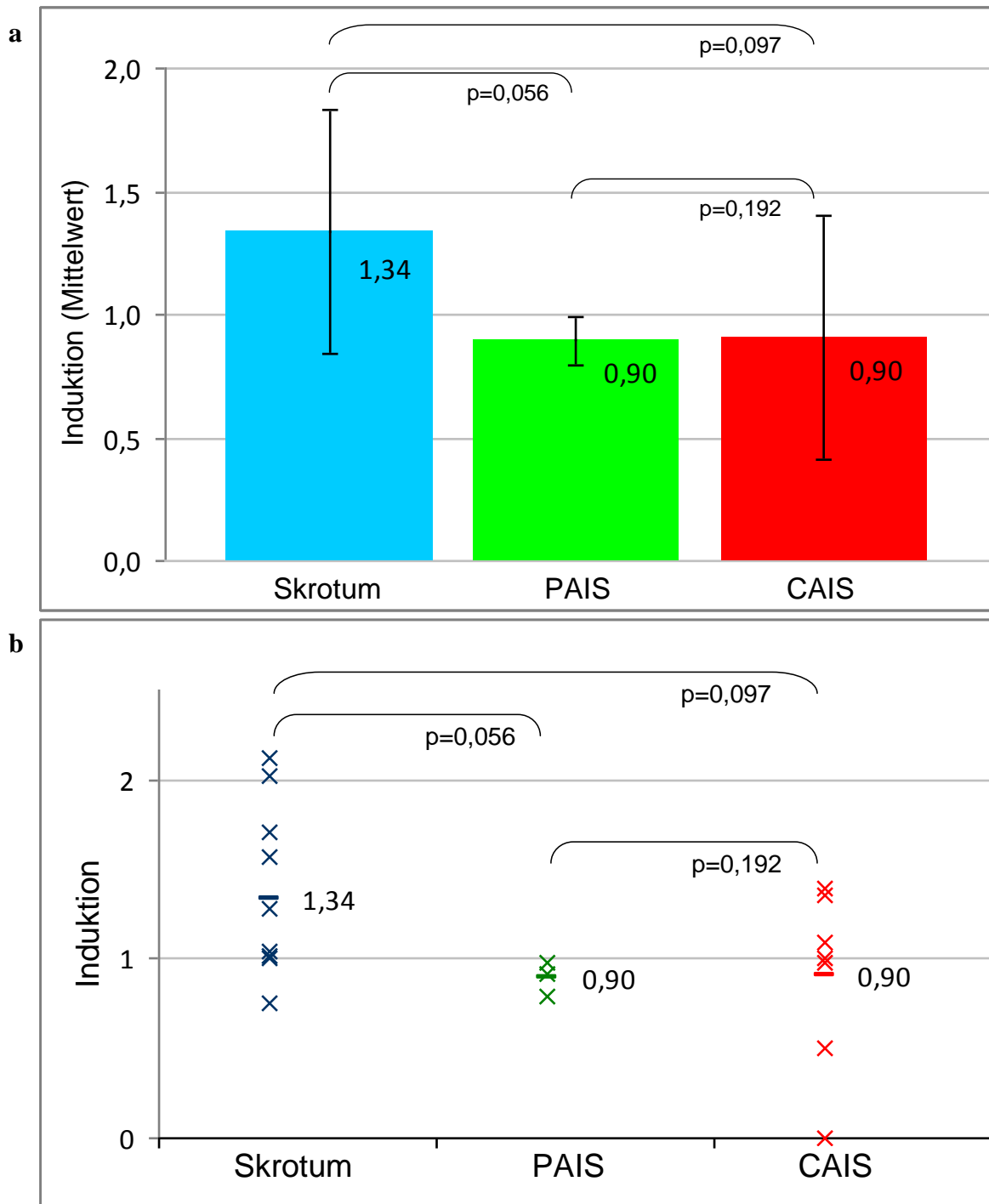
Nach Ausweitung der qRT-PCR-Experimente auf weitere Zellreihen konnte eine geringe Induktion (Mittelwert=1,34; Standardabweichung=0,49) durch DHT in den männlichen Normalkontrollen gezeigt werden. Es bestand jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied der Induktionen sowohl zwischen normalen Skrotum- und CAIS-Zellreihen ( $p=0,097$ ), als auch zwischen Skrotum- und PAIS-Proben ( $p=0,056$ ). Für die Signifikanzanalysen wurde ein einseitiger Wilcoxon-Rangsummentest angewendet (Abb. 5).

Zusätzlich zu diesen diskrepanten Ergebnissen konnten in den Microarraydaten insgesamt drei Transkripte von PGM5P1 / PGM5 gefunden werden, die im Gegensatz zu dem ursprünglich identifizierten Transkript keinerlei Induktion durch Androgene zeigten. Somit lag die Vermutung nahe, dass es sich bei PGM5P1 nicht um das zuvor als androgenreguliert identifizierte Transkript handelte oder dass ein Fehler in den Microarrays selbst vorlag. Im Anschluss wurden deshalb im Rahmen dieser Doktorarbeit die vorliegenden Microarray-Daten komplett erneut analysiert.



**Abb. 4: Korrelation zwischen Microarray und qRT-PCR für PGM5P1**

Es wurden jeweils die logarithmierten Quotienten der Expression von PGM5P1 und SDHA (Housekeeping-Gen) aufgetragen (Wertetabelle S. 44).



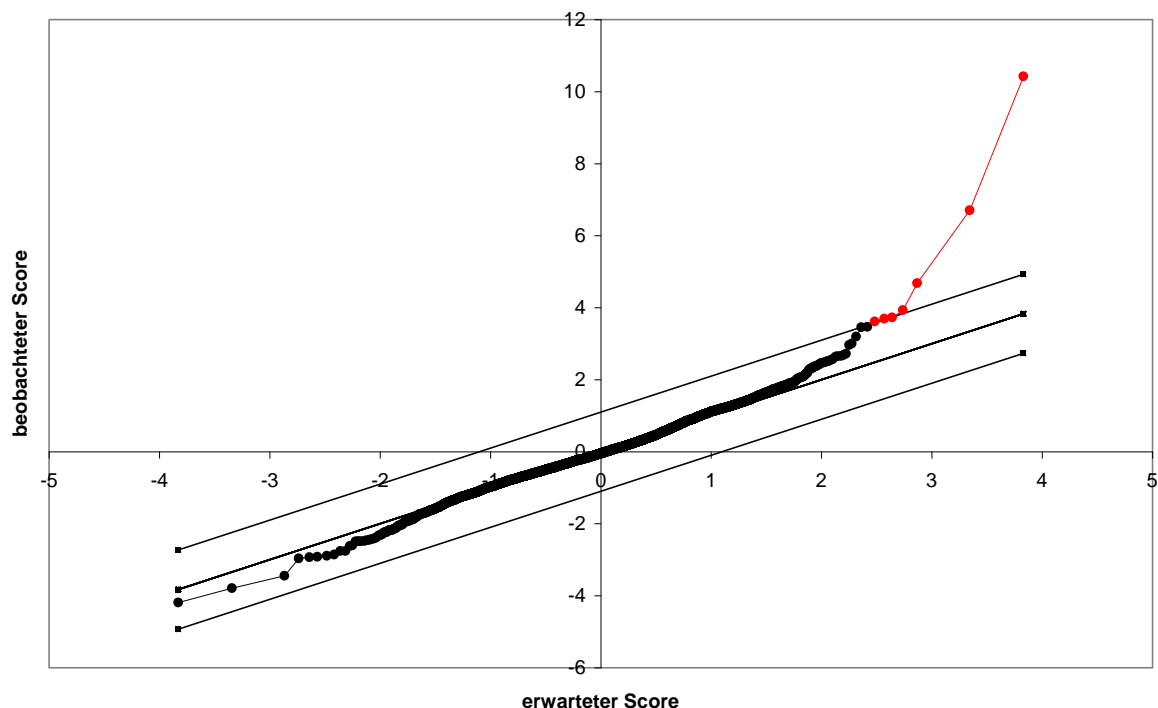
**Abb. 5: Induktion von PGM5P1**

**a** Mittelwerte und Standardabweichungen der Induktion von PGM5P1 nach Behandlung mit DHT in den Zelllinien der verschiedenen Patientengruppen. Mittels einseitigen Wilcoxon-Rangsummentests wurden die p-Werte zwischen den verschiedenen Zellreihen errechnet.

**b** Induktionen von PGM5P1 nach Behandlung mit DHT in den verschiedenen Zelllinien und Mittelwerte der Patientengruppen. Mittels einseitigen Wilcoxon-Rangsummentests wurden die p-Werte zwischen den verschiedenen Zellreihen errechnet (Wertetabelle S. 45).

