

Aus dem Institut für Humangenetik
(komm. Direktorin: PD Dr. med. Almuth Caliebe)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**VALIDIERUNG VON DURCH NEXT GENERATION SEQUENCING
ERMITTELTEN MUTATIONEN IM ANDROGENREZEPTOR-GEN UND IN
POTENZIELLEN CO-FAKTOREN DES ANDROGENREZEPTORS SOWIE
EXEMPLARISCHE FUNKTIONELLE BETRACHTUNGEN**

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

vorgelegt von

LISA WORCH

aus Wippra

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ole Ammerpohl,
Universitätsklinikum Ulm, Institut für Humangenetik

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Arnold,
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.07.2019

gez. Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

	Abkürzungsverzeichnis	V
1	Einleitung	1
1.1	Geschlechtsentwicklung	1
1.1.1	Geschlechtsdeterminierung	1
1.1.2	Geschlechtsdifferenzierung	2
1.2	Störungen der Geschlechtsentwicklung – <i>Disorders of Sex Development</i>	3
1.3	Androgeninsensitivitätssyndrom	3
1.3.1	Komplette Androgeninsensitivität	4
1.3.2	Partielle Androgeninsensitivität	5
1.3.3	Milde Androgeninsensitivität	5
1.3.4	Diagnostisches Management	6
1.3.5	ApoD-Assay und AIS Typ II	6
1.3.6	Therapeutisches Management	6
1.4	Androgenrezeptor	8
1.4.1	Genetischer Hintergrund und Aufbau des Proteins	9
1.4.2	Signalweg des Androgenrezeptors	10
1.5	Molekulargenetische Sequenziermethoden	11
1.5.1	Sanger-Sequenzierung	11
1.5.2	Next generation sequencing	11
1.6	Fragestellung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Materialien	13
2.1.1	Zellkulturen	13
2.1.2	Primer	15
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.4	Kits	17

2.1.5	Verbrauchsartikel	17
2.1.6	Geräte	18
2.2	Methoden	18
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	18
2.2.2	Sanger-Sequenzierung	20
2.2.3	Aufreinigung der Sequenzierreaktion	20
2.2.4	Zellkultur	21
2.2.5	Herstellung eines steroidfreien FBS	22
2.2.6	Immunfluoreszenz	22
2.2.7	Wachstumsanalyse	27
2.2.8	Proteinextraktion	27
2.2.9	Western Blot	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Untersuchung optimaler PCR-Bedingungen der Primer	31
3.1.1	Primer zur Detektion von Mutationen innerhalb des AR-Gens	31
3.1.2	Primer zur Detektion von Mutationen außerhalb des AR-Gens	32
3.2	Validierung der durch NGS gefundenen Mutationen	33
3.2.1	Auswertung der PCR mit einer Agarose-Gelelektrophorese	34
3.2.2	Auswertung der Sanger-Sequenzierung	35
3.3	Patient 19	37
3.4	Immunfluoreszenz	37
3.4.1	Auswertung und Beurteilung des Fluoreszenzsignals	38
3.4.2	Optimierung einzelner Parameter bei der Experimentdurchführung	39
3.4.3	Experiment mit angepassten Bedingungen	41
3.4.4	Spezifizierung der Bewertung des Fluoreszenzsignals	42
3.4.5	Auswertung der Experimente mit einer abgestuften Signal-Einteilung	44
3.4.6	Kultivierung der Zellen mit 0,1% FBS, DCC-haltigem Medium für 72 h	45

3.5	Western Blot	48
	3.5.1 Analyse von Proteinen aus mit EtOH bzw. DHT-behandelten Zellkulturen	48
	3.5.2 Analyse von Proteinen aus mit 0,1% FBS, DCC-kultivierten Zellkulturen	50
3.6	Wachstumsanalyse	51
4	Diskussion	53
4.1	Detektion der Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung	53
4.2	Diskussionspunkte zu Pat.19	54
4.3	Untersuchung der Lokalisation des AR in Genitalhautfibroblasten mittels Immunfluoreszenz	55
4.4	Untersuchung des AR-Proteins unter EtOH- bzw. DHT-Inkubation mittels Western Blot	57
4.5	Untersuchung von Proteinen unter 0,1% FBS, DCC-Inkubation mittels Western Blot	57
4.6	Untersuchung des Zellwachstums	58
4.7	Fazit und Ausblick zu Pat.19	59
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	62
7	Anhang	67
7.1	Verwendete Primer zur Detektion von Mutationen	67
7.2	Reaktionsbedingungen für verschiedene Polymerasen	68
7.3	Zusammensetzung von Puffern und Lösungen	69
7.4	Agarose-Gelelektrophoresen der PCR-Produkte bezüglich Mutationen im AR-Gen	71
7.5	Agarose-Gelelektrophoresen der PCR-Produkte bezüglich Mutationen außerhalb des AR-Gens	72
7.6	PCR-Bedingungen für die Primer	72
7.7	Eigenschaften der Mutationen	73
7.8	Beispiel für eine gelungene Verifizierung anhand der Mutation von Pat.7	74

Inhaltsverzeichnis

7.9	Elektropherogramme zu den Mutationen innerhalb des AR-Gens	75
7.10	Elektropherogramme zu den außerhalb des AR liegenden Mutationen	78
7.11	Ethikvotum	79
8	Veröffentlichung	80
9	Danksagung	81
10	Eidesstattliche Erklärung	82

Abkürzungsverzeichnis

AGS	Adrenogenitales Syndrom
AF-1	<i>activation function 1</i>
AIS	<i>androgen insensitivity syndrome</i> ; Androgenresistenz
AMH	Anti-Müller-Hormon
ApoD	Apolipoprotein D
AR	Androgenrezeptor
AR-Gen	Androgenrezeptor-Gen
β-hCG	humanes Chorion-Gonadotropin
CAIS	<i>complete androgen insensitivity syndrome</i> ; komplette Androgenresistenz
CHD	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein</i>
ChrX	Chromosom X
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Dideoxynukleotidtriphosphat
DSD	<i>disorders of sex development</i> ; Geschlechtsentwicklungsstörungen
E	Exon
EtOH	Ethanol
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fetales Kälberserum
hCG	humanes Choriongonadotropin
GenK	genomische DNA
H	<i>hinge region</i> ; Linker-Region
HSP	<i>heat shock proteins</i> ; Hitze-Schock-Proteine
Ink.	Inkubation
k. A.	keine Angabe
Kon.	Kontrolle
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LH	luteinisierendes Hormon
MAIS	<i>mild androgen insensitivity syndrome</i> ; milde Androgenresistenz
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>

Abkürzungsverzeichnis

NTD	N-terminale Domäne
n. b.	nicht berechenbar
Pat.	Patient
PAIS	<i>partial androgen insensitivity syndrome</i> ; partielle Androgenresistenz
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
p. c.	post conceptionem
Ö	Östradiol
S	Segment
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SRY	<i>sex determining region of the Y chromosome</i> ; Geschlechtsdeterminierender Faktor
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Testosteron
17 β -HSD3	17-beta- Hydroxysteroid-Dehydrogenase-3

1 Einleitung

1.1 Geschlechtsentwicklung

Die Geschlechtsentwicklung des Menschen teilt sich in verschiedene Etappen. Sie beginnt bei der Befruchtung, wo zunächst durch die Verschmelzung von Ei- und Samenzelle der Karyotyp des Embryos festgelegt wird. Die sich im Anschluss entwickelnde Gonadenanlage ist zunächst indifferent und reift in der Phase der geschlechtlichen Determinierung zu männlichen Hoden oder weiblichen Ovarien heran (Lucas-Herald und Bashamboo 2014; Morel et al. 2014). Die vorhandenen Gonaden steuern dann über Hormone die Differenzierung von innerem und äußerem Genitale (Lucas-Herald und Bashamboo 2014; Morel et al. 2014). Auch nach der Geburt schreitet diese Entwicklung bis zum Erreichen der Geschlechtsreife in der Pubertät voran. Kommt es im Verlauf der embryonalen Prozesse zu einer Störung, kann dies in einer Abweichung der physiologischen Geschlechtsentwicklung bei Geburt münden. In diesem Fall spricht man von einer Störung der Geschlechtsentwicklung bzw. *disorder of sex development* (DSD).

1.1.1 Geschlechtsdeterminierung

Der aus der Befruchtung resultierende Karyotyp des Embryos kann entweder mit 46,XY männlich oder 46,XX weiblich sein. Durch die Migration von Keimzellen in der 4./5. SSW p. c. vollzieht sich die Anlage der Gonaden, die sich zunächst im weiblichen und männlichen Embryo nicht unterscheiden (Morel et al. 2014). Zwei wichtige Gene, welche an der Entwicklung der Gonadenanlage beteiligt sind, sind NR5A1 (entspricht SF1) und WT1 (Morel et al. 2014). Weitere Gene sind in dem Schaubild in Abb. 1 dargestellt. Vorausgesetzt der Karyotyp ist männlich, entwickeln sich diese bipotenten Gonaden anschließend durch die Expression des Gens des Hoden-determinierenden Faktors (*sex determining region of the Y chromosome*, SRY) und dessen nachgeschalteter Gene (z.B. SOX9) zu Hoden (Morel et al. 2014). Der SRY liegt auf dem Y Chromosom und ist demnach bei einem weiblichen Embryo mit 46,XX nicht vorhanden. Im Falle eines weiblichen Genotyps beginnt die Ovarentwicklung etwa in der 7. SSW (Morel et al. 2014). Einerseits ist dabei das Fehlen von SRY und SOX9 entscheidend, andererseits scheinen auch spezifische Gene für die weibliche Entwicklung von wichtiger Bedeutung (Morel et al. 2014). Hierbei sind Signalwege über RSPO1/WNT4/ β -Catenin sowie FOXL2 beteiligt, wobei Informationen über deren exakte Bedeutung fehlen (Lucas-Herald und Bashamboo 2014). Eine vereinfachte Darstellung der beteiligten Gene an der Gonadenentwicklung findet sich in der Abb. 1.

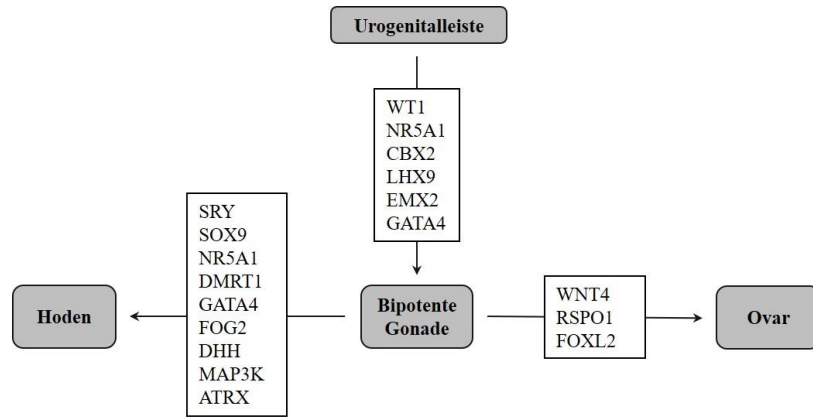


Abb. 1 Beteiligung von Genen an der Gonadenentwicklung (erstellt nach Lucas-Herald und Bashamboo 2014). Hervorgehend aus der Urogenitalleiste entsteht unter Beteiligung verschiedener Gene (WT1, NR5A1, etc.) die bipotente Gonadenanlage. Diese entwickelt sich durch Genexpression des SRY und weiterer Gene zu männlichen Hoden. Fehlen diese Gene, entwickeln sich Ovarien durch Mitwirkung anderer Signalwege (u. a. ROSP1, WNT4, FOXL2).

1.1.2 Geschlechtsdifferenzierung

Durch die Bildung von Testosteron in den Leydig-Zellen des Hodens entwickeln sich Prostata, Epididymis und Vas deferens aus den Wolff-Gängen (Biason-Lauber 2010). Des Weiteren führt die Umwandlung von Testosteron zu Dihydrotestosteron (DHT) durch die 5 α -Reduktase Typ II in der 7. bis 12. SSW p.c. zur irreversiblen Vermännlichung des Genitales, wobei sich u. a. der Penis aus dem Genitalhöcker und das Skrotum sowie das Corpus cavernosum aus den verschmolzenen Urethralfalten und Labioskrotalwülsten entwickeln (Holterhus 2013) (s. Abb. 2).

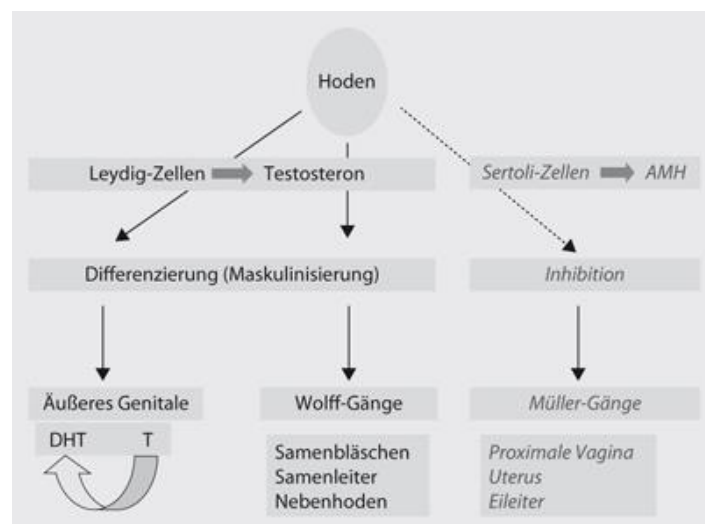


Abb. 2 Sexuelle Differenzierung beim Jungen (Holterhus 2013). Durch die Produktion von Testosteron in den Leydig-Zellen des Hodens kommt es zur Entstehung der Wolff-Strukturen. Die Umwandlung von Testosteron (T) zu Dihydrotestosteron (DHT) führt zu der Maskulinisierung des Genitales. Parallel dazu bilden die Sertoli-Zellen des Hodens das Anti-Müller-Hormon (AMH), welches die Entwicklung der Müller-Gänge inhibiert.

Die Sertoli-Zellen des Hodens bilden das sogenannte Anti-Müller-Hormon (AMH), welches zur Degeneration der Müller-Gänge, die embryonale Anlage des inneren weiblichen Genitales, führt (Biason-Lauber 2010; Lucas-Herald und Bashamboo 2014). Diese Abläufe der männlichen Geschlechtsdifferenzierung sind in Abb. 2 veranschaulicht. Durch das Fehlen von Hoden bleibt die Weiterentwicklung des Wolff-Ganges aus und die Müller-Anlagen entwickeln sich zum Uterus, den Tubae uterinae und dem proximalen Anteil der Vagina (Biason-Lauber 2010)

1.2 Störungen der Geschlechtsentwicklung – *Disorders of Sex Development*

Geschlechtsentwicklungsstörungen bilden einen Sammelbegriff für Erkrankungen, die eine Abweichung von der physiologischen Entwicklung eines männlichen oder weiblichen Geschlechts umfassen, sodass das chromosomale, gonadale oder anatomische Geschlecht nicht übereinstimmen (Hughes et al. 2006). Die Chicagoer Consensus Konferenz aus dem Jahr 2005 brachte eine einheitliche Klassifikation für diese Erkrankungen hervor, nach welcher man 3 Gruppen unterscheidet: 46,XX-DSD, 46,XY-DSD und Geschlechtschromosom-betreffende DSD (Hughes et al. 2006). Nach einer Studie von Thyen et al. liegt die Inzidenz in Deutschland für Kinder mit uneindeutigem Geschlecht bei 2:10.000 Geburten (Thyen et al. 2006). Darunter bilden das Adrenogenitale Syndrom (AGS), das Androgeninsensitivitätssyndrom (*androgen insensitivity syndrome*, AIS) und die gemischten Gonadaldysgenesien die häufigsten Diagnosen (Thyen et al. 2006).

1.3 Androgeninsensitivitätssyndrom

Als eine Form von DSD betrifft AIS ausschließlich Individuen mit einem XY-Karyotyp. Klassischerweise führen beim AIS Mutationen im Androgenrezeptor-Gen (AR-Gen) zu einem vollständigen oder teilweisen Funktionsverlust des Androgenrezeptors (AR), sodass trotz einer vorhandenen Androgenbiosynthese die Effekte in den Zielgeweben ausbleiben (Quigley et al. 1995). Bereits 1953 prägte J. Morris die Bezeichnung „*testicular feminization syndrom*“ und definierte dazugehörige klinische Auffälligkeiten (Hughes et al. 2012; Quigley et al. 1995). Mittlerweile wurden 3 Subgruppen von AIS definiert: *complete androgen insensitivity syndrome* (CAIS), *partial androgen insensitivity* sowie *mild syndrome androgen insensitivity syndrome* (MAIS) (Hughes et al. 2012).

1.3.1 Komplette Androgeninsensitivität

Patienten mit CAIS werden mit einem weiblichen Phänotyp geboren (Hughes et al. 2012). Wie sich der CAIS-Phänotyp aus der bipotenten Gonadenanlage herausbildet, ist hierzu in Abb. 3 genauer veranschaulicht. Im Kleinkindalter können die Patientinnen durch das Auftreten von Inguinalhernien, welche bei Mädchen eher selten sind, auffallen (Hughes et al. 2012). Im Rahmen der Operation werden inguinal gelegene Hoden gefunden, was auf ein vorliegendes CAIS hinweisen kann (Hughes et al. 2012; Mongan et al. 2015). In der Pubertät sind die für das weibliche Geschlecht typische Brustentwicklung und der altersspezifische Wachstumsschub vorhanden, da eine Aromatisierung von Testosteron zu Östradiol stattfindet (Hughes et al. 2012; Mongan et al. 2015). Die Patientinnen werden dann durch eine primäre Amenorrhö auffällig, auch sind die Achsel- und Schambehaarung vermindert oder fehlen ganz (Hughes et al. 2012; Quigley et al. 1995). In der weiteren Diagnostik werden zudem das Fehlen von Müllerstrukturen sowie eine blind endende Vagina registriert (Hughes et al. 2012). Die Werte für Testosteron im Serum sind normal bis erhöht (Hughes et al. 2012). Im Vergleich zu Männern sind die Serum-Östradiol-Werte erhöht bzw. im Vergleich zu Frauen erniedrigt (Quigley et al. 1995).

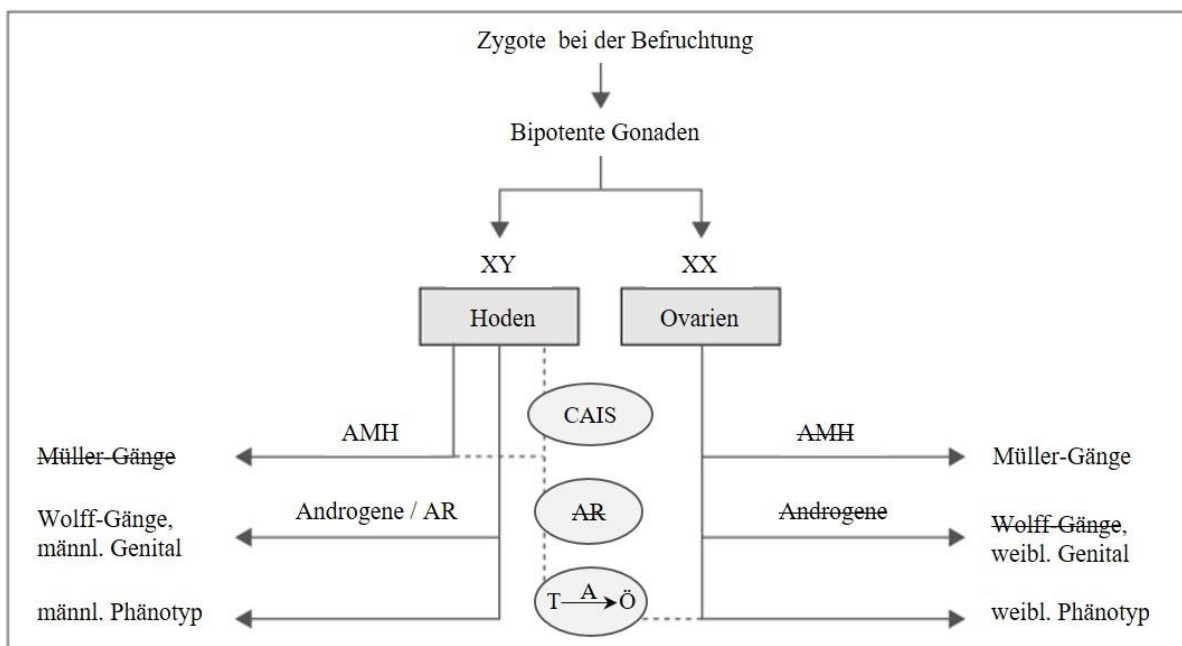


Abb. 3 Vereinfachte Darstellung der fetalen Geschlechtsentwicklung (modifiziert nach Hughes et al. 2012). Im Rahmen eines CAIS führt der Funktionsverlust des AR trotz männlichem Genotyp (46,XY) zu einem weiblichen Phänotyp. Durch eine ungestörte AMH-Sekretion degenerieren die Müller-Gänge. Die Aromatisierung von T zu Ö ermöglicht die Entwicklung eines phänotypisch weiblichen Habitus. A = Aromatase, AMH = Anti-Müller-Hormon, AR = Androgenrezeptor, CAIS = komplette Androgenresistenz, Ö = Östradiol, T = Testosteron.

Des Weiteren ist das Luteinisierende Hormon (LH) charakteristisch erhöht (Hughes et al. 2012). Zum Ausschluss von Differentialdiagnosen kann ein hCG-Stimulationstest erfolgen, bei welchem die testikulären Leydig-Zellen durch humanes Choriongonadotropin (β -hCG) stimuliert werden (Hughes et al. 2012). Differentialdiagnosen für ein CAIS stellen beispielsweise das Mayer-Rokitanski-Küster-Hauser-Syndrom, die komplette Gonadendysgenese oder Störungen der Androgenbiosynthese dar (Hughes et al. 2012).

1.3.2 Partielle Androgeninsensitivität

Bei einem PAIS führt die Mutation im AR-Gen zu einem teilweisen Funktionsverlust des AR, was in einem variablen Phänotyp zwischen PAIS-Patienten mündet (Hughes et al. 2012). Micropenis, Hypospadie und Scrotum bifidum bilden typische klinische Merkmale (Hughes et al. 2012; Mongan et al. 2015). Zur Einteilung des PAIS-Phänotyps steht die Sinnecker-Klassifikation zur Verfügung (s. Abb. 4), welche die Abstufungen des äußeren Genitales beim 46,XY-DSD Patienten in 5 Typen gliedert (Sinnecker et al. 1996). Für die Diagnosestellung ist die Sequenzierung des AR-Gens nötig (Hughes et al. 2012).

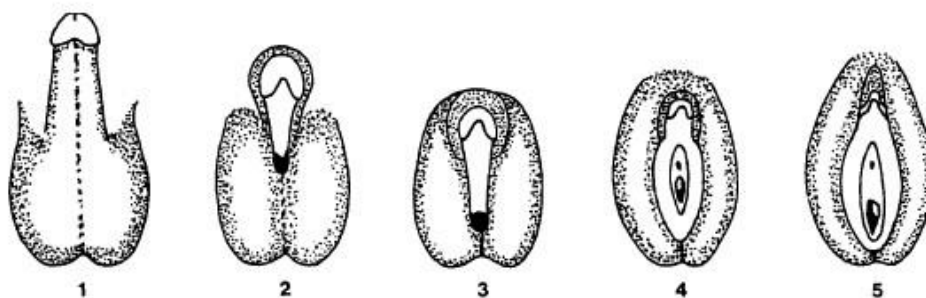


Abb. 4 **Einteilung des äußeren Genitales bei 46,XY DSD** (Sinnecker et al. 1996).

Typ 1: männlich, Störung der Spermatogenese und/oder der pubertären Virilisierung

Typ 2: vorwiegend männlich, mit Micropenis, Hypospadie oder Skrotum bifidum

Typ 3: ambivalent, Micropallus mit Klitoris-ähnlicher Glans penis, Labia-majora ähnelndes Skrotum, Hypospadie

Typ 4: vorwiegend weiblich, Klitoromegalie und labiale Fusion, Sinus urogenitalis mit blind endender, verkürzter Vagina

Typ 5: weiblich, keine Zeichen der Virilisierung (präpubertär)

1.3.3 Milde Androgeninsensitivität

Milde Formen eines AIS sind ebenfalls mit Mutationen im AR-Gen assoziiert (Hughes et al. 2012). Klinisch fallen Betroffene durch Gynäkomastie oder Infertilität bei einem sonst unauffälligem männlichen Phänotyp auf (Brinkmann 2001; Hughes et al. 2012; Mongan et al. 2015).

1.3.4 Diagnostisches Management

Im Rahmen der Diagnostik werden zunächst die Eigen- und Familienanamnese sowie klinische Merkmale erhoben, wobei mittels Sonografie der Status des inneren Genitales evaluiert wird (Hiort et al. 2014). Bei einem bestehenden Verdacht auf das Vorliegen einer Form von DSD sollte nach Bestimmung des Karyotyps ebenfalls der Hormonstatus erhoben werden (Hiort et al. 2014). Diese endokrinologischen Untersuchungen beinhalten die Bestimmung von LH, FSH, Testosteron, DHT sowie ein β -hCG-Stimulationstest (Hiort et al. 2014). Diese Untersuchungen ermöglichen das Stellen einer Arbeitsdiagnose innerhalb von 48 h (Hughes et al. 2006). Anschließend erfolgt die gezielte Gen-Sequenzierung bzw. die parallele Untersuchung mehrerer Gene, was durch Sequenziermethoden wie *next generation sequencing* (NGS) ermöglicht wird (Hiort et al. 2014). Die Sequenzierung des AR-Gens ermöglicht die Analyse von Mutationen im AR-Gen. Beim Vorliegen einer funktionsverändernden Mutation kann die Verdachtsdiagnose AIS bestätigt werden. Unbekannte Mutationen können durch Bindungs- und Transaktivierungsassays untersucht werden (Mongan et al. 2015). Eine weitere Methode zur Diagnostik eines AR-Defekts stellt der ApoD-Assay dar.

1.3.5 ApoD-Assay und AIS Typ II

Die Expression des Apolipoprotein D (ApoD) wird durch den Androgen-aktivierte AR im genitalen Zielgewebe heraufreguliert, sodass das ApoD als ein endogener Biomarker für den funktionsfähigen AR in Genitalhautfibroblasten fungiert (Appari et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass im Rahmen eines PAIS oder CAIS diese hormonabhängige Heraufregulation des ApoD in kultivierten Genitalhautfibroblasten von AIS-Patienten reduziert war oder gar fehlte (Hornig et al. 2016). Durch die Definition von diagnostischen Cut-off-Werten für die ApoD-Induktion im ApoD-Assay kann in vielen Fällen die Diagnose von AIS ausgeschlossen werden (Hornig et al. 2016). Des Weiteren wurde durch die Analysen mittels des ApoD-Assays eine weitere Form von AIS charakterisiert. Hierbei handelt sich um Patienten, die keine Mutation im kodierenden Bereich des AR-Gens zeigen, aber durch die Untersuchung mittels des ApoD-Assays als funktionell Androgen-resistent definiert werden (Hornig et al. 2016). Diese Form trägt die Bezeichnung AIS Typ II (Hornig et al. 2016).

1.3.6 Therapeutisches Management

Ein multidisziplinäres Team stellt für die Betreuung von AIS-Patienten und deren Familien einen essenziellen Baustein nicht nur im diagnostischen sondern auch im therapeutischen Management dar (Hiort et al. 2014; Hughes et al. 2012; Hughes et al. 2006). Dabei sollten

Chirurgen, Endokrinologen, Urologen, Humangenetiker sowie Psychologen, Sozialarbeiter und Mitarbeiter der Medizinethik in die Zusammenarbeit mit dem Patienten und dessen Familie miteinbezogen werden (Hughes et al. 2012). Idealerweise wird die Betreuung im multidisziplinären Setting lebenslang aufrechterhalten (Hiort et al. 2014). Im Gegensatz zu der früheren Meinung, Patienten im paternalistischen Sinn zu behandeln und die Diagnoseübermittlung sowie therapeutische Maßnahmen nicht in vollem Umfang zu kommunizieren, gilt heute ein offener Umgang bezüglich der Diagnose und dem Therapieverlauf in Form der informierten Einwilligung (*informed consent*) (Hughes et al. 2012; Richter-Appelt 2007). Dem Patienten und dessen Familie sollten verschiedene Aspekte und Möglichkeiten für die Gestaltung der Therapie dargelegt werden, um die Evaluation der individuellen Anforderungen und Bedürfnisse zu ermöglichen (Hiort et al. 2014). Die psychologische Betreuung sowie die Inanspruchnahme von Selbsthilfegruppen spielen für das Outcome der Patienten eine entscheidende Rolle (Hughes et al. 2012). Dabei ist die Aufklärung über die zugrundeliegende Pathophysiologie von AIS für die psychische Entwicklung der Patienten wichtig, um den adäquaten Umgang mit DSD-Diagnose zu ermöglichen sowie die Entwicklung eines gesunden Selbstbildes und auch die Entwicklung eines befriedigenden Sexuallebens zu fördern (Tadokoro-Cuccaro und Hughes 2014). Darüber hinaus sollte im Rahmen der psychologischen Betreuung auf die Entwicklung von Depressionen bei AIS-Patienten geachtet werden (Gomez-Lobo und Amies Oelschlager 2016).

In den meisten Fällen von CAIS ist das Erziehungsgeschlecht weiblich (Tadokoro-Cuccaro und Hughes 2014). Hier kann eine spontane Einleitung der Pubertät und die damit verbundene Brustentwicklung über körpereigene Hormone erreicht werden, wenn die Gonaden bis zur Pubertät nicht entfernt werden (Döhnert et al. 2017; Mongan et al. 2015; Tadokoro-Cuccaro und Hughes 2014). Das Testosteron wird dabei zu Östrogen aromatisiert, was die Entwicklung eines weiblichen Habitus zur Folge hat. Die körpereigene Hormonproduktion ermöglicht außerdem den physiologischen Zuwachs der Knochendichte (Cools und Looijenga 2017). Die zunächst belassenen Hoden sollten mittels Sonografie oder Magnetresonanztomografie bildgebend untersucht werden, um gegebenenfalls maligne Entartungen frühzeitig zu detektieren (Chaudhry et al. 2017; Cools und Looijenga 2017; Döhnert et al. 2017). Wurden die Gonaden aufgrund eines erhöhten Entartungsrisikos in der Kindheit entfernt, kann die Pubertät über die Gabe von Östrogenen im Rahmen einer Hormonersatztherapie in steigenden Dosen induziert werden (Mongan et al. 2015). Außerdem fördern Östrogene das Aufrechterhalten eines gesunden Knochenstoffwechsels und tragen darüber hinaus zur

Prävention einer vulvovaginalen Atrophie bei (Gomez-Lobo und Amies Oelschlager 2016). Für das Wohlbefinden der Patienten kann im Rahmen der Hormonersatztherapie, zusätzlich zu Östrogen, auch Testosteron substituiert werden (Birnbbaum et al. 2018; Mongan et al. 2015). Der Einsatz einer Hormonersatztherapie erfordert dabei eine genaue Aufklärung über mögliche irreversible Effekte in Bezug auf das Outcome und sollte stets kritisch erwogen werden (Hiort et al. 2014). Die oft verkürzte Vagina kann durch den Einsatz von Vaginaldilatoren gedehnt werden (Mongan et al. 2015; Tadokoro-Cuccaro und Hughes 2014). In manchen Fällen wird jedoch eine operative Rekonstruktion nötig. Hierbei ist das Ziel, ein für den Patienten zufriedenstellendes Ergebnis hinsichtlich Aussehen und Funktionalität des äußeren Genitales zu erreichen (Tadokoro-Cuccaro und Hughes 2014). Jegliche Anwendung chirurgischer Intervention erfordert eine genaue Information des Patienten über mögliche Risiken im Vergleich zum Benefit (Hiort et al. 2014).

Bei PAIS-Patienten ist die Wahl des Erziehungsgeschlechtes schwieriger, da auch weniger Studiendaten zum Outcome dieser Patienten vorhanden sind (Mongan et al. 2015). Im Falle des männlichen Geschlechts spielt die Kenntnis über das Fehlen bzw. Vorhandensein einer Mutation im AR-Gen eine wichtige Rolle. Beispielsweise sind häufig multiple operative Interventionen zur Behandlung einer Hypospadie nötig, wenn eine AR-Gen-Mutation vorliegt (Lucas-Herald et al. 2016). Außerdem scheinen PAIS-Männer mit einer Mutation im AR-Gen eine schlechtere Prognose bezogen auf den Grad der Virilisierung zu zeigen (Lucas-Herald et al. 2016). Des Weiteren erhalten diese Patienten eher eine Therapie mit Testosteron (Lucas-Herald et al. 2016). Der Einsatz von Androgenen soll u. a. die Virilisierung steigern, wobei die eingesetzten Dosen je nach Ausprägungsgrad der Androgenresistenz variieren können (Mongan et al. 2015). Darüber hinaus kann sich der Einsatz von Aromataseinhibitoren in der Behandlung der Gynäkomastie vorteilhaft auswirken (Mongan et al. 2015).

Für das therapeutische Management von MAIS-Patienten stehen wenige Informationen zur Verfügung. Bei einer vorhandenen Gynäkomastie wird gegebenenfalls eine plastische Reduktion des Brustgewebes erwogen (Hughes et al. 2012). Des Weiteren ist der Einsatz von Androgenen im Rahmen einer Oligospermie eine Therapiemöglichkeit (Hughes et al. 2012).

1.4 Androgenrezeptor

Damit die Wirkung der männlichen Geschlechtshormone Testosteron und DHT entsprechend zielgerichtet verlaufen kann, ist ein funktionsfähiger AR essenziell. Im Folgenden werden der

Aufbau des AR-Proteins sowie des AR-Gens beschrieben. Darauffolgend schließt sich eine Darlegung der Androgen-abhängigen Aktivierung des AR an.

1.4.1 Genetischer Hintergrund und Aufbau des Proteins

Über den AR vermitteln die Hormone Testosteron und dessen aktiverer Metabolit 5 α -Dihydrotestosteron ihre Wirkung. Zusammen mit anderen Steroidhormonrezeptoren gehört der AR zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren (Brinkmann 2001; Werner und Holterhus 2014). Das hemizygoten AR-Gen ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq11-12) lokalisiert und gliedert sich in 8 Exons (Brown et al. 1989; Chang et al. 1988; Lubahn et al. 1988). Der Aufbau des AR-Gens ist hierzu schematisch in Abb. 5 dargestellt. Das erste Exon kodiert für die N-terminale Transaktivierungsdomäne (Werner und Holterhus 2014). Exon 2 und 3 kodieren für zwei Zink-Finger der DNA-Bindungsdomäne (DBD) (Werner und Holterhus 2014). Die mit der DNA-Bindungsdomäne verbundene C-terminale Ligandenbindungsdomäne (LBD) wird von den Exons 4 bis 8 kodiert (Werner und Holterhus 2014).

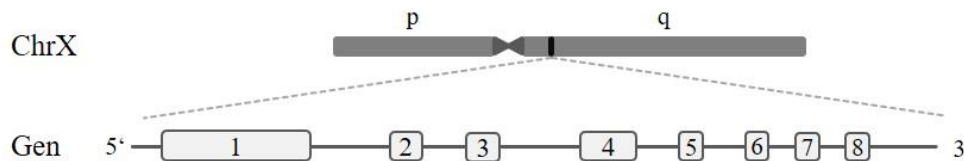


Abb. 5 **Schematische Darstellung des AR-Gens** (Erstellt nach Brinkmann 2001). Das AR-Gen ist auf dem langen Arm (q) des X-Chromosoms (ChrX, dunkelgrau) gelegen und teilt sich in 8 Exons (hellgraue Kästen 1-8). p = kurzer Arm des X-Chromosoms.

An der N-terminalen Domäne (NTD) des AR befindet sich die *activation function 1* (AF-1), welche einerseits für die Transaktivierungsfähigkeit des AR unentbehrlich ist und andererseits die Bindung von Co-Regulatoren an den AR ermöglicht (Brinkmann 2011; Werner und Holterhus 2014). Die beiden Zink-Finger der DBD erfüllen unterschiedliche Funktionen. So enthält der erste Zink-Finger die P-Box, welche mit dem Androgen-responsiven Element der DNA interagiert und die spezifische DNA-Erkennung ermöglicht (Brinkmann 2011; Werner und Holterhus 2014). Dagegen enthält der zweite Zink-Finger die D-Box, welche für die Dimerisierung des AR eine wichtige Rolle spielt (Werner und Holterhus 2014). Die DBD und LBD werden über die *hinge region* (H; Linker-Region) miteinander verbunden (Brinkmann 2011; Werner und Holterhus 2014). Diese Region beherbergt das *nuclear localization signal* (NLS), welches seinem Namen entsprechend den nukleären Import des AR ermöglicht und des Weiteren mit Co-Faktoren interagiert (Brinkmann 2011; Werner und Holterhus 2014). Zum Aufbau des AR-Proteins s. Abb. 6.

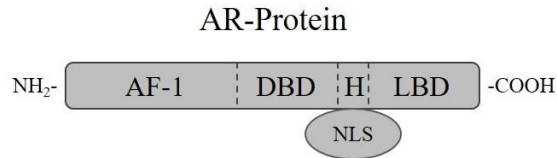


Abb. 6 **Schematischer Aufbau des AR-Proteins** (modifiziert nach Ni et al. 2013). N-terminal ist die AF-1 gelegen. Die sich anschließende DBD ist über die H mit der C-terminal gelegenen LBD verbunden. An dieser Region ist das NLS zu finden. AF-1 = Aktivierungsdomäne 1 (activation function 1), DBD = DNA-Bindungsdomäne, H = Linker-Region (hinge region), LBD = Liganden-Bindungsdomäne; NLS = nuclear localization signal.

1.4.2 Signalweg des Androgenrezeptors

In Abwesenheit von Testosteron bzw. DHT liegt der AR im Zytoplasma vor und wird u. a. von Hitze-Schock-Proteinen (HSP) und Chaperonen stabilisiert (Werner und Holterhus 2014). Beispielsweise hält HSP90 den AR in einer Konformation, in welcher eine Ligandenbindung ermöglicht wird (Gobinet et al. 2002; Ni et al. 2013; Werner und Holterhus 2014). Bindet anschließend DHT an den AR, werden die HSP frei und es ändert sich die Konformation des AR, wodurch das Dimerisationsmotiv sowie das NLS freigelegt werden, was die Translokation in den Nukleus ermöglicht (Brinkmann 2011; Werner und Holterhus 2014). Der nukleäre Import wird über Import-Faktoren, ein Heterodimer aus Importin α - und Importin β -Proteinen, vermittelt (Werner und Holterhus 2014).