### 3.2 Significance Analysis of Microarrays (SAM)

Für die Wiederholung der Significance Analysis of Microarrays (SAM) wurden die Daten gefiltert aus der Stanford Microarray Database heruntergeladen (Fluoreszenz-Signal in mindestens einem Kanal  $\geq 1,5$ -fach über der Hintergrund-Intensität, logarithmierte und normalisierte Mittelwerte der Rot/Grün Ratios), was eine Ausgangszahl von 38876 Transkripten ergab. Nach weiterer Filterung mit der Software Cluster 3.0 (nur Spots mit  $\geq 80\%$  verwertbaren Daten und Transkriptionsunterschieden  $\geq 2$ -fach in mindestens 2 von 16 Experimenten) ergab sich ein Datensatz von 6674 Sequenzen für die weiteren Berechnungen. Die Analyse der Microarray-Experimente mit normalen männlichen Kontrollen (Datentyp *two class paired*) lieferte sieben signifikante Transkripte bei einer Falsch-Erkennungs-Rate von Null (Abb. 6). Hierzu zählten zwei Transkripte des bereits früher untersuchten und identifizierten Apolipoprotein D (APOD), gefolgt von zwei Transkripten der Phosphatidat-Phosphatase Typ 2B (PPAP2B), Phosphoglucomutase 5 Pseudogen 1 (PGM5P1), *Methyltransferase like 7A* (METTL7A) und *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1) (Tabelle 2). Zwei dieser Gene (APOD und PGM5P1) waren bereits in der früheren SAM entdeckt worden (Appari et al. 2009). Der zuvor entdeckte transkribierte Locus AA459734 (Appari et al. 2009) bestätigte sich nicht erneut, weshalb dieser nicht weiter untersucht wurde. Stattdessen zeigten sich mehrere neue Gene, darunter das mit zwei signifikanten Transkripten sehr vielversprechende Kandidatengen PPAP2B. Hinter dem bereits durch qRT-PCR bestätigten APOD erreichte PPAP2B die beiden höchsten Scores in der SAM. Aufgrund dieser neuen Ergebnisse wurde in dieser Doktorarbeit die qRT-PCR-Untersuchung für PPAP2B durchgeführt.



**Abb. 6: Ergebnisgraph der Significance Analysis of Microarrays (SAM)**

Beobachtete Scores wurden gegenüber erwarteten Scores aufgetragen. Die roten Punkte repräsentieren die sieben Transkripte, die bei einer Falsch-Erkennungs-Rate von Null signifikant durch DHT induziert wurden.

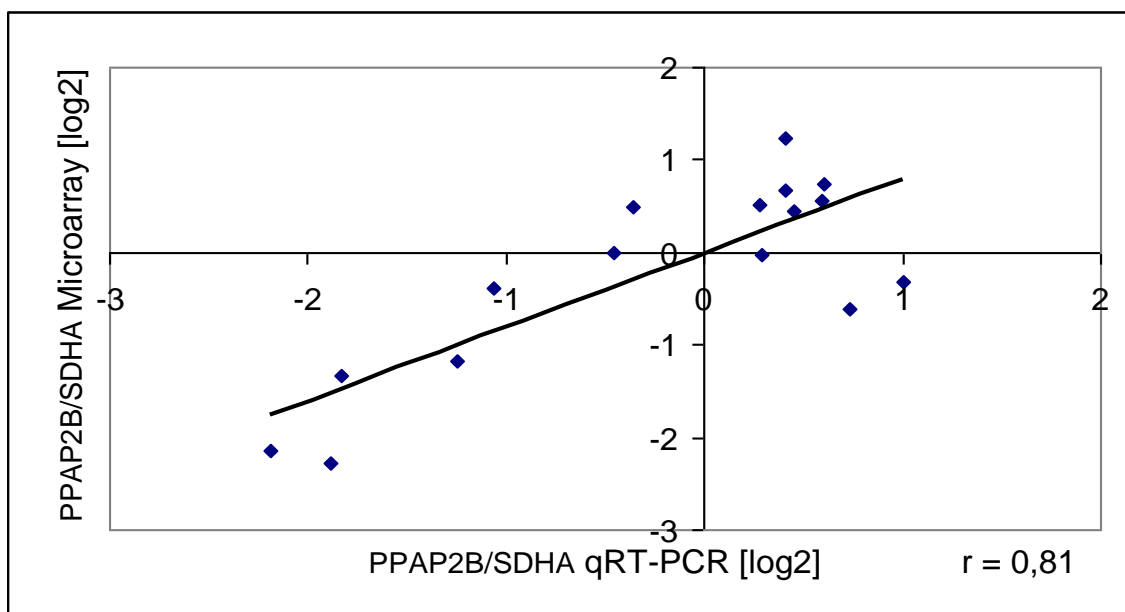
**Tabelle 2: Auflistung der sieben signifikanten Transkripte der SAM**

Gen ID	Name	Score (beobachtet)	Induktion [-fach]
IMAGE:159608	<i>Apolipoprotein D::Transcribed locus</i>    APOD    H15842::H16152	10.42	5.21
IMAGE:838611	<i>Apolipoprotein D</i>    APOD    AA456975::AA457084	6.70	2.77
IMAGE:85394	<i>Phosphatidic acid phosphatase type 2B</i>    PPAP2B    T71976::T72119	4.68	1.59
IMAGE:489201	<i>Phosphatidic acid phosphatase type 2B</i>    PPAP2B    AA058383	3.94	1.74
IMAGE:898133	AA598500 *	3.73	2.41
IMAGE:450938	<i>Methyltransferase like 7A</i>    METTL7A    AA704713	3.69	1.39
IMAGE:49164	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>    VCAM1    H16591::H16637	3.62	1.47

\* AA598500 wurde zuvor als PGM5P1 identifiziert (Appari et al. 2009)

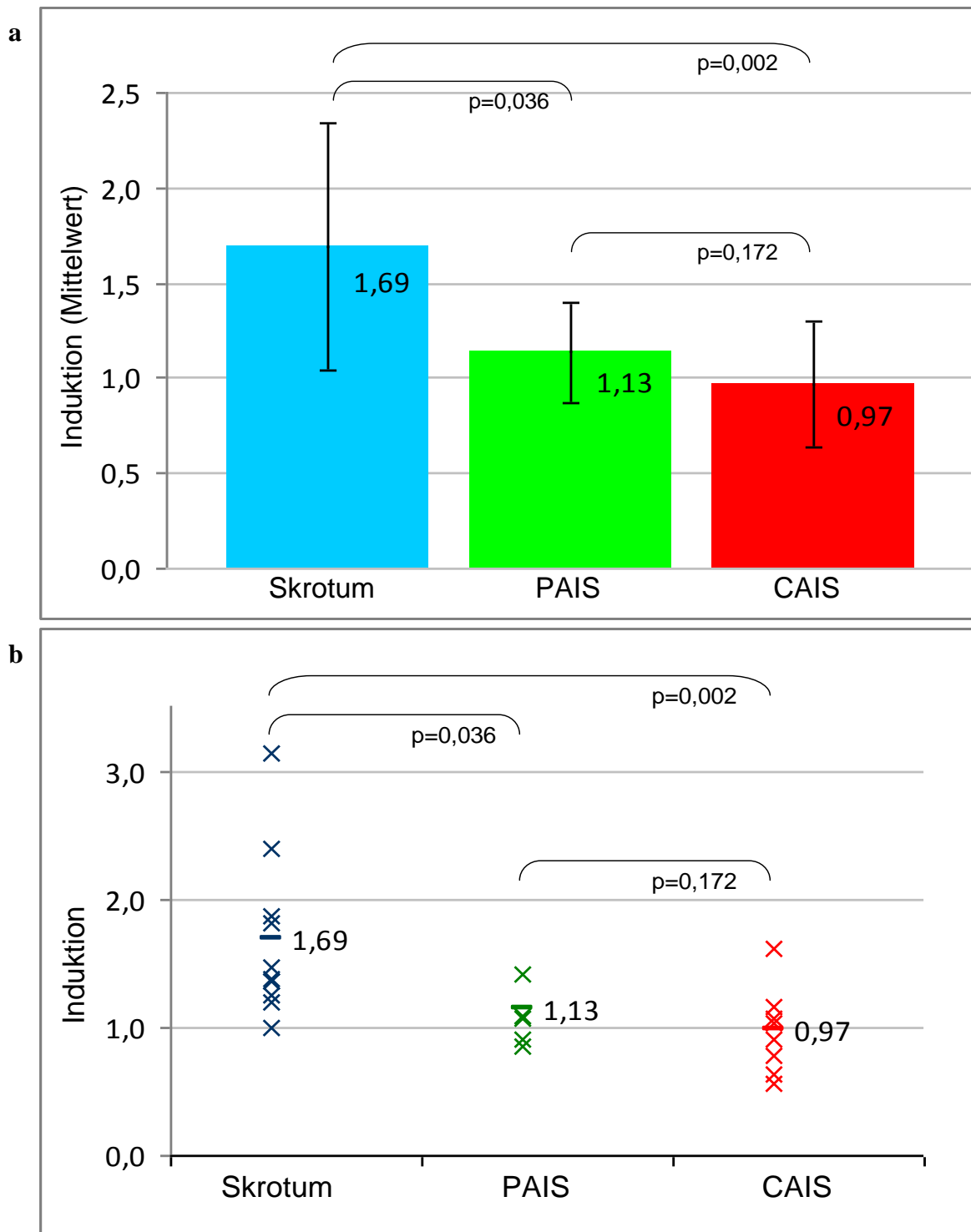
### 3.3 qRT-PCR für PPAP2B

Die qRT-PCR-Untersuchung von PPAP2B zeigte eine gute Korrelation zwischen qRT-PCR- und Microarray-Daten ( $r=0,81$ ; Pearson-Korrelationskoeffizient) (Abb. 7). Nach Ausweitung der Experimente auf von den Microarrays unabhängige Zellkulturen ergab sich eine im Mittel 1,69-fache Induktion von PPAP2B durch DHT (Standardabweichung=0,65) in den Zellreihen der männlichen Normalkontrollen. Diese Induktion unterschied sich signifikant vom geringen bis fehlenden Ansprechen auf DHT sowohl in den PAIS-Proben ( $p=0,036$ ) als auch in den CAIS-Proben ( $p=0,002$ ). Zwischen PAIS und CAIS bestand hingegen kein signifikanter Unterschied ( $p=0,172$ ). Für die Signifikanzanalysen wurde erneut ein einseitiger Wilcoxon-Rangsummentest angewendet (Abb. 8). Die Androgenregulation von PPAP2B in der Microarrayanalyse konnte mittels qRT-PCR bestätigt werden.