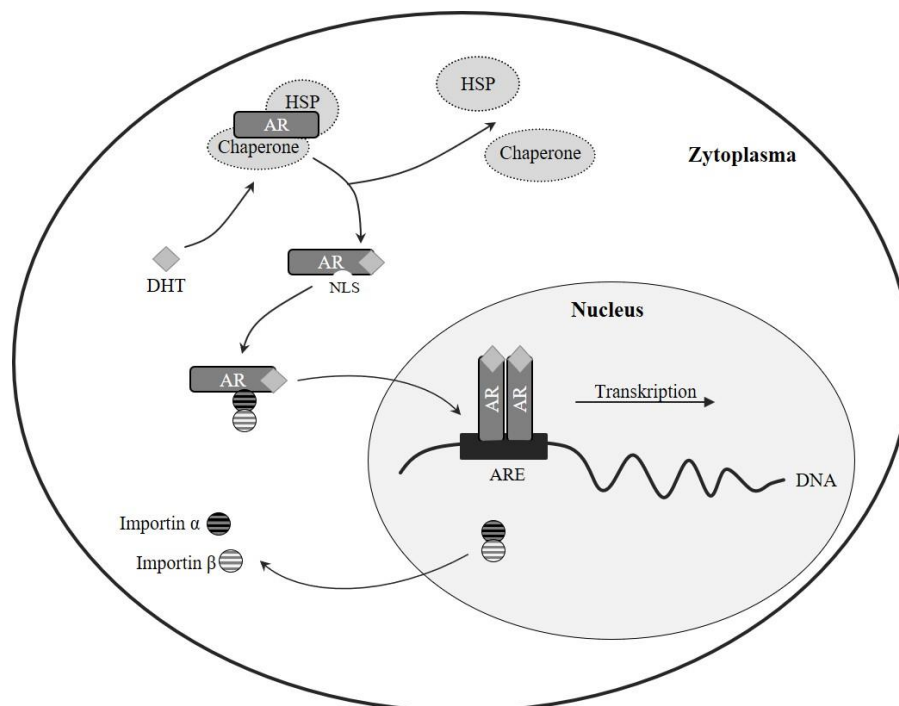


Abb. 7 **Vereinfachte Darstellung der Aktivierung des AR durch DHT** (modifiziert nach Gobinet et al 2002). Durch Bindung von DHT an den AR ändert sich dessen Konformation, sodass Importfaktoren über die Interaktion mit dem NLS eine Translokation des AR in den Nukleus ermöglichen. Intranukleär bindet der dimerisierte AR an des ARE und reguliert die Transkription. AR = Androgenrezeptor, ARE = Androgen-responsives Element, HSP = Hitze-Schock-Proteine, NLS = nuclear localization signal.

Dabei agieren Importin α -Importrezeptoren, welche sich aus 7 KPNA-Proteinen zusammensetzen, als ein Adapterprotein zwischen dem NLS des AR und Importin β (Cutress et al. 2008; Ni et al. 2013; Werner und Holterhus 2014). Im Zellkern werden Importin α und Importin β frei und wandern zurück in das Zytoplasma (Cutress et al. 2008; Werner und Holterhus 2014). Nach Homodimerisierung des ligandengebundenen AR, kann dieser anschließend unter dem Einfluss von Co-Regulatoren an das Androgen-responsive Element der DNA binden und die Transkription regulieren (Brinkmann 2011; Gobinet et al. 2002; Quigley et al. 1995; Werner und Holterhus 2014). In Abb. 7 ist dieser Ablauf schematisch abgebildet.

1.5 Molekulargenetische Sequenziermethoden

Um Mutationen im Genom zu analysieren, wurden im Laufe der Zeit verschiedene Methoden entwickelt und etabliert. Für einen Einblick in dieses Themengebiet sei im Folgenden auf eine seit vielen Jahren bewährte Methode sowie auf den Bereich der neueren Sequenzierverfahren eingegangen.

1.5.1 Sanger-Sequenzierung

Die klassische Methode zur DNA-Sequenzierung stellt seit vielen Jahren die Methode nach Sanger, die sogenannte Kettenabbruchmethode, dar. Diese Form der Sequenzierung, mittlerweile als *first generation* der DNA-Sequenzierung bezeichnet, dient durch ihre klar definierte Chemie und Präzision als Goldstandard in der klinischen Zytogenetik (Rizzo und Buck 2012). Dennoch birgt die Sanger-Sequenzierung Grenzen. So ist die Anzahl an parallel ablaufenden Sequenzierungen limitiert, wodurch die Sanger-Sequenzierung für die Analyse mehrerer Gene sehr zeitaufwändig ist (Rizzo und Buck 2012). Des Weiteren ist diese Art der Sequenzierung für Projekte mit großem Umfang verhältnismäßig teuer (Morozova und Marra 2008).

1.5.2 Next generation sequencing

Im Laufe der Zeit wurden neue Sequenziermethoden entwickelt, welche unter dem Begriff *next generation sequencing* (NGS) zusammengefasst werden und im Jahr 2005 erstmalig auf den Markt kamen (Morozova und Marra 2008). Durch NGS ist es möglich, in kurzer Zeit große Mengen an DNA-Templates parallel und damit kosteneffektiv zu sequenzieren (Park und Kim 2016). Aufgrund des Fehlens von klinischen Standards bezogen auf die Genauigkeit und Interpretation der NGS-Daten wird die Sanger-Sequenzierung in der Diagnostik weiterhin verwendet, aber dennoch zunehmend durch NGS ersetzt (Rizzo und Buck 2012).

1.6 Fragestellung

Die Ermittlung von Mutationen durch die Sequenzierung des AR-Gens ist ein essenzieller Bestandteil der Diagnostik des AIS. Als Sequenziermethode wird NGS einerseits heutzutage noch nicht als Goldstandard verwendet und andererseits fehlen einheitliche Standards zur Auswertung der NGS-Daten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten daher die Mutationen im AR-Gen, die bereits im Vorfeld durch NGS ermittelt worden waren, mit einer bewährten Sequenziermethode, der Sanger-Sequenzierung, welche über Jahrzehnte in der klinischen Routinediagnostik als Goldstandard etabliert ist, reproduziert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war darüber hinaus die Validierung weiterer Mutationen, die ebenfalls durch NGS ermittelt worden waren und deren Genauigkeit per Sanger-Sequenzierung überprüft werden sollte. Diese Mutationen betrafen andere Gene als das AR-Gen und stellten damit potenzielle Kandidatengene für die Ausbildung eines AIS Typ II dar. Unter diesen Genen befand sich KPNA1. Als Bestandteil der Importrezeptoren stellt KPNA1 eine wichtige Komponente am nukleären Import des AR dar. Eine Mutation im Gen dieses KPNA1-Proteins könnte daher den reibungslosen Signalweg des Androgen-aktivierten AR beeinträchtigen. Demzufolge ergibt sich als weitere Zielsetzung dieser Arbeit, die möglichen Auswirkungen der bei Pat.19 gefundenen Mutation im KPNA1-Gen als putativer Co-Faktor des AR zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Folgenden findet sich eine Zusammenstellung der verwendeten Materialien.

2.1.1 Zellkulturen

Die Durchführung der Untersuchungen an kultivierten Genitalhautfibroblasten wurde von der Ethikkommission der Universität Kiel genehmigt (Aktenzeichen 401/14, s. Anhang 7.11). Die Kontrollzelllinien entstammen Proben, welche im Rahmen urologischer Eingriffe, wie Vasektomie, Zirkumzision oder Orchidopexie, bei männlichen Personen aus Skrotal- oder Vorhautgewebe bei ansonsten phänotypisch unauffälligen äußeren Genitalorganen entnommen wurden (Tab. 2). Die Zelllinien von AIS-Patienten gingen aus Gewebeproben von Skrotum/Labia majora bzw. vom Präputium/Labia minora hervor (Tab. 1). In Abb. 8 sind die zu den Patienten gefundenen Mutationen bezogen auf die betroffenen Exons im AR-Gen dargestellt.

Tab. 1 Auflistung der Patienten-Zellen.

ID	Biopsiort	Alter bei Biopsie [Jahre]	AIS-Diagnose	Phänotyp			
				Hoden	Vagina	Uterus	Anmerkung
Patient 1	Labien	17,22	CAIS	√	√	x	Komplette testikuläre Feminisierung
Patient 2	Hoden	19,45	CAIS	√	√	k. A.	Komplette testikuläre Feminisierung
Patient 3	Skrotum	1,35	PAIS	√	x	k. A.	Skrotum bifidum, Hypospadias perinealis
Patient 4	Labien	17,00	CAIS	√	√	x	Testikuläre Feminisierung
Patient 5	Labien	0,12	PAIS	√	√	k. A.	Testikuläre Feminisierung
Patient 6	Labien	2,64	CAIS	√	k. A.	k. A.	Testikuläre Feminisierung

ID	Biopsieort	Alter bei Biopsie [Jahre]	AIS-Diagnose	Phänotyp			
				Hoden	Vagina	Uterus	Anmerkung
Patient 7	Präputium	12,04	PAIS	k. A.	k. A.	k. A.	Mikrophallus, Hypospadie
Patient 8	Labien	18,37	CAIS	√	√	k. A.	Testikuläre Feminisierung
Patient 9	Präputium	0,01	PAIS	√	k. A.	k. A.	Skrotum bifidum, Hypospadie, intersexuelles Genitale
Patient 10	Labien	1,19	CAIS	k. A.	√	x	Testikuläre Feminisierung
Patient 11	Skrotum	18,26	PAIS	k. A.	√	k. A.	Partielle testikuläre Feminisierung, Pseudohermaphroditismus masculinus
Patient 12	Labien	36,89	CAIS	√	√	k. A.	Testikuläre Feminisierung
Patient 13	Hoden	16,16	PAIS	√	√	k. A.	Testikuläre Feminisierung
Patient 14	Präputium	11,55	PAIS	√	k. A.	k. A.	Pseudohermaphroditismus masculinus, intersexuelles Genitale
Patient 15	Labien	15,82	CAIS	√	√	k. A.	k. A.
Patient 16	Skrotum	25,81	PAIS	k. A.	√	k. A.	Hypospadie
Patient 17	Präputium	16,24	PAIS	√	k. A.	k. A.	Hypospadie
Patient 18	Labioskrotal	ca. 15	CAIS	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Patient 19	Labien	4,54	CAIS	k. A.	√	x	Testikuläre Feminisierung
Patient 20	Hoden	15,57	PAIS	√	k. A.	k. A.	Komplette testikuläre Feminisierung
Patient 21	Skrotum	1,68	PAIS	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.

√ = vorhanden, x = nicht vorhanden, k. A. = keine Angaben

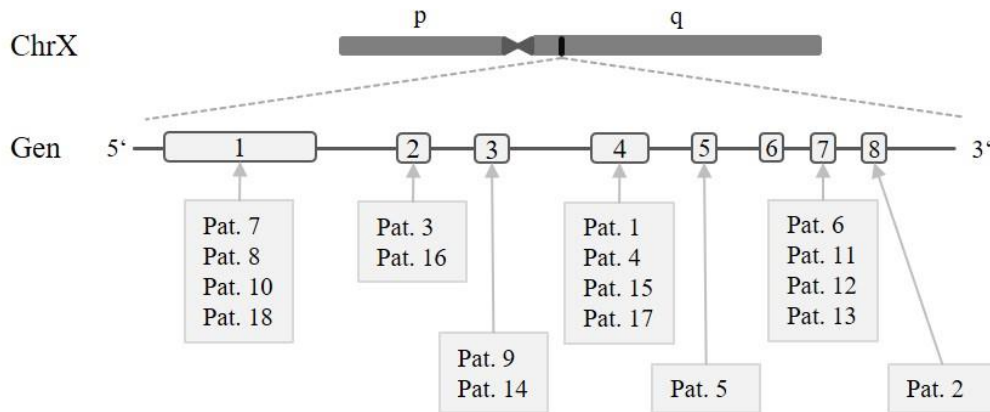


Abb. 8 **Schematische Darstellung der Mutationen im AR-Gen.** In dieser Übersicht sind die Mutationen der Patienten (Pat.1-18.) den jeweiligen Exons (hellgraue Kästen 1-8) des AR-Gen, welches auf dem langen Arm (q) des X-Chromosoms (ChrX, dunkelgrau) liegt, zugeordnet. p = kurzer Arm des X-Chromosoms.

Tab. 2 **Auflistung der Kontroll-Zelllinien**

ID	OP	Ort der Biopsie	Alter bei Entnahme [Jahre]	Phänotyp des Genitales
Kontrolle 1	Vasektomie	Skrotum	35,5	o. B.
Kontrolle 2	Vasektomie	Skrotum	37,6	o. B.
Kontrolle 3	Orchidopexie	Skrotum	2,83	o. B.
Kontrolle 4	Vasektomie	Skrotum	40,42	o. B.
Kontrolle 5	Orchidopexie	Skrotum	2,17	o. B.
Kontrolle 6	Orchidopexie	Skrotum	9,17	o. B.
Kontrolle 7	Vasektomie	Skrotum	38,5	o. B.
Kontrolle 8	Vasektomie	Skrotum	51,33	o. B.
Kontrolle 9	Zirkumzision	Präputium	10,42	Palmure
Kontrolle 10	Zirkumzision	Präputium	44,17	o. B.

o. B. = ohne Befund

2.1.2 Primer

Die verwendeten Primer sind mit genauer Bezeichnung im Anhang gelistet (Tab. 8, Tab. 9). Um die Mutationen, welche außerhalb des AR-Gen gefunden worden sind, zu untersuchen, wurden Primer-Sequenzen für die betroffenen Gene mittels der Software Primer 3 bestimmt. Die in Tab. 8 aufgeführten Primer für die Sequenzierung des AR-Gen wurden aus dem Pädiatrisch-Endokrinologischen Labor in Lübeck zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Chemikalien

Reagenz/Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Aktivkohle	NoritA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Antifade	DABCO	Sigma-Aldrich, USA
Antikörper	Alexa-Fluor 594	Molecular Probes, USA
Antikörper	Anti-Actin (rabbit)	Sigma-Aldrich, USA
Antikörper	Anti-Androgen Receptor [F39.4.1.]	BioGenex, USA
Antikörper	Anti-mouse	Immuno Reagents Inc, USA
Antikörper	Anti-rabbit	Immuno Reagents Inc, USA
Antikörper	GAPDH antibody	GeneTex, USA
Antikörper	Nuclear Matrix Protein p84 antibody [5E10]	GeneTex, USA
Antikörper	SRP1 antibody	GeneTex, USA
Antikörper	YY1 (c-20):sc-281	Santa Cruz Biotechnology, USA
Antioxidant	NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, USA
Detektionsreagenz	Luminata ForteWestern HRP Substrate	Millipore Corporation, USA
Elektrophoresegel	NuPAGE Bis-Tris Gels 4-12%	Life Technologies, USA
Ethidiumbromid	Ethidiumbromide solution	Sigma-Aldrich, USA
Färbereagenz	BioRad Protein Assay	BioRad, USA
Färbereagenz	Ponceau S solution	Sigma-Aldrich, USA
Fetales Kälberserum	FBS superior	Biochrom GmbH, Berlin
Fluoreszenzfarbstoff	DAPI	Invitrogen, USA
L-Glutamin	L-Glutamine 100x, 200 mM	Biowest, Frankreich
Magnesiumchlorid	MgCl ₂ Solution 25 mM	Applied Biosystems, USA
Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Life Technologies, USA
Medium	Recovery Cell Culture Freezing Medium	Life Technologies, USA
Milchpulver	Blotting Grade	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Deoxynucleoside Triphosphate Set	Roche, Schweiz
Pen Strep	Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, USA
PCR-Puffer	10x PCR Buffer II	Applied Biosystems, USA
Polymerase	AmpliTaq Gold 5 U/μl	Applied Biosystems, USA
Puffer	HEPES Buffer Solution (1 M)	Life Technologies, USA
Puffer	NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20x	Life Technologies, USA

Reagenz/Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
Puffer	NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies, USA
Puffer	Phosphate Buffered Saline pH 7,4	Life Technologies, USA
Puffer	Ultra Pure 10x TBE Buffer	Invitrogen, USA
Standard	Precision plus Protein Dual Xtra Standards	BioRad, USA
Standard	TriDye100 bp DNA Ladder	New England BioLabs, USA
TritonX	TritonX-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Trypsin-EDTA 10x	Biowest, Frankreich
Wasser	Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Accuprime Taq DNA Polymerase System	Applied Biosystems, USA
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, USA
MinElute 96 UF PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Montage Seq 96 Sequencing Reaction Clean Up Kit	Merck Millipore, USA

2.1.5 Verbrauchsartikel

Artikel	Bezeichnung	Hersteller
Deckel für 0,2 ml Reagiergefäß	8er Deckelkette flach	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	100 Cover Glasses (18 x 18 mm)	Zeiss, Jena
Kulturflaschen	TC-Flasche T75/T175 Stand.	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger	Objektträger (76 x 26 mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Serological Pipette	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß	Multiply μ -Strip 0,2 ml Kette	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß	Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
6-Well-Platte	TC-Platte 6 Well	Sarstedt, Nümbrecht
Transferpipette	Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.6 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Beheizbarer Schüttler	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	HeraCell150 CO ₂ - Inkubator	Thermo Scientific, USA
Elektrophoresekammer	Model 400911	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Elektrophoresekammer	Novex Mini Cell	Invitrogen, USA
Entwicklungsmaschine	Curix60	Agfa, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager.A1	Zeiss, Oberkochen
Geldokumentation	BioDocAnalyze Ti5	Biometra, Göttingen
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipetus	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	MS3 basic	IKA, Staufen
Sequenzierer	Hitachi 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, USA
Spannungsquelle	Electrophoresis Powerpack P24	Biometra, Göttingen
Temperaturregulierbare Zentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Vortexer	Reax200	Heidolph, Schwabach

2.2 Methoden

Die folgenden Abschnitte beschreiben die Durchführung der angewandten Methoden.

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifizierung von DNA-Fragmenten.

2.2.1.1 Optimieren der PCR-Primer

Für die Primer aus Tab. 9 mussten zunächst die optimalen *Annealing*-Temperaturen bestimmt werden, um später unter Verwendung von Patienten-DNA direkt ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten. Hierfür wurden zunächst 55 °C, 60 °C und 65 °C als Temperaturen gewählt. Das Ergebnis der PCRs wurde anschließend durch die Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet. Gegebenenfalls wurde die *Annealing*-Temperatur erneut variiert, um optimale Bedingungen zu

schaffen. Für die in Tab. 8 gelisteten Primer waren *Annealing*-Temperaturen bereits bekannt. Lediglich die Polymerasen wurden durch laboreigene Polymerasen ersetzt.

2.2.1.2 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Für die PCR wurden die zu amplifizierenden DNA-Templates zunächst auf eine einheitliche Konzentration von 100 ng/µl verdünnt. Nach Herstellen der Reaktionslösung mit einem Volumen von 25 µl pro Probe, konnte die PCR im Thermocycler gestartet werden. Hierbei erfolgte eine Denaturierung der DNA-Stränge bei 95 °C. Daran schloss sich das *Annealing* an, wobei eine Hybridisierung der Primer an die DNA-Matritze stattfand. Die hierfür optimale Temperatur unterschied sich je nach Primer und Polymerase. Bei 72 °C konnte dann die Elongationsphase beginnen, wobei diese Temperatur ebenfalls je nach verwendeter Polymerase variierte. Diese drei Reaktionsschritte wiederholten sich in 36 Zyklen. Abschließend wurde das Reagenz auf 4 °C abgekühlt. Die Zusammensetzung der Mastermix-Lösungen sowie die Thermocycler-Programme für die verwendeten Polymerasen sind im Anhang zu finden (Tab. 10, Tab. 11).

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit einer Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Für ein 1%iges Gel wurde 1 g Agarose zu 100 ml 1x TBE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde die Lösung unter kaltem Wasser abgekühlt, um dann nach einer Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (0,05%ige Lösung) in eine dafür vorgesehene Form gegossen und zum Härten bei Raumtemperatur stehen gelassen zu werden. Es wurden 6 µl des PCR-Amplifikats zusammen mit einem Ladepuffer in die Geltaschen aufgetragen. Als Längenkontrolle wurde die TriDye 100 bp DNA Ladder verwendet. Für die Elektrophorese eines Gels mit den Maßen von 10 x 10 cm wurde eine Spannung von 120 V für 30 bis 60 min angelegt. Die Auswertung erfolgte anschließend mittels des BioDoc Analyzers unter UV-Licht und der dazugehörigen Software (BioDoc Analyse 2.2). Unter Abgleich der Banden mit der Längenkontrolle war es möglich, die Größe der PCR-Amplifikate zu bestimmen und so mit der bekannten Länge des DNA-Fragmentes zu vergleichen.

2.2.1.4 Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Zum Aufreinigen der PCR-Produkte wurde das Min Elute 96 UF PCR Purification Kit verwendet. Zunächst erfolgte die Zugabe von 40 µl Aqua dest. zum PCR-Produkt, welches anschließend auf die 96-Well-Filterplatte überführt wurde. Durch Anlegen eines Vakuums mit

einem Druck von 20-25 mmHg wurde die Flüssigkeit durch die Membran gesaugt. Zum Waschen wurden erneut 50 µl Aqua dest. zugegeben und ebenfalls ein Vakuum angelegt. Nachdem die gesamte Flüssigkeit durch die Membran gesaugt worden war, wurden 20 µl Aqua dest. in jedes benutzte *Well* gegeben. Die Platte wurde nun für 5 min bei 1000 – 3000 rpm geschüttelt, um die PCR-Amplifikate zu resuspendieren. Hiernach konnten die gereinigten PCR-Produkte in ein 0,2 ml Eppendorfgefäß zur Aufbewahrung überführt werden.

2.2.2 Sanger-Sequenzierung

Für diese Art der Sequenzierung werden neben den Deoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) dem Reagenz zusätzlich Dideoxynukleotidtriphosphate (ddNTP) zugefügt. Durch den Einbau eines ddNTP durch die DNA-Polymerase kommt es zum Abbruch der DNA-Synthese, da ein ddNTP keine 3'OH-Gruppe, welche für eine Kettenverlängerung nötig ist, besitzt (Sanger et al. 1977). Durch die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase ist es möglich, mehrere Zyklen solcher Kettenverlängerungen hintereinander ablaufen zu lassen (Kretz et al. 1994). In diesen Zyklen werden je 3 Phasen mit unterschiedlichen Temperaturen durchschritten. Diese Phasen werden aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation bzw. Termination gebildet (Kretz et al. 1994; Shendure und Ji 2008). In jeder Elongationsphase kommt es an einer zufälligen Position zum Einbau eines ddNTPs statt eines dNTPs und so zum Abbruch der Synthese. Durch fortlaufende Wiederholung dieses Prozesses entstehen unterschiedlich lange Syntheseprodukte mit jeweils einem ddNTP am Ende. Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter ddNTPs mit je einer Farbe pro Base ist es möglich, durch Detektion des Lichtsignals die Base am Ende der einzelnen Fragmente zu bestimmen (McBride et al. 1989; Smith et al. 1986). Die Fragmente werden elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, damit anschließend durch Messen des Fluoreszenzsignals am Ende eines jeden Fragmentes die Basenabfolge ermittelt werden kann (Prober et al. 1987). Die Daten werden durch eine entsprechende Software verarbeitet und in einem Elektropherogramm, in welchem die farbigen Ausschläge und die ermittelte Sequenz dargestellt werden, veranschaulicht (Smith et al. 1986). Der Ansatz des Mastermix für diese Reaktion ist in Tab. 12 aufgeführt sowie auch das entsprechende Thermocycler-Programm. Nach dieser Reaktion wurde das Produkt, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, aufgereinigt und konnte für die elektrophoretische Analyse verwendet werden.

2.2.3 Aufreinigung der Sequenzierreaktion

Zum Aufreinigen der Sequenzierprodukte wurde das Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup Kit verwendet. Zunächst wurde das Produkt der Sequenzierungsreaktion mit 20 µl der

zum Kit gehörenden Injektionslösung gemischt und auf die 96-Well-Filterplatte überführt. Durch Anlegen eines Vakuums von 23-25 mmHg wurde die Flüssigkeit vollständig durch die Membran gesaugt, sodass das Produkt anschließend durch Zugabe von 20 µl Injektionslösung gewaschen werden konnte. Nachdem auch diese Flüssigkeit durch Anlegen des Vakuums entfernt worden war, erfolgte eine Zugabe von 20 µl Aqua dest.. Daraufhin wurde die 96-Well-Filterplatte für 5 min bei 1000-3000 rpm geschüttelt, um somit eine Resuspension der Sequenzierungsprodukte zu erreichen. Hiernach konnten diese zur elektrophoretischen Analyse in dafür vorgesehene Gefäße überführt werden.

2.2.4 Zellkultur

Für die Kultivierung der Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zugabe von 20 mM HEPES, 100 Units/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 10% FBS verwendet. Kultiviert wurden die Fibroblasten im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂. Im Folgenden werden weitere Schritte der Zellkultur beschrieben.

2.2.4.1 Auftauen von Zelllinien

Um die Zellen in Kultur zu nehmen, mussten die noch gefrorenen Zellen mit warmem Medium aus dem *Freezing-Tube* in ein mit 10 ml warmem Medium gefülltes 15 ml Gefäß überführt werden. Nach 5-minütigem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt, die Zellsuspension in Medium gelöst und in die Kulturflasche überführt. In den T175 Kulturflaschen wurden die Zellen stets mit 20 ml Medium kultiviert. Bei einer Konfluenz der Zellen von 80 bis 90% wurden die Fibroblasten gesplittet. Hierfür wurden die adhärennten Zellen zunächst in PBS gewaschen und dann mit 5x konzentriertem Trypsin von den Kulturflaschen abgelöst und auf die gewünschte Anzahl an weiteren Kulturflaschen verteilt.

2.2.4.2 Einfrieren von Zelllinien

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese, wie zuvor beschrieben, vom adhärennten Zustand gelöst, dann mit Medium in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur, 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes konnte die Zellsuspension je nach Größe mit 800 bis 1000 µl *Freezing-Medium* gelöst und in ein zum Einfrieren geeignetes Gefäß überführt werden, welches anschließend sofort auf Trockeneis gestellt wurde. Hiernach wurden die Zellen zunächst bei -80 °C zwischengelagert, um später im Stickstofftank dauerhaft eingefroren zu werden.

2.2.5 Herstellung eines steroidfreien FBS

Für ein von Steroidhormonen freies Medium wurde das FBS mit Aktivkohle behandelt. Hierfür wurden 100 ml FBS mit 2 g Aktivkohle versetzt und 24 h bei 37 °C mit einer Frequenz von 220 min⁻¹ geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung 3-mal für je 30 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde jeweils mit einer Pipette abgenommen und steril filtriert. Die gewonnene Lösung wurde dann bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.2.6 Immunfluoreszenz

Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wird das Zielgewebe zunächst mit einem primären Antikörper inkubiert, welcher gegen ein Antigen des zu untersuchenden Gewebes gerichtet ist (Barbierato et al. 2012). Ein sekundärer Antikörper, welcher mit einem Fluorochrom konjugiert ist, bindet an den primären Antikörper (Barbierato et al. 2012). Durch die Anregung des Fluorochroms durch UV-Licht eines Fluoreszenzmikroskops kann das mittels der Antikörper markierte Antigen sichtbar gemacht werden (s. Abb. 9) (Barbierato et al. 2012).

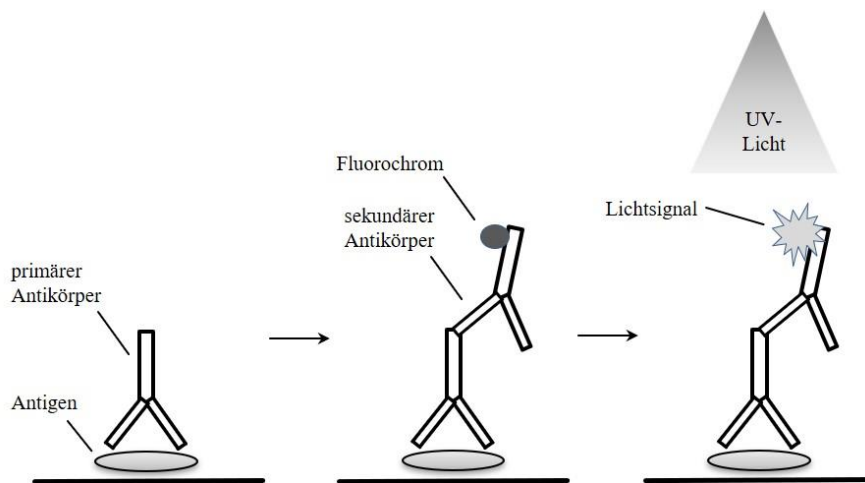


Abb. 9 **Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung.** Das Antigen wird von einem primären Antikörper gebunden, welcher anschließend von einem sekundären Antikörper gebunden wird (Barbierato et al. 2012). Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluorochrom konjugiert, welches unter UV-Licht ein Lichtsignal emittiert (Barbierato et al. 2012).

In den folgenden Abschnitten werden die auf mehrere Tage verteilten Arbeitsschritte dieses Experimentes beschrieben.

2.2.6.1 Verteilung der Zellen in 6-Well-Platten

Zunächst wurde in jedes Well einer 6-Well-Platte ein Deckgläschen gelegt, auf dem die Zellen wachsen sollten. Anschließend wurden die in Kultur gehaltenen Genitalhautfibroblasten auf

diese Platten verteilt. Für jede Zelllinie wurden je nach Versuchsdurchgang ein oder zwei *Wells* mit einer Zellzahl von 40.000 bis 100.000 Zellen pro *Well* beansprucht. Zur Berechnung der Zellzahl wurde eine Zählkammer (Neubauer improved, Marienfeld superior, Lauda-Königshofen) verwendet.

2.2.6.2 Inkubation der Zellen mit EtOH oder DHT

Am darauffolgenden Tag wurde das Medium für die Inkubation angesetzt. Dieses Medium bestand aus DMEM mit einer Zugabe von 20 mM Hepes, 100 Units/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und mit Aktivkohle behandeltem FBS (FBS, DCC). Es wurden damit zwei Lösungen erstellt mit je 10 ml Medium und einer Zugabe von entweder 1 µl Ethanol (EtOH) oder 1 µl einer 10 nM DHT-Lösung (gelöst in EtOH). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS, wurden pro *Well* 2 ml der Inkubationslösungen verteilt und die *6-Well-Platten* für 48 h im Brutschrank belassen.

2.2.6.3 Auftragen der Antikörper auf die Zellen

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die *Wells* zweimal mit warmer PBS-Lösung gewaschen. Darauf folgte eine Fixierung der Zellen durch PBS + 3% Formalin. Das anschließende Waschen erfolgte ab diesem Schritt mit einer Lösung aus PBS und 0,2% TritonX-100 (Tab. 13). Daran schloss sich eine Zugabe von PBS + 1% TritonX-100 zur Permeabilisierung der Zellmembran an. Nach erneutem Waschen konnte der primäre Antikörper, welcher zuvor im Verhältnis 1:10 mit PBS + 0,2% TritonX-100 verdünnt worden war, zur 45-minütigen Inkubation auf die Deckgläschen gegeben werden. Hierfür wurde eine feuchte Kammer verwendet, welche aus einem Rahmen besteht, welcher mit einer flüssigkeitsundurchlässigen Membran ausgekleidet ist. Die Antikörperlösung wird auf diese Membran aufgetropft, sodass man anschließend das Deckgläschen mit der mit Zellen behafteten Seite über diesen Tropfen platzierte. Der erste Antikörper entsprach einem in der Maus generierten Antikörper, welcher an den humanen AR bindet. Nach Ende der Einwirkzeit des Antikörpers wurde das Deckgläschen zurück in die *6-Well-Platte* überführt und es schloss sich ein fünfmaliges Waschen der Zellen mit PBS + 0,2% TritonX-100 an. Hierauf folgte die erneute 45-minütige Inkubation in der feuchten Kammer mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor 594), welcher zunächst mit PBS + 0,2% TritonX-100 im Verhältnis 1:500 verdünnt worden war. Danach konnten die Zellen erneut fünfmal mit der Waschlösung und zusätzlich einmal mit Aqua dest. gewaschen werden. Bevor die Deckgläschen mit den Zellen auf den Objektträger überführt wurden, musste zunächst wenige µl Eindeckmedium, wovon zuvor 100 µl mit 0,75 µl DAPI versetzt worden waren, aufgetragen

werden. Die Deckgläschen wurden dann, mit der Zell-behafteten Seite nach unten gerichtet, an dem Tropfen Eindeckmedium abgesetzt und vorsichtig gesenkt, um Lufteinschlüsse zu vermeiden. Nachdem die Präparate getrocknet waren, konnten sie unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Für eine Kontrolle der unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers wurde immer parallel ein Präparat angefertigt, welches lediglich mit diesem Antikörper inkubiert worden war.

2.2.6.4 Auswertung am Mikroskop

Für die Auswertung der hergestellten Präparate wurde ein Fluoreszenzmikroskop sowie die Software ISIS V 5.2.11 verwendet. Um einen Überblick über das gesamte Präparat zu gewinnen, wurde eine 16-fache Vergrößerung gewählt. Mit der 63-fachen Vergrößerung wurden anschließend vom Präparatrand ausgehend etwa 100 Zellen in der DAPI-Darstellung abgezählt (DAPI Anregung/Emission: 358/461 nm, laut Herstellerangaben). Dann wurde zu dem roten Filter (Texas Red) für die Darstellung des Sekundärantikörpers (Alexa-Fluor 594 Anregung/Emission: 590/617 nm, laut Herstellerangaben) gewechselt. Damit wurden die zuvor abgezählten Zellen in umgekehrter Reihenfolge zum Präparatrand hin erneut betrachtet und hinsichtlich der Verteilung des fluoreszenzmarkierten AR in den Zellen bewertet.

2.2.6.5 Optimierung der Experimentbedingungen

Um einen nahezu direkten Vergleich zu ermöglichen wurde ausschließlich eine Kontrollzelllinie verwendet und anschließend in der Experimentdurchführung verschiedene Parameter variiert. Zunächst wurden, wie zuvor beschrieben, 100.000 Zellen pro *Well* ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit einer EtOH-oder DHT-haltigem Medium für weitere 48 h bebrütet. Danach wurden alle Zellen, wie im Abschnitt 2.2.6.3 beschrieben, bis zu dem Punkt der Inkubation mit dem primären Antikörper in derselben Weise behandelt. Ein Vergleichspunkt stellte die Verwendung zweier Anti-AR-Antikörperlösungen dar. Beide Lösungen wurden jeweils 1:10 mit PBS + 0,2% TritonX-100 verdünnt. Auch sollte die Art des Auftragens der Antikörper variiert werden. Daher wurde pro Antikörperlösung je ein mit EtOH- bzw. DHT-behandeltes Präparat zunächst in der feuchten Kammer inkubiert. Gleichzeitig wurden ebenfalls beide Antikörperlösungen je auf ein mit EtOH- bzw. DHT-behandeltes Präparat mit einer Transferpipette tropfenweise aufgetragen. Hierbei reichten 1 bis 2 Tropfen, um das mit Zellen bewachsene Deckgläschen vollständig zu benetzen. Die Techniken die Antikörper-Lösung aufzutragen sind zusammen mit dem kompletten Experimentdurchgang in Abb. 10 veranschaulicht. Die 45-minütige Inkubationszeit für die Antikörper wurde

beibehalten, genauso wie das 5-malige Waschen nach Ablauf dieser Zeit. Das Auftragen des sekundären Antikörpers wurde ebenfalls in den zuvor beschriebenen zwei verschiedenen Weisen durchgeführt. Hierauf schloss sich die erneute Inkubationszeit von 45 min an. Das darauffolgende 5-malige Waschen mit PBS + 0,2% TritonX-100 und 1-mal mit Aqua dest. wurde, wie im Abschnitt 2.2.6.3 beschrieben, durchgeführt. Hiernach wurden die Objektträger mit den Deckgläschen für Auswertung unter dem Mikroskop präpariert

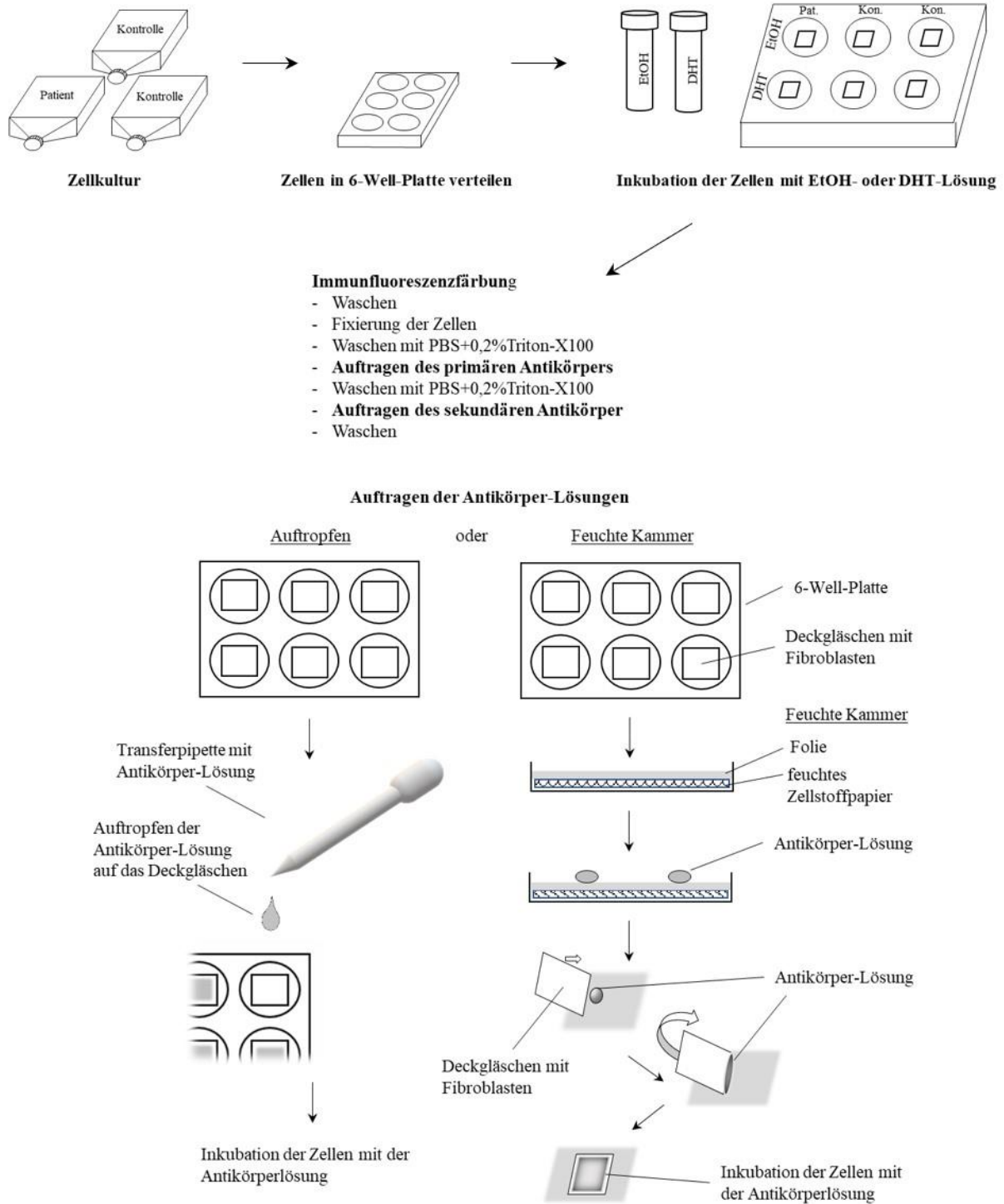


Abb. 10 **Immunfluoreszenz-Experiment.** Zunächst wurden die Zellen kultiviert und in 6-Well-Platten auf einem Deckgläschen ausgesät. Es schloss sich die Inkubation der Zellen mit einer EtOH- oder DHT-Lösung an. Danach erfolgte die Immunfluoreszenz-Färbung der Präparate, wobei zunächst die Lösung mit dem primären Antikörper und später die Lösung mit dem sekundären Antikörper aufgetragen wurden. Als Technik, diese Lösungen auf die Präparate zu bringen, wurde entweder die Antikörper-Lösung aufgetropft oder das Deckgläschen wurde in der feuchten Kammer mit der Antikörper-Lösung benetzt. DHT = Dihydrotestosteron, EtOH = Ethanol

2.2.6.6 Veränderung der Experimentbedingungen

Es erfolgte eine Anpassung der Experimentbedingungen. Dabei wurden Waschschritte, die Hormoninkubationszeit, die Serum-Konzentration und die Zellzahl variiert. Diese Veränderungen sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3 Veränderungen in den Experimentbedingungen zum Immunfluoreszenz-Experiment

Zellzahl pro Well	100.000	100.000	100.000	100.000	40.000
Ink.-zeit	48 h	48 h	72 h	72 h	72 h
Waschen vor Ink.	1	1	2	2	2
Ink.-lösung	EtOH/ DHT 10% FBS, DCC	EtOH/ DHT 10% FBS, DCC	EtOH/ DHT 10% FBS, DCC	10% FBS, DCC	0,1% FBS, DCC
Auftragen der Antikörper	Feuchte Kammer	Auftropfen	Auftropfen	Auftropfen	Auftropfen
Waschen nach Antikörper-Ink.	5	5	5	8	8

DHT = Dihydrotestosteron, EtOH = Ethanol, Ink. = Inkubation

2.2.7 Wachstumsanalyse

Für dieses Experiment wurde eine Zellzahl von 75.000 Zellen pro Well ausgesät und mit dem Fibroblasten-Medium bebrütet. Die Zellzahl sollte an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt werden. Pro Tag wurden für jede Zelllinie drei Wells beansprucht (Dreifachansatz). Um die Zellen zählen zu können wurden diese erst mit PBS gewaschen, dann mit etwa 4 Tropfen Trypsin gelöst, um anschließend mit 500 µl Medium in ein geeignetes Gefäß überführt zu werden. Daraufhin konnte man die Zellzahl mittels der Zählkammer bestimmen.