**Abb. 7: Korrelation zwischen Microarray und qRT-PCR für PPAP2B**

Es wurden jeweils die logarithmierten Quotienten der Expression von PPAP2B und SDHA (Housekeeping-Gen) aufgetragen (Wertetabelle S. 46).



**Abb. 8: Induktion von PPAP2B**

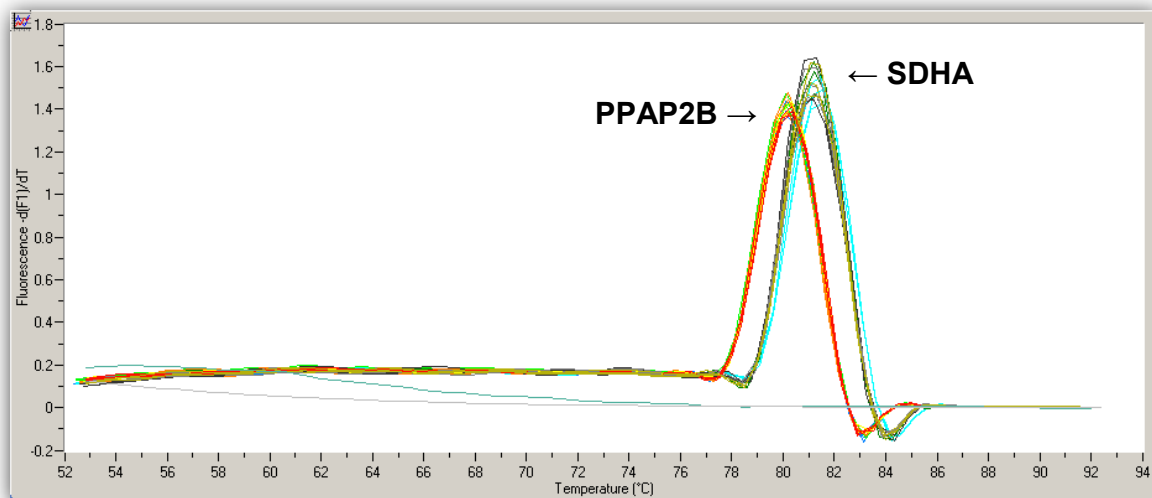
**a** Mittelwerte und Standardabweichungen der Induktion von PPAP2B nach Behandlung mit DHT in den Zelllinien der verschiedenen Patientengruppen. Mittels einseitigen Wilcoxon-Rangsummentests wurden die p-Werte zwischen den verschiedenen Zellreihen errechnet.

**b** Induktionen von PPAP2B nach Behandlung mit DHT in den verschiedenen Zelllinien und Mittelwerte der Patientengruppen. Mittels einseitigen Wilcoxon-Rangsummentests wurden die p-Werte zwischen den verschiedenen Zellreihen errechnet (Wertetabelle S. 47).



### 3.4 Schmelzkurvenanalysen

Jeder qRT-PCR-Lauf wurde mit einer Schmelzkurvenanalyse abgeschlossen, um die spezifische Amplifikation zu überprüfen. Für alle Experimente, die in dieser Arbeit berücksichtigt wurden, zeigten sich spezifische schmale Peaks sowohl für das Ziel- als auch für das Housekeeping-Gen (Abb. 9). Dies bestätigte durch die jeweils charakteristische Schmelztemperatur (Denaturierung der PCR-Produkte) die spezifische Amplifikation. In den Negativkontrollen kam es erwartungsgemäß zu keiner Amplifikation.

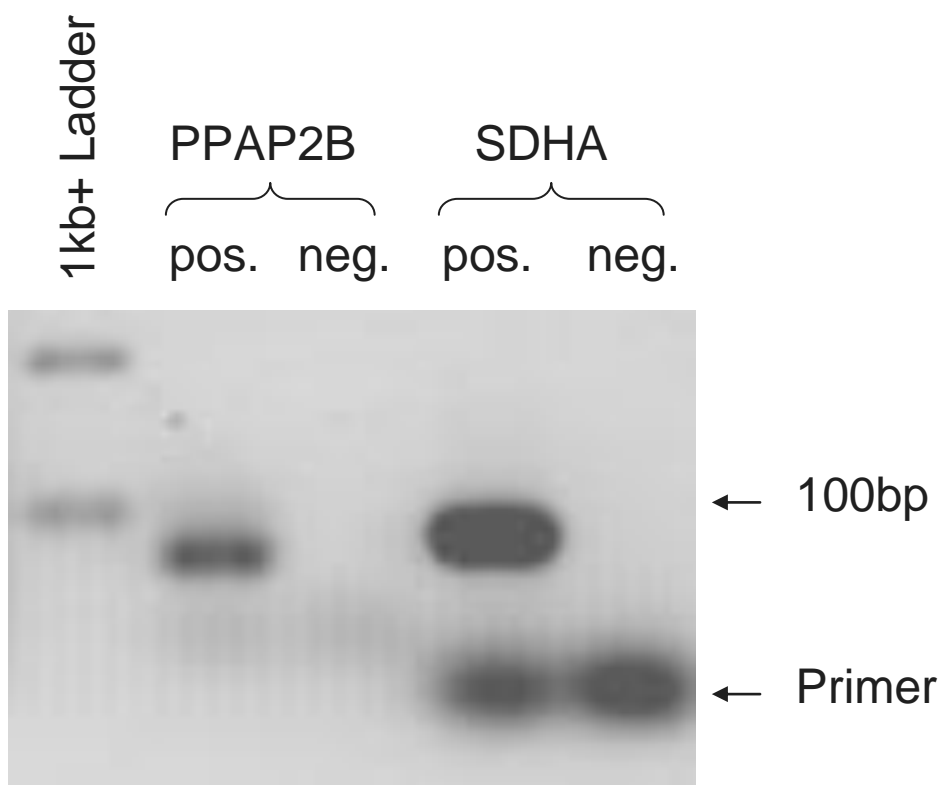


**Abb. 9: Schmelzkurvenanalyse (exemplarisch) für PPAP2B**

Die Fluoreszenzänderung wurde gegenüber der Temperatur aufgetragen. Es sind zwei klar abgrenzbare Peaks für PPAP2B und SDHA zu erkennen, die Ausdruck der spezifischen Amplifikation sind. In den Negativkontrollen fand keine Amplifikation statt, weshalb sich hier auch keine Fluoreszenzänderung darstellt.

### 3.5 Agarosegelelektrophorese der Produkte der qRT-PCR für PPAP2B

Um neben der Schmelzkurvenanalyse eine weitere Bestätigung der spezifischen Amplifikation von PPAP2B zu erhalten, wurde eine Agarosegelelektrophorese der qRT-PCR-Produkte durchgeführt. Hierbei zeigten sich in den Positivkontrollen spezifische Banden sowohl für PPAP2B als auch für das Housekeeping-Gen SDHA im Größenbereich der erwarteten Amplicons. In den Negativkontrollen kamen lediglich die Primer zur Darstellung (Abb. 10). Die Amplifikation genomischer DNA wurde durch die Wahl von Intron-überspannenden Primern (*intron spanning primers*) ausgeschlossen.



**Abb. 10: Agarosegelelektrophorese der qRT-PCR-Produkte**

Es zeigen sich deutliche Banden in den Positivkontrollen sowohl für PPAP2B als auch für das Housekeeping-Gen SDHA. Keine Amplifikation in den Negativkontrollen (Bild invertiert).

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodenkritik qRT-PCR

Nach der Entdeckung der PCR durch Kary Mullis im Jahre 1983 (Saiki et al. 1985) wurden rasch weitergehende Verfahren entwickelt, um eine Quantifizierung der amplifizierten DNA zu ermöglichen.

Heute kann die quantitative Echtzeit-PCR auf Einzelgenebene als Goldstandard zur Überprüfung von Transkriptionsdaten, die mittels cDNA-Microarrays auf Genomebene gemessen wurden, angesehen werden. Sie stellt hierbei ein schnelles und relativ einfaches Verfahren dar (VanGuilder et al. 2008).

Die Verwendung des in doppelsträngige DNA interkalierenden SYBR Green I als Detektions-Farbstoff bietet den Vorteil der universellen Anwendbarkeit, da keine speziell markierten Primer hergestellt werden müssen. Zudem sind die erzeugten Fluoreszenzsignale so stark, dass eine unproblematische Detektion möglich ist. Aus der universellen Anwendungsfähigkeit ergibt sich jedoch gleichzeitig auch der Nachteil, dass keine alleinige Markierung der gewünschten PCR-Produkte sichergestellt ist. Der Farbstoff kann neben den spezifischen Amplifikationsprodukten auch in Primer-Dimere oder andere unspezifisch amplifizierte DNA-Fragmente interkalieren (VanGuilder et al. 2008). Diese Störfaktoren können jedoch durch eine Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an jeden qRT-PCR-Lauf erkannt bzw. ausgeschlossen werden, ohne dass eine zusätzliche Gelelektrophorese der Produkte erforderlich ist (Ririe et al. 1997). Für die in dieser Arbeit untersuchten Gene konnte in den Schmelzkurvenanalysen stets eine spezifische Amplifikation bestätigt werden, ohne Anhalt für Primer-Dimere oder unspezifische DNA-Amplifikationen. Durch die Wahl von Intron-überspannenden Primern (*intron spanning primers*), wurde die Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen.