2.2.8 Proteinextraktion

2.2.8.1 Aussähen der Zellen und Inkubation mit Steroidhormon-freiem Medium

Zunächst wurden etwa 100.000 Zellen einer Zelllinie in eine T175 Kulturflasche ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen dreimal mit 20 ml Medium (DMEM mit einer Zugabe von 20 mM Hepes, 100 Units/ml Penicillin/Streptomycin, 2mM L-Glutamin) gewaschen und anschließend für 72 h in einem Medium (DMEM mit einer Zugabe von 20 mM Hepes, 100 Units/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin) mit einem Anteil von 0,1% FBS, DCC bzw. 10% FBS, DCC inkubiert.

2.2.8.2 Extraktion der Proteine aus den Zellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend mittels des Trypsins von der Kulturflasche abgelöst, um dann mit 10 ml Medium in ein 15 ml Gefäß überführt, um 5 min bei 1000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert zu werden. Nach der Zentrifugation konnte der Überstand abgenommen werden. Ab diesem Arbeitsschritt wurde auf Eis gearbeitet, auch später verwendete Mikroreaktionsgefäße mussten zunächst gekühlt werden. Die verbliebene Zellsuspension wurde nun mit 1000 µl eiskaltem PBS gewaschen und bei 4 °C, 1000 rpm für 3 min zentrifugiert. Daraufhin wurde das PBS wieder abgenommen, damit der hypotonische Puffer A, welcher die Zellen zum Platzen bringen sollte, zugegeben werden und für 15 min inkubiert werden konnte. Die Menge des Puffers entsprach dem 5-fachen Volumen der Zellsuspension. Anschließend wurden noch intakte Zellenmembranen durch die Nutzung des *Dounce Homogenizer* mit 10 Schlägen zum Platzen gebracht. Durch Anfärben eines kleinen Teils der Suspension mit Trypanblau, konnte man den Erfolg der Zellyse unter dem Mikroskop beurteilen. Die Zellsuspension wurde dann bei 4 °C, 1000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der daraus entstandene Überstand entsprach dem zytoplasmatischen Extrakt, welches abgenommen und in ein geeignetes Gefäß überführt wurde. Nachdem das PBS abgenommen worden war, wurde der Puffer C im 5-fachen Volumen im Verhältnis zum verbliebenen nukleären Anteil dazugegeben und für 15 min stehen gelassen, um die Zellkerne zu lösen. Um diesen Prozess zu optimieren, wurde unter Nutzung von 10 bis 20 Schlägen mit dem *Dounce Homogenizer* die Extraktion der nukleären Proteine unterstützt. Hiernach schloss sich eine Zentrifugation bei 4 °C, bei 12000 rpm für weitere 30 min an. Der gewonnene Überstand wurde in ein geeignetes Gefäß überführt und entsprach dem nukleären Extrakt. Sowohl nukleäres als auch zytoplasmatisches Extrakt wurden sofort auf Trockeneis eingefroren. Ein kleiner Teil der Extrakte wurde für die Proteinmessung auf Eis behalten. Die verwendeten Puffer A und Puffer C sind ihrer genauen Zusammensetzung im Anhang aufgeführt (s. Tab. 15)

Nach der Extraktion der Proteine wurden deren Konzentrationen in den Lösungen photometrisch bestimmt. Hierfür wurden 3 µl Proteinlösung zu 1 ml verdünnter Bradford-Lösung-Assay (1:10 mit Aqua dest.) gegeben. Die Proteinkonzentration wurde aus der gemessenen Extinktion mittels folgender Formel errechnet und in µg/µl angegeben.

$$c(\text{Protein}) = \frac{E_{595}}{0,058} \div 3$$

2.2.9 Western Blot

Bei einem Western Blot werden Proteine mittels *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) separiert und anschließend auf eine absorbierende Membran übertragen (Kurien und Scofield 2006). Es folgen die Inkubation mit einem primären Antikörper gegen das jeweilige Protein sowie die Inkubation mit einem sekundären Antikörper (Kurien und Scofield 2006). Durch die Behandlung der Membran mit einem Chemolumineszenz-Reagenz wird eine chemische Reaktion katalysiert, welche zu einer Emission von Licht führt (Kurien und Scofield 2006). Der Blot wird so auf einen Film übertragen und visualisiert (Kurien und Scofield 2006) (s. Abb. 11).

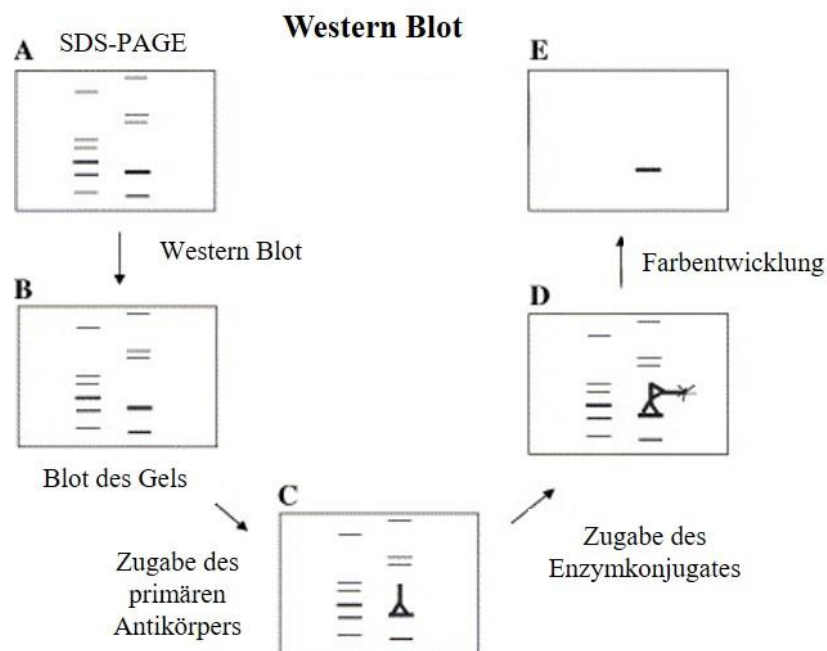


Abb. 11 **Schematische Darstellung des Western Blots** (nach Kurien und Scofield 2006). A: SDS-PAGE mit aufgetrennten Proteinen. B: Im Western Blot werden die Proteine auf eine Membran übertragen. C: Der primäre Antikörper bindet seine Zielstruktur (Protein) auf der Membran. D: Der sekundäre Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, bindet den primären Antikörper. E: Es folgt Farbwentwicklung, zur Visualisierung des durch den Antikörper markierten Proteins auf der Membran.

Es wurden 7,5 µg der Proteinextrakte zusammen mit 3 µl Ladepuffer sowie Aqua dest., dessen Menge sich aus der Differenz des zu ladenden Gesamtvolumens von 12 µl ergab, geladen. Die Ladelösungen (Tab. 16) wurden 5 min bei 95 °C bei 300 rpm denaturiert. Für die Elektrophorese wurde das Gel (8 x 8 cm) zunächst in der Elektrophoresekammer eingespannt und die innere Kammer mit einer Lösung aus NuPAGE MOPS 1x SDS Running Buffer und dem Antioxidant umspült. Die äußere Kammer wurde mit NuPAGE MOPS 1x SDS Running Buffer aufgefüllt. Als Standard wurden 8 µl von Precision plus Protein Dual Xtra Standards verwendet. Nach Auftragen der Proben wurde der Lauf bei 200 V für etwa 50 min gestartet. Für das

Blotting auf eine Transfermembran wurde die Blottingkammer entsprechend vorbereitet, unter Verwendung des Transferpuffers, dessen genaue Zusammensetzung der Tab. 17 im Anhang zu entnehmen ist. Es wurde für 1 h eine Spannung von 30 V angelegt. Anschließend wurden die Proteinbanden auf der Membran mit Ponceau S solution sichtbar gemacht, um den Transfer zu überprüfen, und mit Aqua dest. gewaschen. Hiernach wurde die Membran für 1 h in einer Blocklösung (Tab. 18) geschwenkt. Daran schloss sich die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern an. Der Antikörper gegen den AR wirkte über Nacht für etwa 16 h bei 4 °C ein, während die Antikörper gegen p84, GADPH bzw. KPNA1 erst am Folgetag für je 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Verdünnungen aller verwendeten Antikörper mit Blocklösung sind im Anhang in Tab. 14 zusammengestellt. Auf jede Inkubation folgten drei 10-minütige Waschschriffe der Membran, welche hierfür in 1x TBS + 0,1% Tween geschwenkt wurde. Danach konnten die sekundären Anti-mouse und Anti-rabbit-Antikörper, welche ebenfalls jeweils in der Blocklösung verdünnt worden waren (Tab. 14), aufgetragen werden, welche maximal 1 h 20 min bei Raumtemperatur einwirkten. Anschließend erfolgte erneut das 3-malige Waschen der Membran mit 1x TBS + 0,1% Tween. Daraufhin wurde die Membran für 2 min mit dem Luminata Forte Western HRP Substrate inkubiert und das Lumineszenz-Signal auf ein Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) übertragen. Der Film wurde dann im Curix60 entwickelt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung optimaler PCR-Bedingungen der Primer

3.1.1 Primer zur Detektion von Mutationen innerhalb des AR-Gens

Um die optimalen PCR-Bedingungen für die in Tab. 8 (s. Anhang) aufgeführten Primer zu überprüfen, wurden unter dem Einsatz der Polymerase AmpliTaq Gold PCRs durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in den Gelelektrophoresegelelen sichtbar gemacht (s. Abb. 12). Die Proben der Negativkontrollen zu jedem Primerpaar, bei welchen keine genomische DNA zugegeben worden war, zeigten keine Bande in der Elektrophorese, da keine Amplifikation stattgefunden hatte.

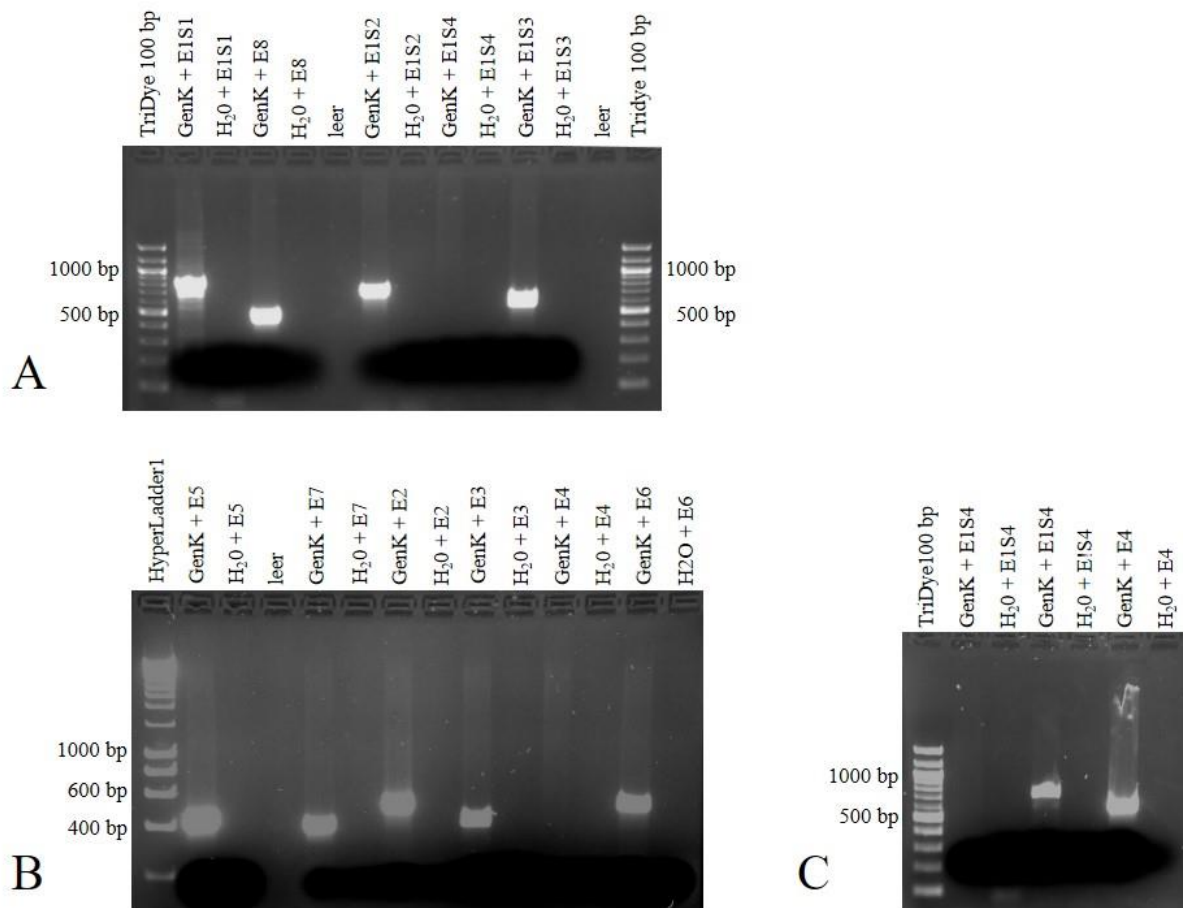


Abb. 12 Austesten der PCR-Bedingungen. Gel A, B und C: Verwendung von genomischer DNA (GenK) mit den Primerpaaren für die jeweiligen Exone (E) und ggf. Segment (S). A und B: Bei Zugabe von GenK waren bei 9 von 11 Proben Banden sichtbar (Amplifikation fand statt), bei 2 von 11 nicht (Amplifikation fand nicht statt). Bei Zugabe von Wasser (Negativkontrollen) waren bei 11 von 11 Proben keine Banden sichtbar (Amplifikation fand nicht statt). C: Wiederholung der PCRs für 2 Proben (E1S4 und E4). Negativkontrollen ohne Banden (Amplifikation fand nicht statt). Bei E1S4 bzw. E4 mit Zugabe GenK waren Banden sichtbar (Amplifikation fand statt).

Somit konnte eine Kontamination der Primer sowie eine Bildung von Primerdimeren mit gleichem molekularem Gewicht ausgeschlossen werden. Im Gel A und Gel B in Abb. 12 waren bei 9 Proben mit genomischer DNA starke Banden sichtbar, was das Gelingen der Amplifikation verdeutlichte. In zwei Proben mit genomischer DNA waren jedoch keine Banden erkennbar. Dies betraf die Primer für das Exon 1 (Segment 4) und Exon 4. Die PCR-Bedingungen wurden für diese Proben angepasst. Für das Exon 1 (Segment 4) wurden zwei Ansätze mit verschiedenen Polymerasen (Accuprime, AmpliTaq Gold) verwendet. Für das Exon 4 wurde die PCR mit der vorherigen Polymerase (AmpliTaq Gold) jedoch unter Zugabe von Q-Solution erneut gestartet. Im Gel C in Abb. 12 sind die zugehörigen Banden sichtbar. Die Probe von Exon 1 (Segment 4) mit der Accuprime-Polymerase lieferte kein PCR-Produkt. Dagegen war die PCR für die Probe von Exon 1 (Segment 4) mit der Polymerase AmpliTaq Gold erfolgreich, ebenso wie die Amplifikation des Exon 4. Die ermittelten PCR-Bedingungen für alle Primerpaare sind im Anhang in Tab. 19 zusammengestellt.

3.1.2 Primer zur Detektion von Mutationen außerhalb des AR-Gens

Für die Primer bezüglich der Mutationen, die außerhalb des AR-Gens gefunden worden waren, waren die optimalen PCR-Bedingungen unter Anwendung verschiedener *Annealing*-Temperaturen (55 °C, 60 °C, 65 °C) zu ermitteln. Für jedes Primerpaar wurden Negativkontrollen ohne Zugabe von genomischer DNA angefertigt, die in der Elektrophorese keine Bande zeigten, da hier keine Amplifikation stattgefunden hatte. Unter Verwendung genomischer DNA funktionierte mindestens einer der drei durchgeführten PCR-Ansätze pro Primerpaar, was durch das Vorhandensein einer Bande in der Gelelektrophorese verdeutlicht war (s. Abb. 13). Eine übersichtliche Darstellung der so ermittelten Parameter, wie die zu verwendende Polymerase und die *Annealing*-Temperatur, sind in Tab. 20 im Anhang aufgelistet.

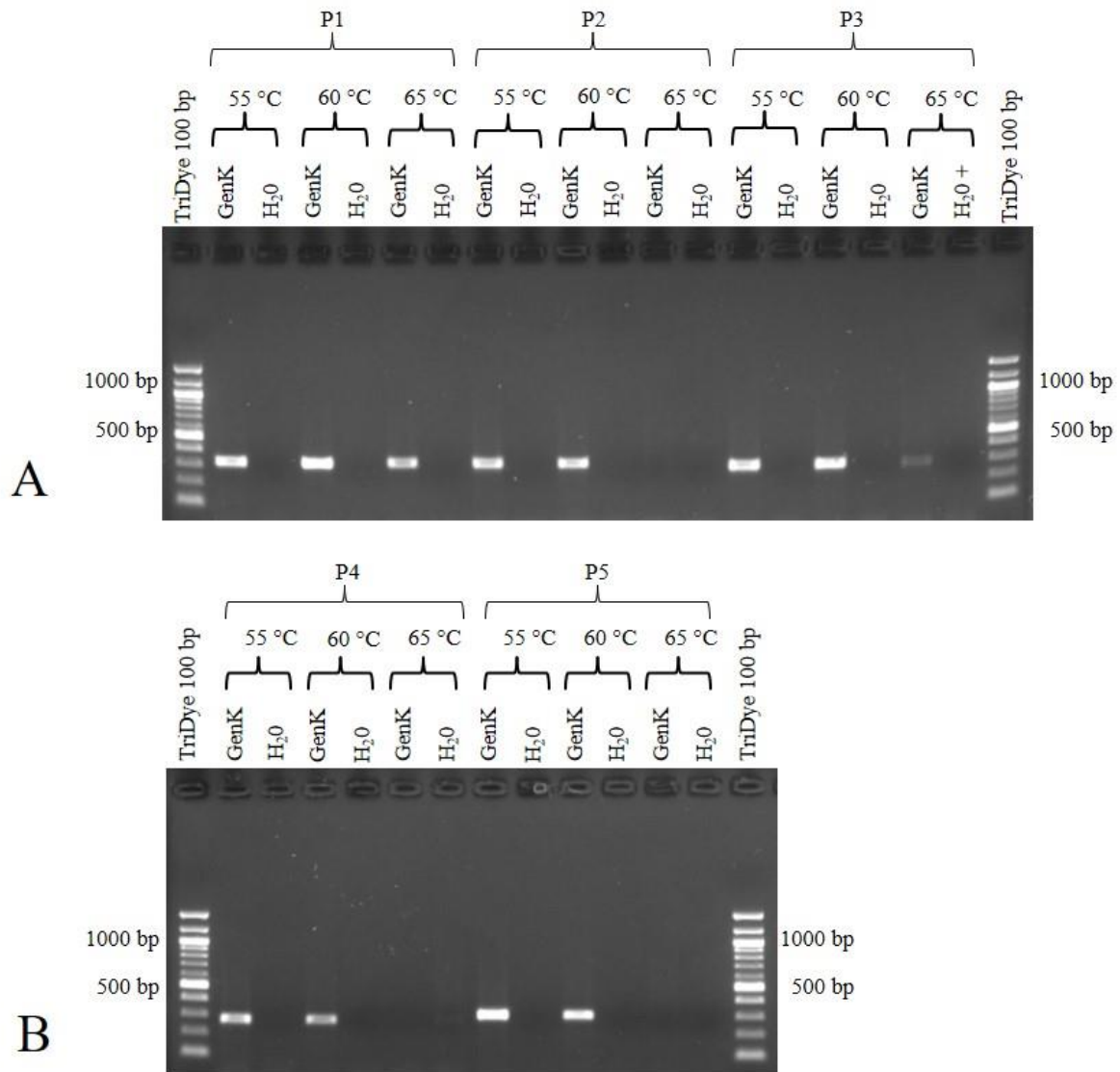


Abb. 13 Optimierung der PCR-Bedingungen. Verwendung genomischer DNA (GenK) mit den jeweiligen Primerpaaren (P) bei verschiedenen Annealing-Temperaturen (55 °C, 60 °C, 65°C). A: Agarosegel mit den Primerpaaren P1 (11849/11850), P2 (11858/11859), P3 (11855/11856). Für jedes Primerpaar funktionierte mindestens eine PCR (Bande sichtbar). Die Negativkontrollen zeigten keine Banden (Amplifikation fand nicht statt). B: Agarosegel mit den Primerpaaren P4 (11861/11862), P5 (11864/11865). Für jedes Primerpaar funktionierte mindestens eine PCR (Bande sichtbar). Die Negativkontrollen zeigten keine Banden (Amplifikation fand nicht statt).

3.2 Validierung der durch NGS gefundenen Mutationen

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden mittels NGS bei 18 Patienten mit der Diagnose eines AIS Mutationen im AR-Gen ermittelt. Die NGS-Methode wurde zunächst mit einem HaloPlex Panel durchgeführt. Dabei umfasste das Panel eine 200 kb große Region des AR-Lokus, welche alle kodierenden Bereiche sowie 5' und 3' untranslatierten Regionen und einen großen Teil intronischer, flussaufwärts und flussabwärts liegender Regionen des AR beinhaltete. Des Weiteren wurden u. a. bei drei Patienten (zwei mit klinischem PAIS, einem mit klinischem

CAIS), die keine Mutation in den exonischen Bereichen des AR-Gens aufwiesen, durch NGS Mutationen in anderen Genen gefunden. Hierbei wurden die Mutation durch Verwendung des TruSight One Sequencing Panels, mit welchem insgesamt über 4800 Gene untersucht werden konnten, ermittelt. Diese Mutationen lagen in Genen, deren Funktionen mit dem AR oder mit der Synthese und Wirkung von Androgenen in der Literatur assoziiert wurden. Eine Auflistung dieser Gene findet sich in Tab. 4. Da all diese Mutationen per NGS erhoben wurden, sollte eine Validierung mittels einer konventionellen Methode, der Sanger-Sequenzierung, erfolgen.

Tab. 4 Mittels TruSight One Sequencing Panel ermittelte Mutationen

Gen	Information
KPNA1	Importin α -Familie
	Beteiligung am nukleären Import von Proteinen
CHD7	= Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 7
	Assoziation u. a. mit Hypogonadotropen Hypogonadismus (mit/ohne Anosmie)
RAB3GAP2	Beteiligung von RAB3-Proteinfamilie an Exozytose von Neurotransmittern und Hormonen
CYP4F12	Cytochrom P450-Familie
	Beteiligung an multiplen Reaktionen (u. a. Synthese von Cholesterol, Steroiden und. weiteren. Lipiden)
ZNF335	= Zinc Finger Protein 335
	Enhancer von Transkriptionsaktivität ligandengebundener nukleärer Hormonrezeptoren
	Assoziation u. a. mit dem Signalweg des aktivierten PKN1, welcher die Transkription von AR regulierten Gene stimuliert

Quelle: www.genecards.org (Stand 19.Juni 2017)

3.2.1 Auswertung der PCR mit einer Agarose-Gelelektrophorese

Bevor die Patienten-DNA sequenziert werden konnte, musste diese, wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, mit der PCR amplifiziert werden. Mit einer Gel-Elektrophorese wurde eine erfolgreiche Amplifikation überprüft. In den Absätzen 7.4 und 7.5 im Anhang sind hierzu die Bilder der Agarosegele aufgeführt. In Abb. 28 sind die Proben, die sich auf die Mutationen im AR-Gen beziehen, dargestellt. Außer der PCR von Pat.4 mit Exon 4 (weitere Informationen hierzu in Abschnitt 3.2.2.1) wurde jede Probe mit Patienten-DNA amplifiziert, was durch das Vorhandensein einer Bande mit der erwarteten molekularen Größe sichtbar wurde. Abb. 29 zeigt die Ergebnisse der Proben bezüglich der Mutationen außerhalb des AR-Gens. Auch hier waren deutliche Banden mit dem erwarteten molekularen Gewicht für jede Probe mit Patienten-DNA erkennbar. Für alle Primerpaare wurden jeweils Negativkontrollen ohne Zugabe von

DNA angefertigt, welche in allen Elektrophoresen keine Banden zeigten, da keine Amplifikation stattgefunden hatte.

3.2.2 Auswertung der Sanger-Sequenzierung

Nach Kontrolle des PCR-Erfolgs und anschließender Aufreinigung der Produkte wurde die Sequenzierungsreaktion gestartet und die aufgereinigten Produkte durch den Genomic Analyzer analysiert. Um die Mutationen ausfindig zu machen, wurden die ermittelten Sequenzen mit der entsprechenden anerkannten DNA-Sequenz aus der Sequenzdatenbank (GRCh37/hg19) verglichen.

3.2.2.1 Mutationen im AR-Gen

Alle im NGS-Panel gefundenen AR-Mutationen konnten per Sanger-Sequenzierung validiert werden. Abschnitt 7.9 im Anhang zeigt die Ausschnitte der Elektropherogramme der validierten AR-Mutationen mit der dazugehörigen Wildtypsequenz zum direkten Vergleich. Beispielhaft sind anhand von Pat.7 die Daten der Mutationsanalyse mit NGS und die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung gegenübergestellt (s. Abb. 30 im Anhang). In der Mutationsanalyse durch NGS wurde auf dem Chromosom X an Position 66765397 im Exon 1 Segment 2 des AR-Gens eine Mutation mit dem Austausch der Base Guanin durch Thymin (G>T) gefunden. Durch die Analyse dieses DNA-Abschnittes von Pat.7 mittels der Sanger-Sequenzierung konnte diese Mutation G>T erneut nachgewiesen werden. Des Weiteren sind im Anhang weitere Informationen zu den detektierten Mutationen tabellarisch aufgeführt (s. Tab. 21). Bei Pat.4 lag laut der NGS-Ergebnisse eine Deletion ab Intron 3 (X-chromosomale Position: 66912908) vor. In Abb. 14 sind die NGS-Daten von Pat.4 und im Vergleich dazu die NGS-Daten einer Kontrollzelllinie (Kon.2) zu sehen. Es wurde deutlich, dass die Sequenzierung von Pat.4 im Vergleich zu der Kontrolle nicht über den gesamten analysierten AR-Bereich erfolgte. In der Abbildung ist diese Deletion an dem vorzeitigen Abbruch der Peaks zu erkennen. Um dieses Ergebnis zu validieren, wurde die Probe in zwei PCR-Ansätzen amplifiziert, wobei einmal die Primer für das Exon 3 und einmal die Primer für das Exon 4 verwendet wurden. In der Agarose-Gelelektrophorese (s. Abb. 15) wurde deutlich, dass in der PCR eine Amplifizierung des Exon 3 stattgefunden hatte, jedoch nicht für das Exon 4, da hier durch die vorhandene Deletion keine Kettenverlängerung möglich war. Eine Positivkontrolle (Pat.1) zeigte dagegen bei Verwendung der Primer für Exon 4 die erwartete Bande und verdeutlicht damit eine gelungene Amplifikation unter Verwendung dieser Primer. Die Negativkontrollen für die Primer von Exon 3 und Exon 4

wiesen in den Gelelektrophoresen keine Banden auf, da hier keine Amplifikation erfolgen konnte.

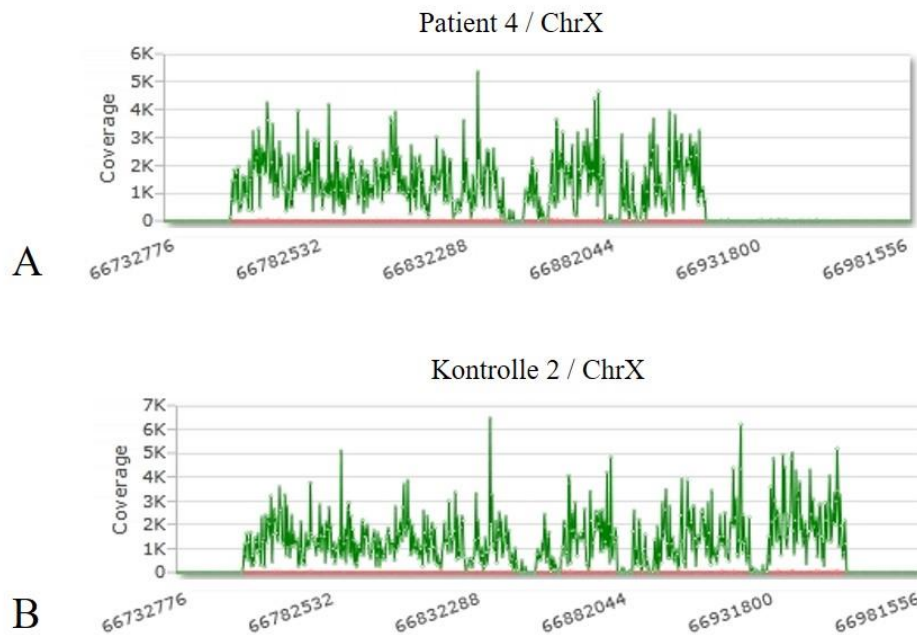


Abb. 14 NGS-Datenauszüge von **Pat.4** und **Kon.2**. A: NGS Daten von **Pat.4**. Gezeigt ist ein Ausschnitt der Region des AR-Gens auf dem Chromosom X (ChrX). Es bestand eine Deletion ab Position 66912908 (Intron 3), was durch den Abbruch der Peaks ab dieser Stelle verdeutlicht war. B: NGS-Daten von **Kon.2**. Gezeigt ist ein Ausschnitt der Region des AR-Gens auf dem Chromosom X (ChrX). Es bestand keine Mutation, sodass die Peaks nicht vorzeitig im Diagramm abbrechen.

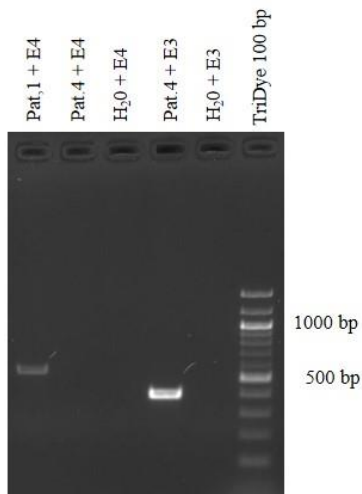


Abb. 15 Agarose-Gelelektrophorese zur Validierung der Mutation von **Pat.4**. Verwendung der Primer für Exon(E) 3 und 4 und zusätzlich zugehörigen Negativkontrollen zu beiden Primerpaaren und einer Positivkontrolle (**Pat.1**) zu **E4**. Positivkontrolle zu **E4** zeigte eine Bande (Amplifikation fand statt). Die Probe von **Pat.4** und **E4** zeigte keine Bande (Amplifikation fand nicht statt), wobei die Probe von **Pat.4** und **E3** eine Bande zeigte (Amplifikation fand statt). Alle Negativkontrollen zeigten keine Bande (Amplifikation fand nicht statt). Pat. = Patient.

3.2.2.2 Mutationen außerhalb des AR-Gens

Alle durch das TruSight One Sequencing Panel ermittelten Mutationen außerhalb des AR-Gens konnten durch Sanger-Sequenzierung nachgewiesen werden. Die untersuchten Gene waren KPNA1, CHD7, RAB3GAP2, CYP4F12 sowie ZNF335. Da diese Mutationen in heterozygoter Form vorlagen, waren in den Elektropherogrammen an der Stelle der Mutation jeweils zwei übereinanderliegende Peaks zu erkennen (s. Anhang Abschnitt 7.10).

3.3 Patient 19

Die im Vorfeld zu dieser Arbeit durchgeführte NGS-Mutationsanalyse mit der DNA von Pat.19 konnte keine Mutation im kodierenden Bereich des AR-Gens entdecken. Die weitere Suche nach Mutationen mittels NGS im TruSight One Sequencing Panel lieferte für diesen Patienten u. a. eine homozygote Mutation im Gen für 17-beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 3 (Chromosom 9, Position: 99017146, T>A). Des Weiteren wurden zwei heterozygote Mutationen gefunden, die die Gene von KPNA1 und CHD7 betrafen. Der in der Vorarbeit zu dieser Arbeit durchgeführte ApoD-Assay für diesen Patienten zeigte eine pathologisch geringe ApoD-Induktion unter *serum starvation*. Der genaue Wert betrug eine 1,25-fache Induktion nach DHT-Zugabe, wobei der Cut-Off-Wert bei einer 2,3-fachen Induktion lag (Hornig et al. 2016). Laut den Prädiktionsprogrammen für Aminosäureveränderungen SIFT und PolyPhen ist diese Veränderung durch die Mutation im KPNA1-Gen „*deleterious*“ (schädlich) bzw. „*probably damaging*“ (vermutlich schädlich). Diese Region ist hochkonserviert und nach bisherigem Kenntnisstand wurde dieser *Single Nucleotide Polymorphism* nicht beschrieben.

3.4 Immunfluoreszenz

Eine der beiden relevanten Mutationen von Pat.19 betrifft das KPNA1-Gen, welches sich auf dem Chromosom 3 befindet. Die KPNA-Proteine, auch Karyopherine genannt, gehören zu der Importin α -Familie, welche als Import-Rezeptoren am nukleären Import beteiligt sind (Ni et al. 2013). Um die Lokalisation des AR in der Zelle sowie den nukleären Import bei Pat.19 zu untersuchen, wurden die Immunfluoreszenz-Experimente an dieser mutierten Zellreihe und vergleichend dazu an Kontrollzelllinien durchgeführt und mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Für die quantitative Erfassung wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.2.6.4 beschrieben, ausgewertet. Bei einer dichten roten Fluoreszenz des Zellkerns wurden diese Zellkerne als „positiv“ gezählt und bei Fehlen einer solchen Signalanreicherung als „negativ“.

3.4.1 Auswertung und Beurteilung des Fluoreszenzsignals

Um die Verteilung des AR in den Zellen ohne und mit Hormoninduktion zu analysieren, wurden die Zellen mit EtOH- oder DHT-haltigen Medium inkubiert. Im Vergleich der Präparate mit dem Fluoreszenzmikroskop fiel auf, dass in den DHT-Präparaten bei allen Zelllinien die Mehrheit der Zellkerne stark rot fluoreszierte. Dies signalisiert, dass sich der AR hier vorwiegend im Kern befand. Alle EtOH-Präparate zeigten einen geringeren Anteil an fluoreszierenden Kernen. Beim genauen Vergleich der EtOH-Präparate war jedoch eine Differenz zwischen der Mutante und den Kontrollen erkennbar. In den Präparaten der KPNA1-mutierten Zelllinie waren anteilig mehr Zellen mit einem rot fluoreszierenden Kern als in den Präparaten der Kontrollzellen. Die quantitative Auswertung zeigte, dass 33% der betrachteten Zellkerne der Mutante ein positives Kernsignal aufwiesen. Hingegen waren es in den EtOH-Präparaten der Kontrollzelllinien 2 bis 16% (s. Tab. 5). In Abb. 16 sind die absoluten Werte der quantitativen Erfassung grafisch dargestellt.

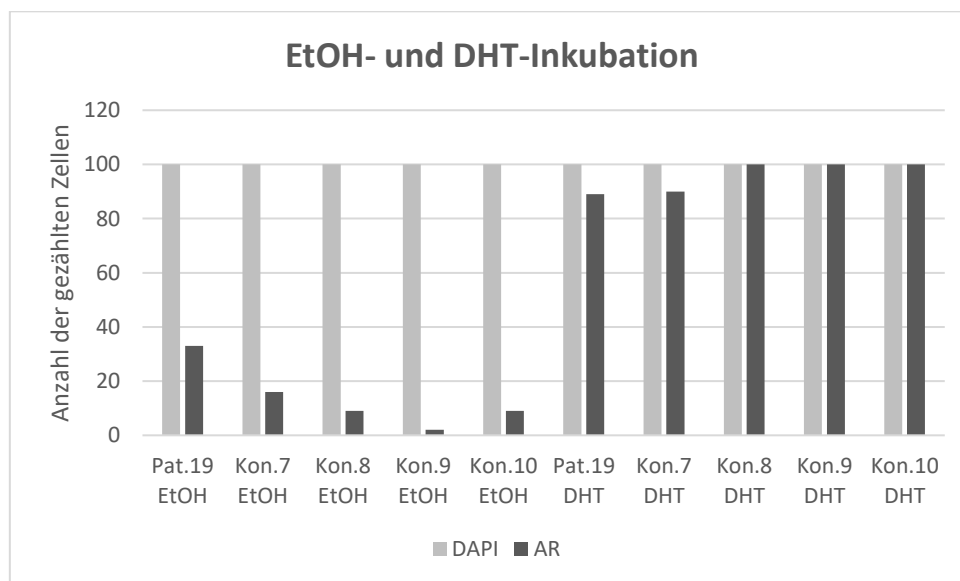


Abb. 16 Grafische Darstellung der ausgewerteten Zellkerne nach ihrem AR-Signal. Betrachtet wurden Zellkulturen, die zuvor mit EtOH oder DHT behandelt worden waren. Zu sehen sind die in der DAPI-Darstellung gezählten Zellen eines Präparates (hell) und die von diesen Zellen als AR-positiv bewerteten Zellkerne (dunkel), $n = 1$. Die Kontrollzelllinien zeigten bei EtOH-Inkubation mehrheitlich keine Signalanreicherung der Zellkerne. In der AR-Darstellung waren die Kerne nicht abgrenzbar und wurden nicht als positiv gezählt. Die Indexzelllinie zeigte bei EtOH-Behandlung eine vermehrte Signalanreicherung der Zellkerne im Vergleich zu den Kontrollen. Bei DHT-Inkubation zeigten die Indexzelllinie sowie die Kontrollzelllinien bei allen ausgewerteten Zellen eine mehrheitliche AR-Signalanreicherung im Kern, sodass in der AR-Darstellung alle betrachteten Zellkerne als positiv gezählt wurden. DHT = Dihydrotestosteron, EtOH = Ethanol, Kon. = Kontrolle, Pat. = Patient.