Bei der quantitativen Untersuchung der Transkription bzw. DHT-vermittelten Induktion einzelner Gene spielt die absolute cDNA-Menge eine untergeordnete Rolle, da sie unter anderem in Abhängigkeit von der Effizienz der reversen Transkription stark schwankt. Aus diesem Grund wurde eine relative Quantifizierung gewählt, bei der die Expression des untersuchten Gens ins Verhältnis zu einem Housekeeping-Gen als endogene Kontrolle gesetzt wird. Dieses Gen sollte über die verschiedenen Proben und Behandlungen hinweg stabile Expressionslevel aufweisen und gleicht somit Unterschiede in der eingesetzten DNA-Menge aus (VanGuilder et al. 2008). Für das hier verwendete Gen SDHA konnten in

unterschiedlichen Untersuchungen verhältnismäßig konstante Transkriptionsraten nachgewiesen und eine Eignung als interne Kontrolle bestätigt werden (Silver et al. 2006, 2008). Zudem wurde dieses Gen bereits erfolgreich (da nicht androgenreguliert) bei den hier untersuchten Genitalhautfibroblasten angewendet (Appari et al. 2009).

Als Maß für die vorliegende Menge des untersuchten Gens werden vom LightCycler die sogenannten *Crossing Points* (Cp) bestimmt. Sie geben den PCR-Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant das Hintergrundniveau übersteigt. Theoretisch könnte aus der Differenz der *Crossing Points* von Ziel-Gen und Housekeeping-Gen nun die relative Expression des Ziel-Gens berechnet werden. Dies setzt jedoch die Annahme idealer Amplifikationsbedingungen mit einer maximalen Effizienz (exakte Verdoppelung der Kopienzahl mit jedem Zyklus) voraus (Pfaffl 2001). Da diese Voraussetzung in der Praxis nicht erfüllt werden kann und die Effektivität der DNA-Vervielfältigung von verschiedensten Faktoren abhängt, ist eine Effizienzkorrektur notwendig. Hierzu wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen Standardkurven sowohl für das Ziel- als auch für das Housekeeping-Gen erstellt, aus denen sich die Effizienzen ableiten ließen. Sie dienten später der Korrektur der gemessenen *Crossing Points* in der LightCycler Software und konnten damit eine optimale Berechnung der relativen Expressionen gewährleisten.

Um einen einheitlichen Bezugspunkt über alle PCR-Läufe hinweg zu erhalten und Unterschiede der Detektionssensitivität auszugleichen, wurde in allen Experimenten der gleiche Kalibrator (S 15, EtOH) als positive Vergleichsprobe eingesetzt. Er diente zudem der Normalisierung aller Proben innerhalb eines Laufs. Jede Probe wurde in dreifacher Ausfertigung (je drei gleiche Kapillaren) gemessen, um eventuelle Pipettierfehler auszugleichen und Messungenauigkeiten zu minimieren. Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte zudem durch einen von den Microarray-Experimenten unabhängigen Untersucher.

Insgesamt kann von einer spezifischen Quantifizierung der untersuchten Gene mittels qRT-PCR ausgegangen werden.

#### **4.2 Phosphoglucomutase 5 Pseudogen 1 (PGM5P1)**

Leider konnte für das Gen PGM5P1 in der qRT-PCR nicht die erwartete, signifikante Induktion durch die Behandlung mit DHT gezeigt werden. Die Daten lassen eine möglicherweise geringe Androgenregulation vermuten, für einen potentiell signifikanten Nachweis wäre jedoch ein größeres Probenkollektiv notwendig. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu der zuvor durchgeführten Microarray-Untersuchung, die das Transkript als vermutlich signifikant androgeninduziert erkannt hatte (Appari et al. 2009). Bestätigt wird

diese Diskrepanz auch durch die mangelnde Korrelation zwischen beiden Untersuchungen, also zwischen der von mir neu durchgeführten qRT-PCR für PGM5P1 und den bestehenden Microarraydaten (Abb. 4).

Als mögliche Ursache für die diskrepanten Ergebnisse zwischen Microarrays und qRT-PCR müssen verschiedene Fehlerquellen in Betracht gezogen werden. Eine Durchsicht der Microarray-Daten zeigte außer dem beschriebenen „signifikanten“ Spot für PGM5P1 einen weiteren Spot für PGM5P1 sowie noch zwei weitere für Phosphoglucomutase 5 (PGM5), die alle keinerlei Induktion durch DHT aufwiesen. Diese Entdeckungen sprechen neben dem Ergebnis der qRT-PCR gegen eine tatsächliche Androgenregulation von PGM5P1 und für eine unvollständige Gesamtbewertung bei der vorherigen Identifizierung des Gens in den Microarrays. Zum einen wäre eine fehlerhafte Significance Analysis of Microarrays (SAM) denkbar. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da eine Wiederholung der Analyse durch mich erneut den gleichen Spot identifizierte. Zum anderen könnte ein Fehler in der Zuordnung des Microarray-Spots zum Transkript (*accession number* AA598500) seitens des Microarrayherstellers Stanford University oder zum Gen PGM5P1 seitens Appari et al. 2009 vorliegen. Letzteres wurde mehrfach überprüft und ergab eine Übereinstimmung von 95% über eine Länge von 258bp zwischen dokumentierter Sequenz des Transkripts und annotiertem Gen. Denkbar wäre auch ein Problem auf Ebene der Microarrays bzw. der Hybridisierung selbst. Dagegen spricht jedoch, dass die in dieser Arbeit verwendeten Microarrays bereits zuvor erfolgreich bei der Identifikation des androgenregulierten Gens APOD eingesetzt wurden und die Ergebnisse für dieses Gen einwandfrei mittels qRT-PCR bestätigt werden konnten (Appari et al. 2009). Allgemein wird für die cDNA-Microarrays aus Stanford eine sehr gute Reproduzierbarkeit beschrieben, wobei eine sehr gute Korrelation zwischen gleichen Spots innerhalb eines Arrays besteht (>95%) und eine etwas geringere Korrelation zwischen gleichen Spots in verschiedenen Arrays, die mit der gleichen Probe durchgeführt worden sind (60-80%) (Churchill et al. 2002). Aufgrund letzterer Angabe sind bei einer Vielzahl von gleichzeitig untersuchten Transkripten auch zufällige Effekte denkbar, die zu einer falsch-positiven Identifikation von Transkripten führen könnten. Die bereits zuvor diskutierte spezifische Quantifizierung mittels qRT-PCR lässt einen Fehler in dieser Untersuchung wenig wahrscheinlich erscheinen.

Insgesamt kann keine eindeutige Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse für PGM5P1 gefunden werden. Eine tatsächliche Androgenregulation des Gens muss jedoch kritisch betrachtet werden. Für eine genauere Aussage hierzu müsste eine größere Anzahl an Proben untersucht werden.

### 4.3 Wiederholung der Significance Analysis of Microarrays (SAM)

Auf der Suche nach einem Grund für die unzureichende Korrelation zwischen Microarrays und qRT-PCR in Bezug auf PGM5P1 wurde die zuvor (Appari et al. 2009) durchgeführte Significance Analysis of Microarrays wiederholt. Hierbei ergab sich keine Erklärung für die Diskrepanzen, da PGM5P1 erneut identifiziert wurde. Stattdessen zeigten sich jedoch abweichend von der vorherigen Analyse zusätzlich vier neue signifikante Transkripte: zwei Transkripte der Phosphatidat-Phosphatase Typ 2B (PPAP2B), *Methyltransferase like 7A* (METTL7A) und *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1). Der transkribierte Locus AA459734 bestätigte sich nicht erneut, da im Gegensatz zur vorherigen Analyse ein anderer, den tatsächlichen experimentellen Bedingungen angepasster Rechenalgorithmus (*two class paired*) benutzt wurde.

Insbesondere PPAP2B musste als neues, interessantes Kandidatengen gesehen werden, da hierfür gleichzeitig zwei unabhängige signifikante Transkripte nachgewiesen werden konnten. D.h. es gibt zwei Microarray-Spots, die eine signifikante Induktion von PPAP2B zeigen und somit die Wahrscheinlichkeit der Erkennung als falsch-positiv erheblich reduzieren. Aufgrund dieser neuen Ergebnisse erfolgte anschließend die Untersuchung von PPAP2B mittels qRT-PCR.