Tab. 5 *Quantitative Auswertung des ersten Immunfluoreszenz-Experimentes durch Bewertung der Zellkerne nach ihrem AR-Signal.*

Zelllinie	Präparat	Anteil mit positivem Kernsignal	Zelllinie	Präparat	Anteil mit positivem Kernsignal
Pat.19	EtOH	33%	Pat.19	DHT	89%
Kon.7	EtOH	16%	Kon.7	DHT	90%
Kon.8	EtOH	9%	Kon.8	DHT	100%
Kon.9	EtOH	2%	Kon.9	DHT	100%
Kon.10	EtOH	9%	Kon.10	DHT	100%

EtOH = Ethanol, DHT = Dihydrotestosteron, Kon. = Kontrolle, Pat. = Patient.

3.4.2 Optimierung einzelner Parameter bei der Experimentdurchführung

Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurden weitere Experimente unter den Bedingungen, wie sie in Abschnitt 2.2.6.4 beschrieben wurden, durchgeführt. Die Auswertung dieser Versuchsdurchgänge war aufgrund eines starken Hintergrundsignals, des Fehlens des Fluoreszenzsignals und nahezu gleicher Signalintensitäten aller Präparate nicht möglich. Um genauere Ergebnisse zu erzielen und damit eine Auswertung der Experimente zu erreichen, wurden verschiedene Parameter in der Experimentdurchführung variiert. Diese Parameter waren einerseits das Verwenden zweier Antikörperlösungen (Lösung 1 und 2, s. Abb. 17 und Abb. 18). Zum anderen wurden zwei Techniken, diese Lösungen aufzutragen, verglichen (Auftropfen und die Feuchte Kammer, s. Abb. 17 und Abb. 18). Die verschiedenen Präparate wurden anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und miteinander verglichen, um so auf optimale Experimentbedingungen schließen zu können. Die genaue Durchführung wurde im Methodenteil in Abb. 10 beschrieben. Die Abb. 17 und Abb. 18 zeigen die repräsentativen Aufnahmen mit jeweils einem Bild in der blauen DAPI-Darstellung, welche die Zellkerne zeigt, und das dazugehörige Bild in der rot fluoreszierenden AR-Darstellung pro untersuchtem Präparat. Des Weiteren sind die Aufnahmen der EtOH-Präparate denen der DHT-Präparate gegenübergestellt. Die Präparate zeigten in den Bildern 3 und 4 aus Abb. 17 und in Bild 2 aus Abb. 18 in der AR-Darstellung ein diffuses Hintergrundsignal, welches sich als verstärkte rote Färbung der Zellzwischenräume darstellt. Dieses Hintergrundsignal wurde demnach in Präparaten stärker beobachtet, wenn in diesen die Antikörperlösung mittels der feuchten Kammer auf die Zellen aufgetragen worden war. Daher sollte fortan die Transferpipette zum Auftragen der Antikörperlösung genutzt werden. Ein solches Hintergrundsignal war ebenfalls bei Präparaten, welche mit der frischeren Antikörperlösung 2

behandelt worden waren, geringer ausgeprägt, sodass eine bessere Differenzierung zwischen den EtOH- und DHT-Präparaten möglich war. Daher wurde Antikörperlösung 2 für die anschließenden Experimente ausgewählt.

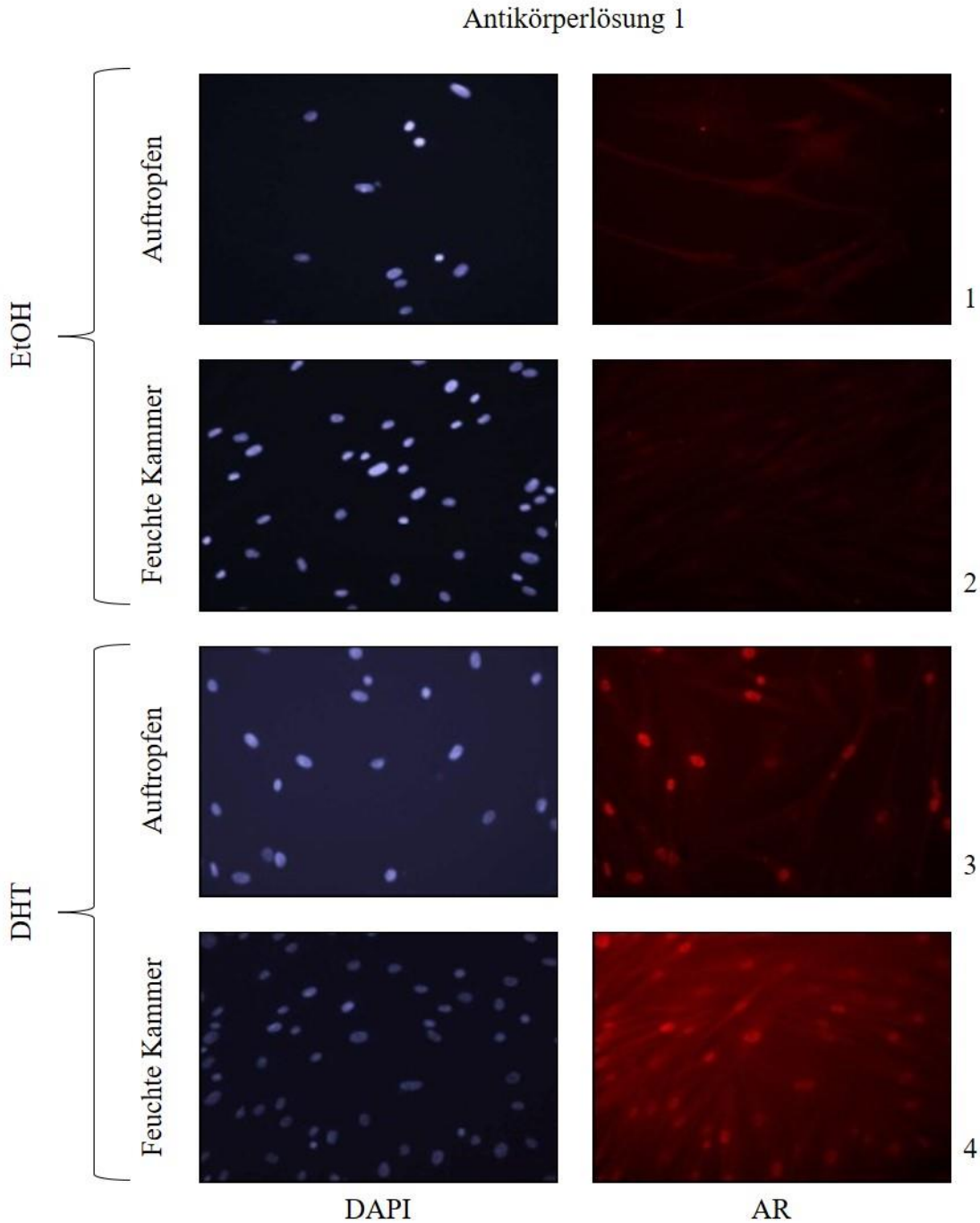


Abb. 17 Repräsentative Präparatausschnitte des Optimierungsversuches. Dargestellt sind die DAPI- sowie die korrespondierenden AR-Darstellungen der Präparate. Auf mit EtOH- oder DHT-inkubierte Zellen wurde die Antikörperlösung 1 angewendet, entweder durch Auftropfen auf das Präparat oder durch Auftragen in der feuchten Kammer. Die Bilder der AR-Darstellung wurden nummeriert (1-4). Bild 3 und 4 zeigten ein verstärktes Hintergrundsignal im Vergleich zu Bild 1 und 2. DHT = Dihydrotestosteron, EtOH = Ethanol.

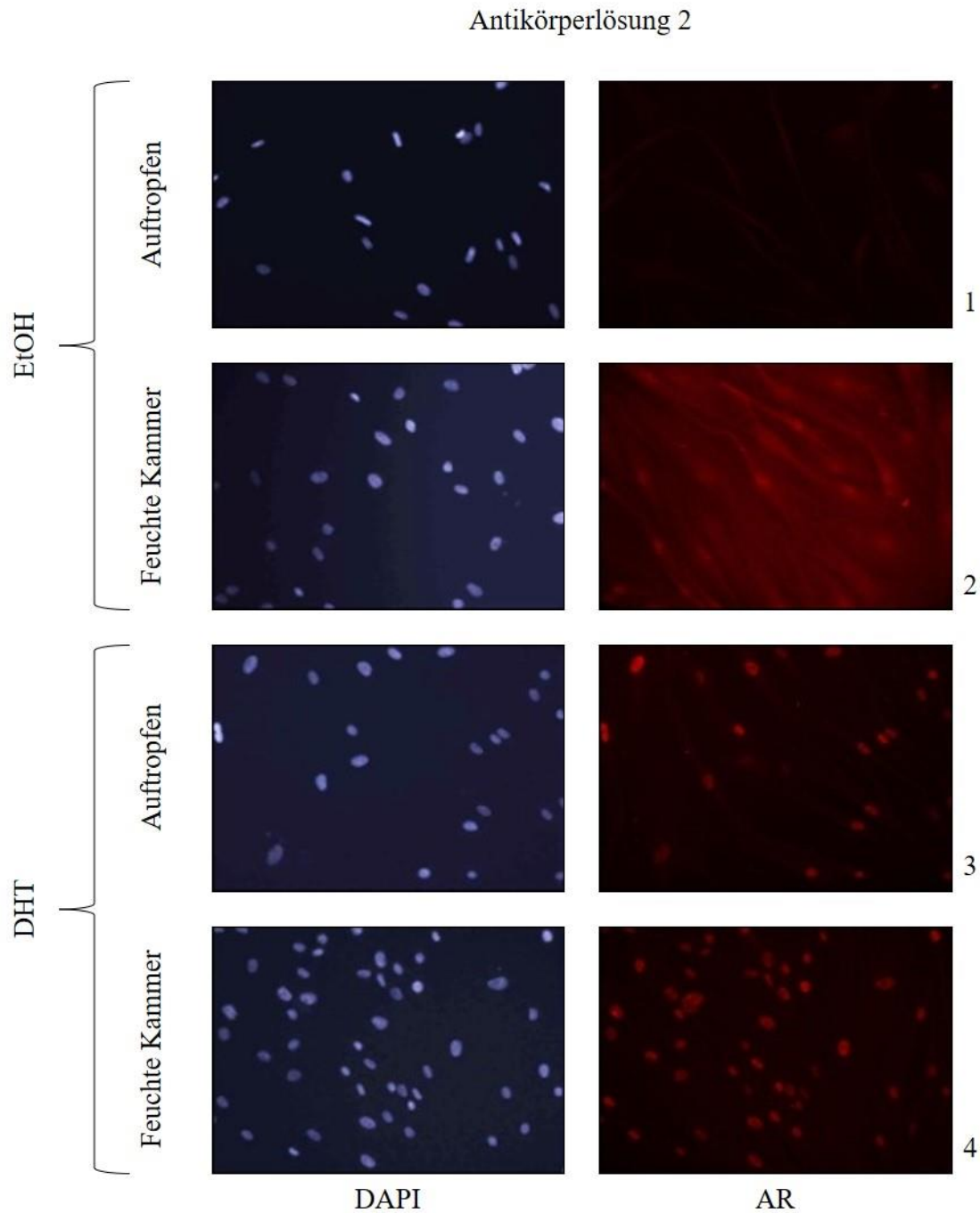


Abb. 18 **Repräsentative Präparatausschnitte des Optimierungsversuches.** Dargestellt sind die DAPI- sowie die korrespondierenden AR-Darstellungen der Präparate. Auf mit EtOH- oder DHT-inkubierte Zellen wurde die Antikörperlösung 2 angewendet, entweder durch Auftropfen auf das Präparat oder durch Auftragen in der feuchten Kammer. Die Bilder der AR-Darstellung wurden nummeriert (1-4). Bild 2 zeigte ein verstärktes Hintergrundsignal im Vergleich zu den Bildern 1, 3 und 4. DHT = Dihydrotestosteron, EtOH = Ethanol.

3.4.3 Experiment mit angepassten Bedingungen

Um die optimierten Experimentbedingungen zu verifizieren, wurde das folgende Experiment durchgeführt. Hierbei wurde die Antikörperlösung mittels Transferpipette aufgetragen, jedoch wurde versehentlich die Antikörperlösung 1 verwendet. Durch diese fehlerhafte Auswahl der

Antikörperlösung ist die Aussagekraft dieses Experimentes eingeschränkt. In der Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich, dass das AR-Signal der Zellkerne in den EtOH- und DHT-Präparaten der Pat.19-Zelllinie schwach war (s. Abb. 19). Das bedeutet, dass nach Hormoninkubation der Zellen keine vermehrte Anreicherung des AR im Nukleus stattgefunden hatte. Bei den Kontroll-Zelllinien war jedoch ein Unterschied zwischen den Präparaten mit und ohne Hormoninkubation zu erkennen. In den EtOH-Präparaten zeigte sich ein geringerer AR-Anteil im Nukleus, im Gegensatz zu den DHT-Präparaten, in welchen eine dichte Signalanreicherung der Nuklei zu erkennen war. Hierdurch wurde deutlich, dass durch Hormoninkubation, die Translokation des AR in den Nukleus stattgefunden hatte

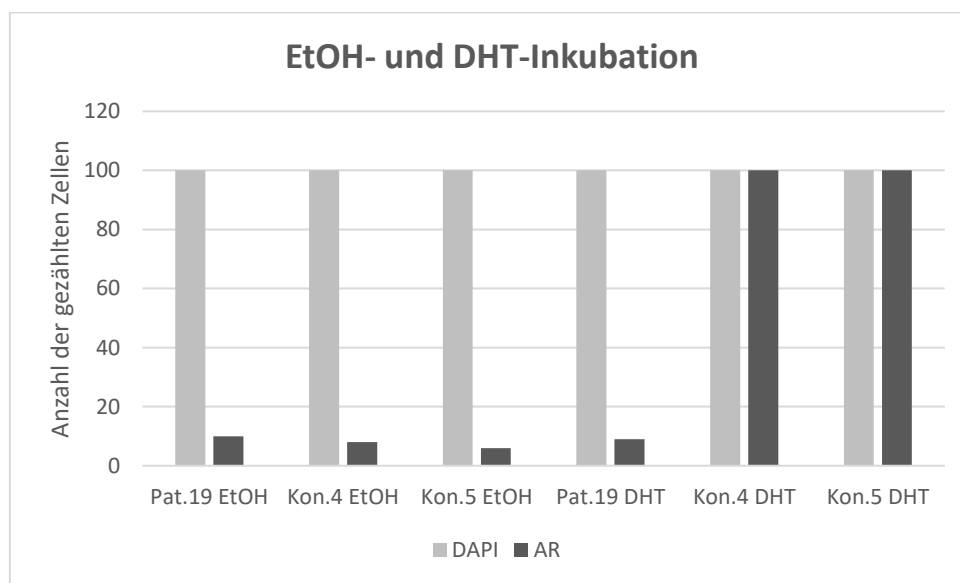


Abb. 19 Quantitativen Auswertung des Immunfluoreszenz-Experimentes mit EtOH- und DHT-behandelten Zellen. Ausgewertet wurden die in der DAPI-Darstellung gezählten Zellen eines Präparates (hell) und die von diesen Zellen als AR-positiv bewerteten Zellkerne (dunkel), $n = 1$. Die Kontrollzelllinien zeigen bei EtOH-Inkubation mehrheitlich keine Signalanreicherung der Zellkerne. In der AR-Darstellung waren die Kerne nicht abgrenzbar und wurden nicht als positiv gezählt. Bei DHT-Inkubation zeigten die Kontrollzelllinien bei allen ausgewerteten Zellen eine Signalanreicherung im Kern, sodass in der AR-Darstellung alle betrachteten Zellkerne als positiv gewertet wurden. Die Indexzelllinie zeigte bei EtOH- und DHT-Behandlung keine mehrheitliche Signalanreicherung der Zellkerne. DHT = Dihydrotestosteron, EtOH = Ethanol, Kon. = Kontrolle, Pat. = Patient.

3.4.4 Spezifizierung der Bewertung des Fluoreszenzsignals

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der angestrebten genauen Einteilung der Zellen nach Signalstärke, wurde eine Abstufung der Signalintensität in vier Stufen für die Auswertung der Präparate erstellt (Abb. 20).

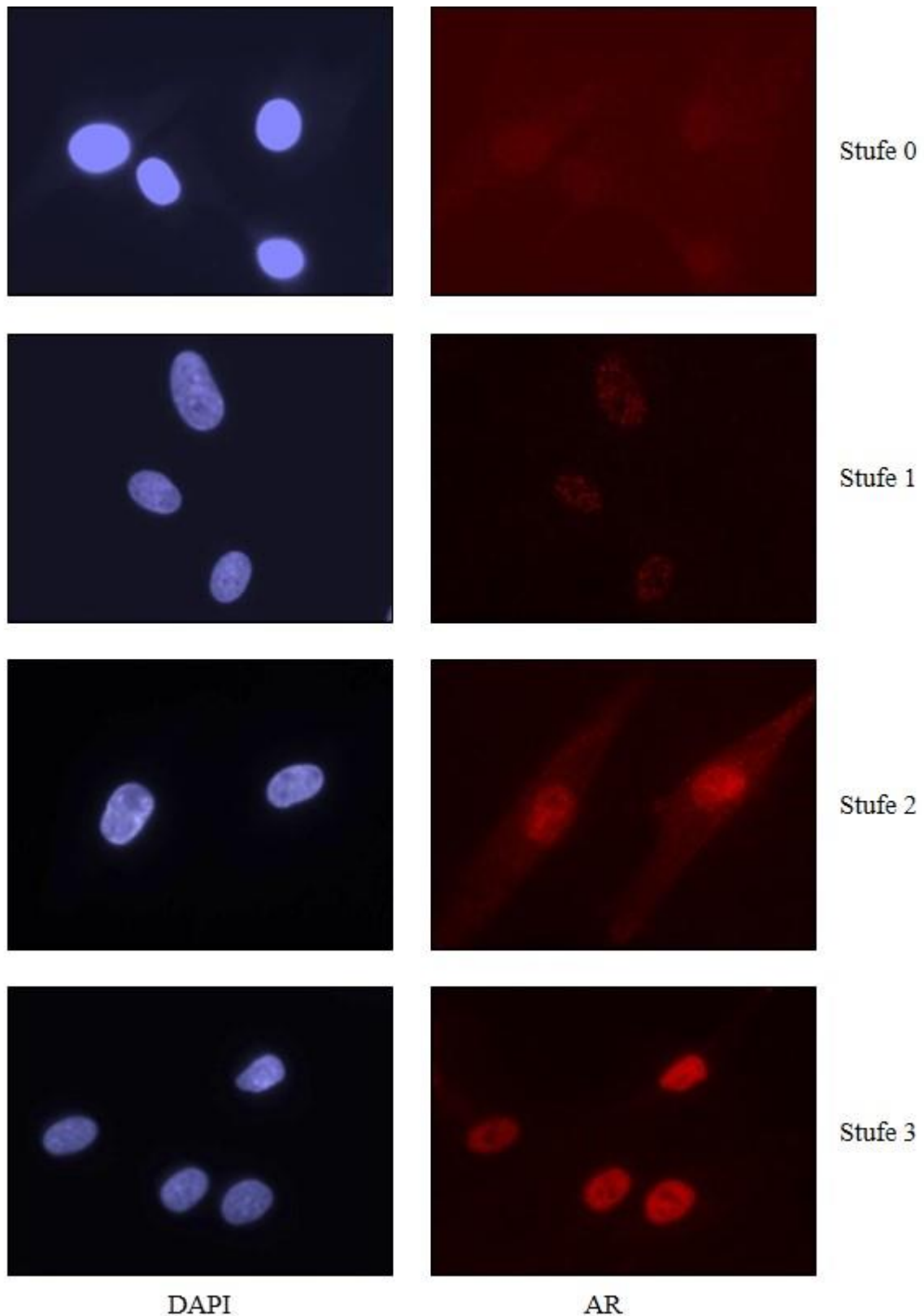


Abb. 20 Einteilung des AR-Signals im Nucleus. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der jeweiligen Intensitätsstufen Stufen 0 bis 3 in der DAPI- sowie der roten AR-Darstellung. 0: keine Signalanreicherung, 1: leichte Signalanreicherung, 2: deutliche Signalanreicherung, ohne exakte scharfe Abgrenzung des Kerns, 3: starke Signalanreicherung im Kern mit scharfkantiger Abgrenzung desselben zum Zellplasma.