### 4.4 Phosphatidat-Phosphatase Typ 2B (PPAP2B)

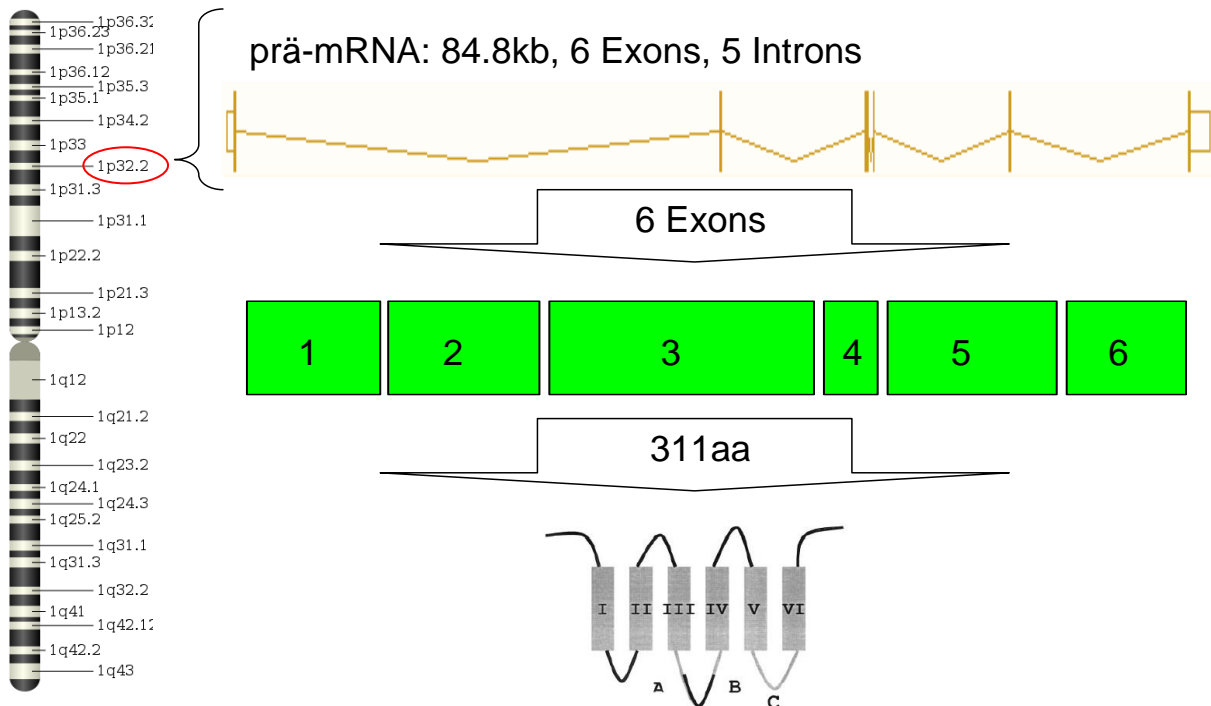
#### 4.4.1 Ergebnisse

Für PPAP2B war mittels Schmelzkurvenanalyse und Agarosegelelektrophorese der qRT-PCR-Produkte eine spezifische Amplifikation in der qRT-PCR nachweisbar. In den normalen männlichen Skrotumfibroblasten konnte eine signifikante Androgenregulation auf Transkriptionsebene mittels qRT-PCR gezeigt und somit das Ergebnis der Microarray-Untersuchungen bestätigt werden. Dieses Resultat wird von der guten Korrelation zwischen Microarray- und qRT-PCR-Daten unterstützt (Abb. 7). Des Weiteren wurde der Zusammenhang nicht allein für die wenigen, in den Microarray-Experimenten untersuchten Zelllinien gezeigt, sondern konnte in weiteren, unabhängigen Proben bestätigt werden. Aufgrund der verhältnismäßig geringen Induktion ist eine Eignung des Transkripts als Biomarker für die Androgenwirkung eher kritisch zu sehen, da für einzelne Proben auf Grundlage der Induktion keine eindeutige Zuordnung in die verschiedenen Gruppen (Skrotum, PAIS, CAIS) möglich ist. Dennoch lassen sich möglicherweise wichtige Erkenntnisse für bisher unbekannte Zusammenhänge in der Geschlechtsentwicklung bzw. Androgenwirkung ableiten.

#### 4.4.2 Informationen über das Gen PPAP2B

Das Gen PPAP2B (Phosphatidat-Phosphatase Typ 2B) ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 lokalisiert (1p32.2) und umfasst 6 Exons und 5 Introns (Flicek et al. 2011) (Abb. 12). Alternative Bezeichnungen sind LPP3 (Lipidphosphat-Phosphohydrolase 3), VCIP (*vascular endothelial growth factor and type I collagen inducible protein*) und Dri42 (*differentially expressed in rat intestine 42*). Das Protein gehört zur Familie der Phosphatidat-Phosphatasen (Brindley et al. 1998). Die Aktivität von PPAP2B ist  $Mg^{2+}$ -abhängig und mit der Plasmamembran assoziiert. Sechs putative Transmembrandomänen unterstützen die Annahme, dass es sich um ein integrales Membranprotein handelt. Zudem können mehrere Regionen mit konservierten Sequenzen ausgemacht werden, die typisch für Lipid-Phosphatasen sind. Das Enzym katalysiert die Dephosphorylierung von Phosphatidsäure (PA) zu Diacylglycerol (DAG). Als weitere Substrate sind Lysophosphatidsäure (LPA), Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Ceramid-1-Phosphat (C1P) beschrieben worden (Roberts et al. 1998).

Eine Betrachtung der Promotorregion von PPAP2B zeigte verschiedene Teilsequenzen androgenresponsiver Elemente (ARE) im Sinne von typischen Hexameren (AGAACA und TGTTCT), denen jedoch die invertierten oder direkten Wiederholungen im Abstand von 3 Nukleotiden fehlen. Die Teilsequenzen können als putative Konsensussequenzen für die Bindung des Androgenrezeptors angesehen werden und sind möglicherweise unabhängiges Indiz einer Androgenregulation auf DNA-Ebene (Claessens et al. 2001). Zudem gibt es eine Veröffentlichung, die für Untersuchungen an LNCaP-Zellen die androgenabhängige Induktion eines Transkripts beschreibt, das von den Autoren als PPAP2A identifiziert wurde, welches zu 47% mit PPAP2B übereinstimmt (Ulrix et al. 1998). Möglicherweise gibt es einen funktionellen Zusammenhang mit dem in dieser Doktorarbeit identifizierten Gen.



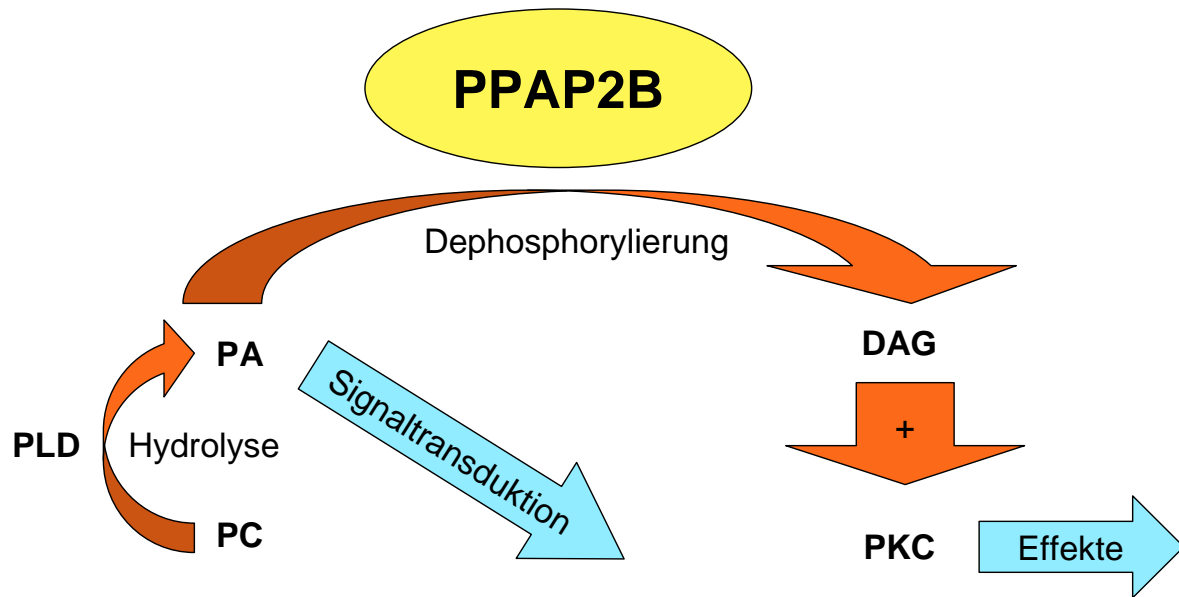
**Abb. 12: PPAP2B**

Das Gen PPAP2B liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 1. Sein primäres Transkript besitzt 6 Exons und 5 Introns. Das translatierte Protein umfasst 311 Aminosäuren mit 6 putativen Transmembran-Domänen und mehreren konservierten Sequenzen (A, B, C), die typisch für Lipid-Phosphatasen sind (nach Flicek et al. 2011, Roberts et al. 1998).

#### 4.4.3 Mögliche biologische Funktionen von PPAP2B

PPAP2B kann mit vielfältigen biologischen Funktionen in Verbindung gebracht werden. Grundsätzlich kann PPAP2B über die Dephosphorylierung von Phosphatidsäure (PA) zu Diacylglycerol (DAG) verschiedenste biologische Effekte auslösen, die unter anderem auf der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG beruhen (Roberts et al. 1998) (Abb. 13). Diese möglichen Effekte reichen von wichtigen Aufgaben in der Signaltransduktion über fundamentale Bereiche wie die Zellproliferation bis hin zu Vorgängen von Immunsystem und Gedächtnis (Mellor et al. 1998). Gleichzeitig kann über die Dephosphorylierung von PA sowie weiterer Substrate deren biologische Wirkung verringert oder beendet werden. Zu den zellulären Zielsignalwegen von PA gehören unter anderem Raf Protein-Kinasen, Ras GTPase-aktivierendes Protein und verschiedene Proteine der Zytoskelett-Organisation (Roberts et al. 1998).





**Abb. 13: Funktionen des Proteins PPAP2B**

PPAP2B beendet die Signaltransduktion durch PA und kann über die Aktivierung von PKC weitere Effekte vermitteln. Zudem können auch andere Substrate dephosphoryliert werden. (PC, Phosphatidylcholin; PLD, Phospholipase D; PA, Phosphatidsäure; DAG, Diacylglycerol; PKC, Proteinkinase C) (eigene Abbildung)

Für PPAP2B wurde ein inhibierender Einfluss auf den Wnt-Signalweg beschrieben (Escalante-Alcade et al. 2003). Eine Inaktivierung des PPAP2B-Gens in embryonalen Maus-Stammzellen führte zu erhöhten Werten von  $\beta$ -Catenin, während das Einfügen einer PPAP2B-Expressionskassette in diese Zellen eine Verringerung von Proteinen des Wnt-Signalwegs zur Folge hatte (Escalante-Alcade et al. 2003). Eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs, wie diese durch Wnt4 und Rspo1 geschieht, ist für eine normale weibliche Geschlechtsentwicklung notwendig (Chassot et al. 2008, Maatouk et al. 2008). Angenommen wird eine Wirkung von Wnt4 und Rspo1 als Gegenspieler der männlichen Differenzierung der bipotenten Gonadenanlage durch SOX9 und FGF9 (Maatouk et al. 2008). Durch eine Aktivierung von  $\beta$ -Catenin als wichtiger Effektor des Wnt-Signalwegs in normalen männlichen Gonadenanlagen konnte ein Stopp des männlichen Differenzierungsprogramms ausgelöst und ein Wechsel in die weibliche Entwicklung angestoßen werden (*male-to-female sex-reversal*) (Maatouk et al. 2008). Möglicherweise ist PPAP2B mit der inhibierenden Wirkung auf den Wnt-Signalweg wichtig für eine normale männliche Geschlechts- bzw. Gonadenentwicklung. Neben der (testosteronunabhängigen) Wirkung auf die bipotente Gonadenanlage könnte auch eine spätere androgenregulierte Wirkung zur Aufrechterhaltung des frühen männlichen Entwicklungsprogramms beitragen.

Experimente mit einer Inaktivierung von PPAP2B in Maus-Embryonen führten zu einem letalen Ausgang in der Embryonalentwicklung durch Defekte in der extraembryonalen Vaskularisierung und in der Gastrulation (Escalante-Alcade et al. 2007). Weitere Untersuchungen zeigten eine sehr dynamische Expression des Gens in der Embryonalperiode und legten die Vermutung nahe, dass PPAP2B eine Schlüsselrolle in der Modulation und Integration verschiedener Signalwege übernimmt (Escalante-Alcade et al. 2009). Allgemein wurde auch ein regulierender Einfluss von PPAP2B auf Endothelzellen bei der Angiogenese beschrieben (Humtsoe et al. 2010).

Sequenzanalysen zeigen, dass die Drosophila-Proteine *wunen* (wun) und *wunen-2* (wun2) den humanen Phosphatidat-Phosphatasen entsprechen. Hierbei haben beide Proteine die größte Homologie zum humanen PPAP2B (Burnett und Howard 2003). Wun und wun2 spielen eine wichtige Rolle bei der Migration und beim Überleben der Urkeimzellen. Den Proteinen wird eine Abstoßungswirkung zugesprochen, die sowohl für die Wanderung der Keimzellen von ihrem Ursprung als auch für die Aufteilung auf die paarigen Gonadenanlagen notwendig ist. Diese Funktionen sind somit auch für die spätere Fertilität wichtig (Sano et al. 2005, Renault et al. 2010).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich mögliche biologische Zusammenhänge von PPAP2B sowohl mit der Geschlechtsentwicklung als auch mit der Keimzell-Migration und der späteren Fertilität aufzeigen lassen. Bei einer der in dieser Arbeit untersuchten männlichen Kontrollen (S 13) zeigte sich keine Induktion von PPAP2B nach Behandlung mit DHT. Gleichzeitig bestand bei diesem Patienten eine Azoospermie. Nach den vorhergehenden Überlegungen könnte eine Infertilität mit einer Funktionsstörung von PPAP2B zusammenhängen. Zur Konkretisierung und Überprüfung dieser Ansätze sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, die möglicherweise Zusammenhänge zwischen Veränderungen von PPAP2B und Störungen der Geschlechtsentwicklung oder der Fertilität bestätigen könnten.

## 5 Zusammenfassung

Eine der häufigsten Ursachen einer Störung der Geschlechtsentwicklung ist ein Defekt des Androgenrezeptors. Die Bandbreite reicht von einer kompletten Androgenresistenz (CAIS) mit vollständig weiblichem äußerem Genitale über Formen partieller Androgenresistenz (PAIS) mit ambivalentem Genitale bis hin zur minimalen Androgenresistenz (MAIS), bei der lediglich eine Infertilität besteht. Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation der Androgenresistenz ist schlecht, sodass selbst bei gleichen Mutationen im Androgenrezeptorgen unterschiedliche klinische Ausprägungen beobachtet werden. Da die Androgenresistenz auch bei intaktem Androgenrezeptor bestehen kann, gibt es möglicherweise Mutationen in bisher nicht bekannten Genen des Androgensignalwegs. Von besonderem Interesse ist die Identifikation androgenregulierter Gene sowohl für die funktionsbasierte Diagnostik der Androgenresistenz (Biomarker der Androgenwirkung) als auch für das Verständnis der zugrundeliegenden biologischen Zusammenhänge.

In Untersuchungen an kultivierten Genitalhautfibroblasten konnte kürzlich erstmals ein androgenreguliertes Gen, das Apolipoprotein D (APOD), als potentieller Biomarker der Androgenwirkung nachgewiesen werden. Hierfür wurde zunächst ein genomweites Screening mittels Microarrays durchgeführt und die Ergebnisse anschließend durch qRT-PCR bestätigt (Appari et al. 2009). In den Microarray-Analysen wurden neben APOD noch weitere androgenregulierte Transkripte entdeckt. Ziel dieser Doktorarbeit war es, diese Transkripte mittels qRT-PCR zu überprüfen und ggf. weitere androgenregulierte Gene zu finden.

Zunächst wurden qRT-PCR-Untersuchungen des zuvor identifizierten Phosphoglucomutase 5 Pseudogen 1 (PGM5P1) durchgeführt. Hierbei zeigte sich zwar eine schwache Induktion in den Zelllinien normaler männlicher Kontrollen, jedoch waren die Unterschiede zu den Zelllinien mit bekanntem Androgenrezeptordefekt nicht signifikant und die Korrelation zwischen qRT-PCR- und Microarray-Daten ungenügend. Eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse konnte nicht gefunden werden, eine Androgenregulation von PGM5P1 muss kritisch hinterfragt werden.

Eine deshalb durchgeführte komplett neue biomathematische Analyse der Microarray-Daten brachte ein zuvor unentdecktes, vielversprechendes Kandidatengen zum Vorschein: Phosphatidat-Phosphatase Typ 2B (PPAP2B). Bei der qRT-PCR-Überprüfung von PPAP2B zeigte sich eine signifikante DHT-vermittelte Induktion in den männlichen Kontrollen gegenüber den CAIS- und PAIS-Zellreihen sowie eine gute Korrelation mit den Microarray-

Daten, was das Gen als androgenreguliertes Transkript bestätigte. In der Literaturrecherche ergaben sich Hinweise darauf, dass PPAP2B über einen inhibierenden Einfluss auf den Wnt- /  $\beta$ -Catenin-Signalweg an der Einleitung und Aufrechterhaltung der männlichen Geschlechtsentwicklung beteiligt sein könnte. PPAP2B stellt in der Zukunft einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur weiteren Aufklärung der menschlichen Geschlechtsentwicklung, einen potentiellen Marker der Androgenwirkung bei Störungen der Geschlechtsentwicklung sowie schließlich auch ein Kandidatengen für die mutationsnegative Androgenresistenz dar. Zudem ist eine Rolle von PPAP2B bei der Keimzellmigration denkbar, was eine Verbindung des Gens mit der späteren Fertilität darstellen könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

- Appari, M., R. Werner, et al. (2009). "Apolipoprotein D (APOD) is a putative biomarker of androgen receptor function in androgen insensitivity syndrome." Journal of Molecular Medicine 87(6): 623-32.
- Beato, M. and J. Klug (2000). "Steroid hormone receptors: an update." Human Reproduction Update 6(3): 225-36.
- Bebermeier, J. H., J. D. Brooks, et al. (2006). "Cell-line and tissue-specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription." Journal of Molecular Medicine 84(11): 919-31.
- Bennett, N. C., R. A. Gardiner, et al. (2009). "Molecular cell biology of androgen receptor signalling." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 42(6): 813-27.
- Berkovitz, G. D., K. M. Carter, et al. (1990). "Testosterone lowers aromatase activity in cultured human genital skin fibroblasts." Molecular and Cellular Endocrinology 69(2-3): 187-97.
- Brindley, D. N. and D. W. Waggoner (1998). "Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases." The Journal of Biological Chemistry 273(38): 24281-4.
- Brown, C. J., S. J. Goss, et al. (1989). "Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism." American Journal of Human Genetics 44(2): 264-9.
- Burnett, C. and K. Howard (2003). "Fly and mammalian lipid phosphate phosphatase isoforms differ in activity both in vitro and in vivo." EMBO reports 4(8): 793-9.
- Chassot, A. A., F. Ranc, et al. (2008). "Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary." Human Molecular Genetics 17(9): 1264-77.
- Churchill, G. A. (2002). "Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays." Nature Genetics 32 Suppl: 490-5.
- Claessens, F., G. Verrijdt, et al. (2001). "Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 76(1-5): 23-30.
- de Hoon, M. J., S. Imoto, et al. (2004). "Open source clustering software." Bioinformatics 20(9): 1453-4.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, et al. (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(25): 14863-8.

- Escalante-Alcalde, D., L. Hernandez, et al. (2003). "The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning." Development 130(19): 4623-37.
- Escalante-Alcalde, D., S. L. Morales, et al. (2009). "Generation of a reporter-null allele of Ppap2b/Lpp3 and its expression during embryogenesis." The International Journal of Developmental Biology 53(1): 139-47.
- Escalante-Alcalde, D., R. Sanchez-Sanchez, et al. (2007). "Generation of a conditional Ppap2b/Lpp3 null allele." Genesis 45(7): 465-9.
- Evans, B. A., I. A. Hughes, et al. (1997). "Phenotypic diversity in siblings with partial androgen insensitivity syndrome." Archives of Disease in Childhood 76(6): 529-31.
- Flicek, P., M. R. Amode, et al. (2011). "Ensembl 2011." Nucleic Acids Research 39(suppl 1): D800-D806.
- Fodor, S. P., J. L. Read, et al. (1991). "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis." Science 251(4995): 767-73.
- Hiort, O. and P. M. Holterhus (2000). "The molecular basis of male sexual differentiation." European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 142(2): 101-10.
- Holterhus, P.-M. (2010). "Störungen der Geschlechtsentwicklung." Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie. O. Hiort, T. Danne and M. Wabitsch: 391-409.
- Holterhus, P. M. (2009). "Störungen der Geschlechtsentwicklung." Gynäkologische Endokrinologie (3): 130-135.
- Holterhus, P. M., U. Deppe, et al. (2007). "Intrinsic androgen-dependent gene expression patterns revealed by comparison of genital fibroblasts from normal males and individuals with complete and partial androgen insensitivity syndrome." BMC Genomics 8: 376.
- Holterhus, P. M., O. Hiort, et al. (2003). "Differential gene-expression patterns in genital fibroblasts of normal males and 46,XY females with androgen insensitivity syndrome: evidence for early programming involving the androgen receptor." Genome Biology 4(6): R37.
- Holterhus, P. M., G. H. Sinnecker, et al. (2000). "Phenotypic diversity and testosterone-induced normalization of mutant L712F androgen receptor function in a kindred with androgen insensitivity." The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 85(9): 3245-50.
- Hughes, I. A. (2001). "Minireview: sex differentiation." Endocrinology 142(8): 3281-7.
- Hughes, I. A. (2002). "Intersex." BJU International 90(8): 769-76.

- Humtsoe, J. O., M. Liu, et al. (2010). "Lipid phosphate phosphatase 3 stabilization of beta-catenin induces endothelial cell migration and formation of branching point structures." Molecular and Cellular Biology 30(7): 1593-606.
- Josso, N., J. Y. Picard, et al. (2006). "Testicular anti-Mullerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications." Pediatric Endocrinology Reviews : PER 3(4): 347-58.
- Koochekpour, S. (2010). "Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer." Asian Journal of Andrology 12(5): 639-57.
- Koopman, P., J. Gubbay, et al. (1991). "Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry." Nature 351(6322): 117-21.
- Lenoir, T. and E. Giannella (2006). "The emergence and diffusion of DNA microarray technology." Journal of Biomedical Discovery and Collaboration 1: 11.
- Lim, H. N. and J. R. Hawkins (1998). "Genetic control of gonadal differentiation." Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism 12(1): 1-16.
- Lubahn, D. B., T. R. Brown, et al. (1989). "Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86(23): 9534-8.
- Maatouk, D. M., L. DiNapoli, et al. (2008). "Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal." Human Molecular Genetics 17(19): 2949-55.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." Cell 83(6): 835-9.
- McPhaul, M. J., M. Marcelli, et al. (1993). "Genetic basis of endocrine disease. 4. The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance." The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 76(1): 17-23.
- Mellor, H. and P. J. Parker (1998). "The extended protein kinase C superfamily." The Biochemical Journal 332 ( Pt 2): 281-92.
- Morrish, B. C. and A. H. Sinclair (2002). "Vertebrate sex determination: many means to an end." Reproduction 124(4): 447-57.
- Nitsche, E. M., A. Moquin, et al. (1996). "Differential display RT PCR of total RNA from human foreskin fibroblasts for investigation of androgen-dependent gene expression." American Journal of Medical Genetics 63(1): 231-8.
- Ostrer, H. (1993). "46,XY Disorder of Sex Development and 46,XY Complete Gonadal Dysgenesis." GeneReviews

- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Research 29(9): e45.
- Quigley, C. A., A. De Bellis, et al. (1995). "Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives." Endocrine Reviews 16(3): 271-321.
- Renault, A. D., P. S. Kunwar, et al. (2010). "Lipid phosphate phosphatase activity regulates dispersal and bilateral sorting of embryonic germ cells in *Drosophila*." Development 137(11): 1815-23.
- Ririe, K. M., R. P. Rasmussen, et al. (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." Analytical Biochemistry 245(2): 154-60.
- Roberts, R., V. A. Sciorra, et al. (1998). "Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform." The Journal of Biological Chemistry 273(34): 22059-67.
- Rodien, P., F. Mebarki, et al. (1996). "Different phenotypes in a family with androgen insensitivity caused by the same M780I point mutation in the androgen receptor gene." The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 81(8): 2994-8.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science 230(4732): 1350-4.
- Sano, H., A. D. Renault, et al. (2005). "Control of lateral migration and germ cell elimination by the *Drosophila melanogaster* lipid phosphate phosphatases Wunen and Wunen 2." The Journal of Cell Biology 171(4): 675-83.
- Silver, N., S. Best, et al. (2006). "Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR." BMC Molecular Biology 7: 33.
- Silver, N., E. Cotroneo, et al. (2008). "Selection of housekeeping genes for gene expression studies in the adult rat submandibular gland under normal, inflamed, atrophic and regenerative states." BMC Molecular Biology 9: 64.
- Sinclair, A. H., P. Berta, et al. (1990). "A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif." Nature 346(6281): 240-4.
- Sinnecker, G. and S. Kohler (1989). "Sex hormone-binding globulin response to the anabolic steroid stanozolol: evidence for its suitability as a biological androgen sensitivity test." The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 68(6): 1195-200.



- Sinnecker, G. H., O. Hiort, et al. (1997). "Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group." European Journal of Pediatrics 156(1): 7-14.
- Stillman, S. C., B. A. Evans, et al. (1991). "Androgen dependent stimulation of aromatase activity in genital skin fibroblasts from normals and patients with androgen insensitivity." Clinical Endocrinology 35(6): 533-8.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani, et al. (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(9): 5116-21.
- Ulrix, W., J. V. Swinnen, et al. (1998). "Identification of the phosphatidic acid phosphatase type 2a isozyme as an androgen-regulated gene in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP." The Journal of Biological Chemistry 273(8): 4660-5.
- VanGuilder, H. D., K. E. Vrana, et al. (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis." BioTechniques 44(5): 619-26.

## 7 Anhang

**Tabelle 3: Korrelation zwischen Microarray und qRT-PCR für PGM5P1**

Die Microarraydaten wurden auf Grundlage eines signifikanten Spots für PGM5P1 und der Expressionsmittelwerte von zwei Spots für SDHA berechnet. Zur besseren Übersicht wurde die grafische Darstellung (Abb. 4) vertikal verschoben.

	qRT-PCR Expression PGM5P1/SDHA	qRT-PCR Expression PGM5P1/SDHA [log2]	Microarray Expression PGM5P1/SDHA	Microarray Expression PGM5P1/SDHA [log2]
S 4, DHT	1,89	0,92	5,15	2,37
S 4, EtOH	1,81	0,86	1,75	0,81
S 4, AZA, DHT	1,89	0,92	6,63	2,73
S 4, AZA, EtOH	0,89	-0,17	2,42	1,28
S 15, DHT	5,95	2,57	5,70	2,51
S 15, EtOH	5,84	2,55	3,04	1,61
S 15, AZA, DHT	3,17	1,66	5,19	2,38
S 15, AZA, EtOH	3,91	1,97	2,76	1,47
ARD 411, DHT	0,03	-5,06	2,92	1,55
ARD 411, EtOH	0,03	-5,06	2,97	1,57
ARD 411, AZA, DHT	0		4,48	2,17
ARD 411, AZA, EtOH	0,04	-4,64	4,14	2,05
ARD 1097, DHT	0,61	-0,71	0,88	-0,18
ARD 1097, EtOH	1,21	0,28	1,39	0,48
ARD 1097, AZA, DHT	0,72	-0,47	0,98	-0,04
ARD 1097, AZA, EtOH	0,66	-0,60	1,25	0,33

Tabelle 4: Expressionen und Induktionen von PGM5P1 in der qRT-PCR

	qRT-PCR Expression PGM5P1/SDHA	qRT-PCR Induktion PGM5P1 [-fach]
S 3, DHT	3,24	2,03
S 3, EtOH	1,60	
S 4, DHT	1,89	1,04
S 4, EtOH	1,81	
S 4, AZA, DHT	1,89	2,12
S 4, AZA, EtOH	0,89	
S 5, DHT	0,66	1,57
S 5, EtOH	0,42	
S 5, AZA, DHT	0,96	1,01
S 5, AZA, EtOH	0,95	
S 9, DHT	0,60	1,28
S 9, EtOH	0,47	
S 12, DHT	0,36	1,71
S 12, EtOH	0,21	
S 13, DHT	0,53	0,76
S 13, EtOH	0,70	
S 15, DHT	5,95	1,02
S 15, EtOH	5,84	
S 15, DHT	3,17	0,81
S 15, EtOH	3,91	
ARD 001, DHT	0,76	0,92
ARD 001, EtOH	0,83	
ARD 084, DHT	1,58	0,98
ARD 084, EtOH	1,61	
ARD 659, DHT	5,19	0,79
ARD 659, EtOH	6,57	
ARD 402, DHT	1,14	1,36
ARD 402, EtOH	0,84	
ARD 411, DHT	0,03	1,00
ARD 411, EtOH	0,03	
ARD 411, AZA, DHT	0,00	0,00
ARD 411, AZA, EtOH	0,04	
ARD 682, DHT	0,49	1,40
ARD 682, EtOH	0,35	
ARD 1097, DHT	0,61	0,50
ARD 1097, EtOH	1,21	
ARD 1097, AZA, DHT	0,72	1,09
ARD 1097, AZA, EtOH	0,66	
ARD 1144, DHT	0,45	0,98
ARD 1144, EtOH	0,46	

**Tabelle 5: Korrelation zwischen Microarray und qRT-PCR für PPAP2B**

Die Microarraydaten wurden auf Grundlage der Expressionsmittelwerte von zwei signifikanten Spots für PPAP2B und von zwei Spots für SDHA berechnet. Zur besseren Übersicht wurde die grafische Darstellung (Abb. 7) vertikal verschoben.

	qRT-PCR Expression PPAP2B/SDHA	qRT-PCR Expression PPAP2B/SDHA [log2]	Microarray Expression PPAP2B/SDHA	Microarray Expression PPAP2B/SDHA [log2]
<b>S 4, DHT</b>	2,00	1,00	9,09	3,19
<b>S 4, EtOH</b>	1,66	0,73	7,36	2,88
<b>S 4, AZA, DHT</b>	1,52	0,60	18,90	4,24
<b>S 4, AZA, EtOH</b>	1,22	0,29	11,04	3,47
<b>S 15, DHT</b>	1,33	0,41	18,13	4,18
<b>S 15, EtOH</b>	0,73	-0,45	11,35	3,51
<b>S 15, AZA, DHT</b>	1,51	0,59	16,56	4,05
<b>S 15, AZA, EtOH</b>	0,48	-1,06	8,66	3,12
<b>ARD 411, DHT</b>	1,21	0,28	16,11	4,01
<b>ARD 411, EtOH</b>	1,33	0,41	26,45	4,73
<b>ARD 411, AZA, DHT</b>	0,78	-0,36	15,89	3,99
<b>ARD 411, AZA, EtOH</b>	1,37	0,45	15,35	3,94
<b>ARD 1097, DHT</b>	0,27	-1,89	2,32	1,22
<b>ARD 1097, EtOH</b>	0,42	-1,25	4,99	2,32
<b>ARD 1097, AZA, DHT</b>	0,22	-2,18	2,58	1,37
<b>ARD 1097, AZA, EtOH</b>	0,28	-1,84	4,52	2,18

Tabelle 6: Expressionen und Induktionen von PPAP2B in der qRT-PCR

	qRT-PCR Expression PPAP2B/SDHA	qRT-PCR Induktion PPAP2B [-fach]
S 3, DHT	1,53	2,39
S 3, EtOH	0,64	
S 4, DHT	2,00	1,20
S 4, EtOH	1,66	
S 4, AZA, DHT	1,52	1,25
S 4, AZA, EtOH	1,22	
S 5, DHT	0,44	1,47
S 5, EtOH	0,30	
S 5, AZA, DHT	0,44	1,38
S 5, AZA, EtOH	0,32	
S 9, DHT	1,52	1,88
S 9, EtOH	0,81	
S 12, DHT	1,28	1,36
S 12, EtOH	0,94	
S 13, DHT	0,74	1,00
S 13, EtOH	0,74	
S 15, DHT	1,33	1,82
S 15, EtOH	0,73	
S 15, AZA, DHT	1,51	3,15
S 15, AZA, EtOH	0,48	
ARD 446, DHT	0,62	1,48
ARD 446, EtOH	0,42	
ARD 001, DHT	1,12	0,90
ARD 001, EtOH	1,24	
ARD 084, DHT	1,39	1,09
ARD 084, EtOH	1,28	
ARD 534, DHT	1,13	1,08
ARD 534, EtOH	1,05	
ARD 377, DHT	0,17	1,42
ARD 377, EtOH	0,12	
ARD 659, DHT	0,22	0,85
ARD 659, EtOH	0,26	
ARD 402, DHT	1,38	1,07
ARD 402, EtOH	1,29	
ARD 411, DHT	1,21	0,91
ARD 411, EtOH	1,33	
ARD 411, AZA, DHT	0,78	0,57
ARD 411, AZA, EtOH	1,37	
ARD 465, DHT	0,50	1,04
ARD 465, EtOH	0,48	
ARD 682, DHT	1,53	1,61
ARD 682, EtOH	0,95	
ARD 1097, DHT	0,27	0,64
ARD 1097, EtOH	0,42	
ARD 1097, AZA, DHT	0,22	0,79
ARD 1097, AZA, EtOH	0,28	
ARD 1144, DHT	0,79	1,16
ARD 1144, EtOH	0,68	

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



**ETHIK-KOMMISSION**

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Schwanenweg 20  
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09  
Telefax 04 31 / 597-18 31

Herrn  
Prof. Dr. P.-M. Holterhus  
Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
Schwanenweg 20  
24105 Kiel

Datum:  
16.2.2010

**AZ:** D 410/08 (bitte stets angeben)  
**Investigation of the molecular pathogenesis and patho-physiology of Disorders of Sex Development (DSD) – EuroDSD**  
EuroDSD-Studienprotokoll mit Aufklärungsbogen für Patienten, Erziehungsberechtigte, Betreuer und Spender in nationalen und internationalen Forschergruppen, Einverständniserklärung

**Antragsteller:** Prof. Dr. P.-M. Holterhus, UKSH, Campus Kiel, Klinik für Allgemeine Pädiatrie

**Datum des Erstantrages:** 28.02.2008

**Ihr Schreiben vom:** 27.1.2010 (Eingang 16.2.2010)

Lieber Herr Holterhus,

vielen Dank für Ihr obengenanntes Schreiben mit der aktuellen Elterninformation und Einverständniserklärung.

Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die weitere Durchführung der Studie und gegen die aktuelle Elterninformation über die Untersuchung aus skrotalem Gewebe und die dazugehörige Einverständniserklärung keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken. Wir wünschen Ihnen für die weitere Bearbeitung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

  
Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

  
Dr. med. Christine Glinicke  
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

## 8 Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus danken, der mir diese Arbeit ermöglicht und mit seiner Betreuung maßgeblich zum Gelingen beigetragen hat.

Ein großer Dank gilt auch Dr. rer. nat. Mahesh Appari für die intensive Betreuung und geduldige Einarbeitung im Labor, sowie für zahlreiche Erklärungen und Diskussionen.

Ebenfalls danke ich allen Mitarbeitern des kinderendokrinologischen Labors, insbesondere Kerstin Runde, Tanja Dahm und Giesela Hohmann für ihre Unterstützung und Hilfe. Gleiches gilt für Christian Bretscher und Thies Bartram, die im Labor stets offen für meine Fragen waren und Dr. med. Gunnar Cario für die Hilfestellung bei der Auswertung der qRT-PCR-Daten.

Vielen Dank auch an Dr. rer. nat. Ralf Werner aus Lübeck für zusätzliche Ideen und Hinweise.

Einen besonderen Dank möchte ich meiner Familie und meinen Freunden aussprechen, sowie allen voran meiner Frau Miriam!

## 9 Lebenslauf

**Name** Jan Oelbe  
**Geburtsdatum / -ort** 3.3.1987 / Hildesheim

### **Bisheriger Bildungsweg**

April 2013 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Kiel)  
 2011-2012 PJ 1. Tertial: Städtisches Krankenhaus Kiel (Innere)  
 PJ 2. Tertial: Universitäts-Augenklinik Kiel  
 PJ 3. Tertial: Krankenhaus Vendsyssel in Dänemark (Chirurgie)  
 August 2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Kiel)  
 Oktober 2006 Beginn des Medizinstudiums in Kiel  
 Juni 2006 Abitur am Matthias-Claudius-Gymnasium (Gehrden)  
 1999-2006 Matthias-Claudius-Gymnasium (Gehrden)  
 1997-1999 Orientierungsstufe der Burgbergschule Gehrden  
 1995-1997 Grundschule am Castrum (Gehrden)  
 1993-1995 Elisabeth-Schule (katholische Grundschule, Hildesheim)

### **Praktika / Bisherige Tätigkeit**

2008-2011 Arbeit als Extrawache über die DRK-Heinrich-Schwesternschaft  
 März 2011 Famulatur Gemeinschaftspraxis (Gastroenterologie)  
 Februar 2011 Famulatur Gemeinschaftspraxis Augenärzte Wilhelminenhaus (Kiel)  
 September 2010 Famulatur Kinderklinik – Städtisches Krankenhaus Kiel  
 September 2010 Famulatur Klinik für diagnostische Radiologie – Campus Kiel  
 August 2010 Famulatur Gemeinschaftspraxis (Pneumologie)  
 März 2010 Famulatur Universitäts-Augenklinik Kiel  
 März 2009 Famulatur Robert-Koch-Krankenhaus Gehrden (Kardiologie)  
 September 2007 Pflegepraktikum Universitäts-Kinderklinik Kiel (Allg. Pädiatrie)  
 März 2007 Pflegepraktikum Robert-Koch-Krankenhaus Gehrden (Chirurgie)  
 September 2006 Pflegepraktikum Robert-Koch-Krankenhaus Gehrden (Innere)  
 Oktober 2005 Praktikum Robert-Koch-Krankenhaus Gehrden  
 Oktober 2002 Schulpraktikum Heise Verlag (Redaktion Computerzeitschrift c't)