Dabei markierte Stufe 0 die nahezu fehlende Anreicherung von Fluoreszenzfarbstoff im Nukleus. Lediglich eine zarte Verdichtung war sichtbar, welche jedoch auch durch Überlagerung des Zytoplasmas über und unter dem Kern entstanden sein konnte. Zellen der Stufe 1 zeigten eine leichte Signalverstärkung im Nukleus, aber so, dass dieser keineswegs scharf zum Zytoplasma hätte abgegrenzt werden können. Bei Stufe 2 fand sich eine deutliche Signalanhebung im Kern, sodass sich dieser auf den ersten Blick gut vom Rest der Zelle abhob, jedoch war auch hier keine scharfe Abgrenzung möglich. Anders war es bei Stufe 3, wo die Signalstärke des Zellkerns eine deutliche und ebenso scharfkantige Trennung vom Zellplasma erlaubte. Anhand dieser Einteilung wurden in den Präparaten jeweils 100 Zellkerne in der DAPI-Darstellung ausgezählt. Anschließend wurden diese in der roten AR-Darstellung nach der Signalanreicherung der Nuklei eingestuft.

3.4.5 Auswertung der Experimente mit einer abgestuften Signal-Einteilung

Durch die Anwendung der Signalstufen von 0 bis 3 konnten die folgenden Experimente ausgewertet werden. Das Diagramm in Abb. 21 zeigt hierzu die quantitative Erfassung (Mittelwerte sowie die Standardabweichung) des AR-Signals der Präparate von Pat.19 und der Präparate einer Kontrolle (Kon.5) aus 3 Experimenten. Die Durchführung der Experimente unterschied sich dahingehend, dass im Experiment 1 eine Inkubation der EtOH- bzw. DHT-Lösungen für 48 h stattgefunden hatte, in den Experimenten 2 und 3 für 72 h. In den EtOH-Präparaten waren im Vergleich zu den DHT-Präparaten weniger fluoreszierende Zellkerne sichtbar, die der Signalstufe 2 oder 3 zugeordnet werden konnten. Bei der Auswertung der EtOH-Präparate beider Zelllinien war ein weiterer Unterschied erkennbar. Durchschnittlich 73% der Zellkerne der mit EtOH behandelten Zellen von Pat.19 ließen sich der Stufe 2 und 3 zuordnen. Bei den EtOH-Präparaten der Kontrollzelllinien war dieser Anteil geringer (3% im Mittel). Die DHT-Präparate aller Zelllinien hoben sich in ihrer AR-Kernsignal eindeutig von den EtOH-Präparaten ab. Der Anteil der Zellkerne mit einer Signalintensität von mindestens Stufe 2 war in den DHT-Präparaten der Mutante und der Kontroll-Zelllinie fast gleich stark ausgeprägt (s. Abb. 21). Der AR war demnach nach der Hormoninkubation bei beiden Zelllinien vermehrt im Nukleus lokalisiert. Im t-Test wurde die Signifikanz der Unterschiede zwischen Pat.19 und Kon.5 für jede einzelne Signalstufe ermittelt. Die errechneten p-Werte sind in der Tab. 6 aufgeführt. Eine statistische Signifikanz ergab sich bei dem Vergleich der EtOH-Präparate der Mutante und der Kontrolle in den Signalstufen 1 und 2 (s. Tab. 6). Keine statistische Signifikanz zeigte sich in den DHT-Präparaten für alle Farbstufen. Hier waren die Präparate der Patienten- und Kontrollzelllinie sehr ähnlich in der AR-Signalstärke.

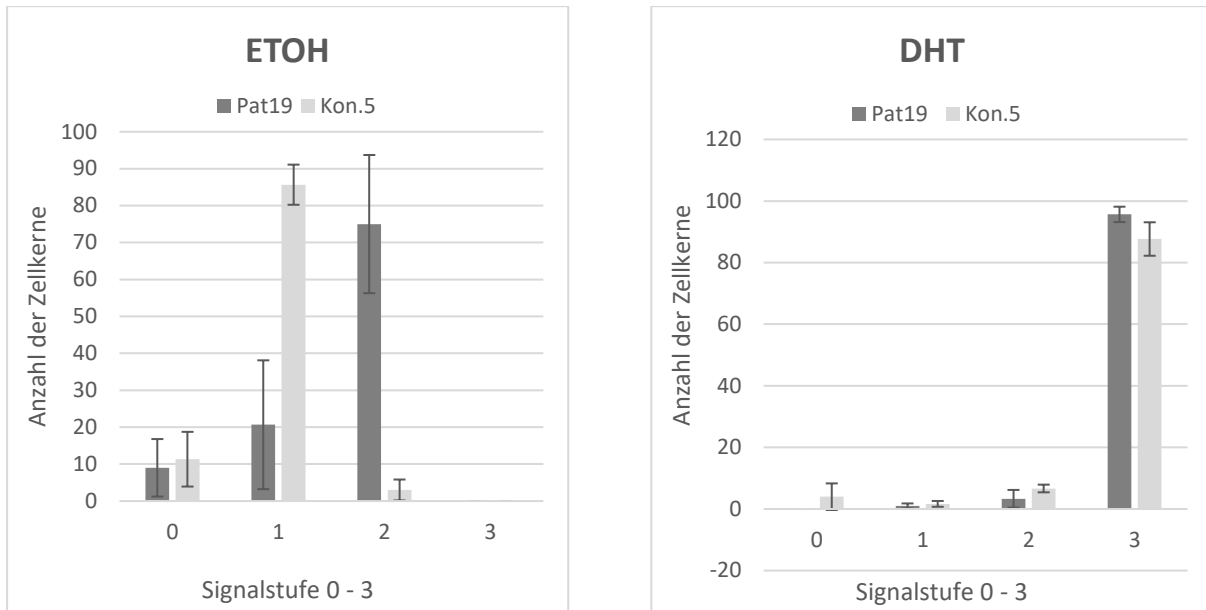


Abb. 21 **Auswertung der AR-Kernsignale in EtOH- und DHT behandelten Zellen.** Zu sehen ist die Auswertung von drei Experimenten ($n = 3$) mit Zellen von Pat.19 (dunkel) und Kon.5 (hell), bei welchen die AR-Signalstärke der Zellkerne in Signalstufen 0-3 eingeteilt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen. Im Vergleich der EtOH- und DHT-Präparate wurde deutlich, dass für beide Zelllinien in den DHT-Präparaten anteilig mehr Zellkerne mindestens der Signalstufe 2 zugeordnet wurden. Beim Vergleich der EtOH-Präparate wurde deutlich, dass Pat.19 einen größeren Anteil an Zellkernen aufwies, die mindestens Signalstufe 2 zugeordnet wurden. DHT = Dihydrotestosteron, EtOH = Ethanol, Kon. = Kontrolle, Pat. = Patient.

Tab. 6 **Berechnung der Signifikanz (t-Test) zwischen den AR-Signalen der Präparate von Pat.19 und Kon.5 in den unterschiedlichen Signalstufen.**

Signalstufe		0	1	2	3
EtOH	p-Wert	0,7741829	0,007326	0,0057627	n. b.
DHT	p-Wert	0,2605745	0,491767	0,2061513	0,1315

DHT = Dihydrotestosteron, EtOH = Ethanol, n. b. = nicht berechenbar.

3.4.6 Kultivierung der Zellen mit 0,1% FBS, DCC-haltigem Medium für 72 h

Da die Zellen der Mutante und der Kontrollen ohne Zugabe von Hormon, also unter EtOH-Behandlung, eine gewisse AR-Signalanreicherung zeigten, sollte untersucht werden, wie sich die Lokalisation des AR in der Zelle verhält, wenn die Fibroblasten zuvor unter nährstoffarmen, hormonfreien Bedingungen kultiviert wurden. Dazu wurden die Zellen mit 0,1% FBS (*serum starvation*), DCC-haltigem Medium inkubiert. Auf die Hormoninduktion mit DHT wurde verzichtet, da diese keine signifikanten Unterschiede zwischen der Mutante und den Kontrollzellen zeigte. Durch die Behandlung mit 0,1% FBS, DCC für einen längeren Zeitraum (72 h) sollte sichergestellt werden, dass sich am Tag der Antikörperbehandlung für die Fluoreszenzdarstellung kein Hormon mehr im Inkubationsmedium befand. Unter diesen

Experimentbedingungen, welche in der Tab. 3 im Abschnitt 2.2.6.6 in der letzten Spalte aufgelistet sind, wurde ein Unterschied zwischen den Patientenzellen zu den Kontrollzellen deutlich. Die Präparate von Pat.19 zeigten mehr Zellen (73%), deren Kern mit mindestens Signalstufe 2 fluoreszierte. Die Anteile der Kontrollzelllinien lag hier für Kon.5 bei 45% und für Kon.6 bei 51%. Um eine Variabilität in dem Ergebnis aufzudecken, wurde dieses Experiment im Triplikat wiederholt. Es wurden pro Zelllinie in 3 Präparaten je etwa 100 Zellkerne ausgewertet. Anschließend wurden pro Signalstufe die Mittelwerte für jede Zelllinie gebildet. Des Weiteren wurde die Standardabweichung ermittelt. Die Werte sind im Diagramm in Abb. 22 grafisch veranschaulicht.

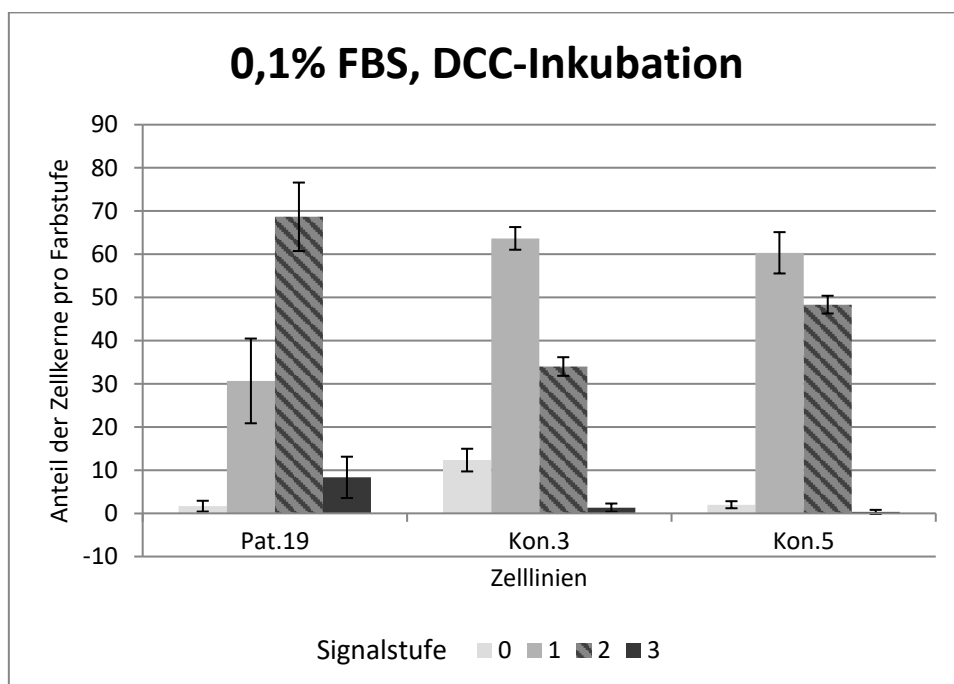


Abb. 22 Auswertung der AR-Kernsignale in mit 0,1% FBS, DCC-inkubierten Zellen. Zu sehen ist die grafische Darstellung der Mittelwerte und den zugehörigen Standardabweichungen aus der quantitativen Auswertung der Präparate (Triplikat). Die Signalstufen sind in Graustufen verdeutlicht. Pat.19 zeigte mehr Zellen mit mindestens Stufe 2 im Vergleich zu den Kontrollen. Kon. = Kontrolle, Pat. = Patient.

Es erfolgte ebenso eine Berechnung der p-Werte für jede Signalstufe, um eine statistische Signifikanz der Signalunterschiede zwischen der mutierten Zelllinie zu den Kontrollzelllinien zu ermitteln (s. Tab. 7). Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Signalintensitäten 0, 1 und 2 zwischen Pat.19 und Kon.3, jedoch nicht in der Stufe 3. Der Vergleich der AR-Signale zwischen Pat.19 und Kon.5 ergab einen signifikanten Unterschied für die Signalstufen 1 und 2, dagegen zeigte sich keine Signifikanz für Signalstufen 0 und 3.

Tab. 7 Berechnung der Signifikanz (t-Test) zwischen den AR-Signalen von Pat.19, Kon.3 und Kon.5 in den verschiedenen Signalstufen.

Zelllinien	0	1	2	3
Pat.19/Kon.3	0,006556152	0,010061489	0,003967113	0,112193978
Pat.19/Kon.5	0,767643915	0,018393202	0,024668439	0,078224885

Kon. = Kontrolle, Pat. = Patient.

Um die Einteilung des AR-Signals in Signalstufen in der Auswertung zu validieren, wurden diese Präparate durch einen anderen Untersucher ausgewertet. Dem zweiten Untersucher war nicht bekannt, zu welcher Zelllinie das jeweilige Präparat gehörte. Der Auswertung von Untersucher 1 wurde den Ergebnissen von Untersucher 2 gegenübergestellt (s. Abb. 23).

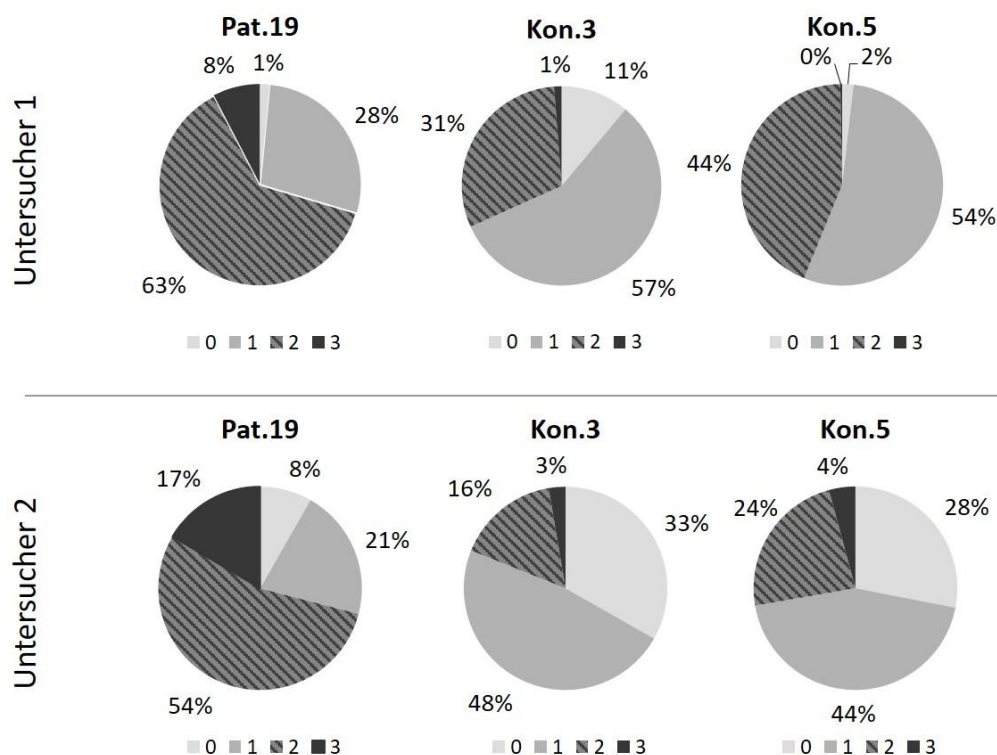


Abb. 23 Gegenüberstellung der Auswertung von Untersucher 1 und Untersucher 2. Ausgewertet wurden Präparate von Pat.19 und zwei Kontrollen (Kon.3, Kon.5), deren Zellen für 72 h mit 0,1% FBS, DCC-haltigem Medium bebrütet worden waren. Die Auswertung ist im Kreisdiagramm dargestellt, wobei die Signalstufen in Graustufen abgebildet sind. Die Auswertung beider Untersucher lässt die Unterschiede der Signalstärken zwischen der Mutante und den Kontrollen deutlich werden. Die Mutante hatte bei beiden Untersuchern einen höheren Anteil an Zellen mit mindestens Signalstufe 2 im Vergleich zu den Kontrollen. Kon. = Kontrolle, Pat = Patient.

Dabei fiel auf, dass die Auswertung für die mutierte Zelllinie keinen signifikanten Unterschied zwischen den Untersuchern aufwies. In beiden Auswertungen zeigte sich, dass die Mutante einen höheren prozentualen Anteil an Zellkernen hatte, welche in Signalstufe 2 oder höher eingeordnet worden waren. Des Weiteren war auch in der Auswertung des zweiten

Untersuchers eine Differenz zwischen Mutante und Kontrollen erkennbar. Auch hier wurde deutlich, dass die Kontrollen anteilig mehr schwächer fluoreszierende Zellen zeigten. Somit konnte die bisherige Präparatauswertung durch Untersucher 1 durch die Kontrollauswertung durch Untersucher 2 validiert werden.

3.5 Western Blot

Um die Ergebnisse aus den Immunfluoreszenz-Experimenten mit einer anderen unabhängigen Methode zu validieren, wurden die Proteine der mutierten Zelllinie sowie der Kontrollzelllinien mittels Western Blot untersucht.

3.5.1 Analyse von Proteinen aus mit EtOH bzw. DHT-behandelten Zellkulturen

Ziel dieses Experimentes war, das AR-Protein quantitativ in der Indexzelle im Vergleich zu den Kontrollzellen zu erfassen. Dabei sollte untersucht werden, ob in der mutierten Zelllinie eine signifikant andere Menge an AR-Protein unter EtOH- und DHT-Inkubation im Vergleich zu den Kontrollen vorhanden ist. Dafür wurden Proteine von drei Kontrollen sowie von Pat.19 im Duplikat untersucht. Durch Behandlung mit Antikörpern wurden die Banden für den AR und für Aktin dargestellt. Aktin ist ein Strukturprotein, welches in allen Zellen des menschlichen Körpers vorkommt (Lüllmann-Rauch 2009), und in diesem Western Blot als Ladekontrolle diente. Die Laufstrecke des AR entsprach dem molekularen Gewicht von etwa 100 kDa, die des Aktins 43 kDa. Der Western Blot hierzu wird in Abb. 24 gezeigt. Alle Zelllinien, unabhängig von der EtOH- und DHT-Behandlung, zeigten eine spezifische Bande für Aktin, welche sich bei allen Proben in ihrer Intensität nahezu gleich darstellten. Bei der Betrachtung der AR-Banden waren jedoch einige Auffälligkeiten erkennbar. So waren die Banden der EtOH-Proben schwächer als die der DHT-Proben. Des Weiteren konnte man erkennen, dass die mit EtOH behandelten Kontrollzelllinien eine schwächere AR-Bande zeigten, als die EtOH-Proben der Mutante. Um diese Unterschiede zu analysieren und quantitativ auswertbar zu machen, wurde die Bildverarbeitungssoftware ImageJ genutzt. Die mit ImageJ ermittelten Pixelwerte der Aktin- und AR-Banden wurden für jede Probe ins Verhältnis gesetzt (AR/Aktin). Diese errechneten Werte sind in dem Diagramm in Abb. 25 dargestellt. Durch die deutlich schwächere AR-Bande in den EtOH-Präparaten der Kontrollzellen ergab sich ein geringerer Wert des Quotienten AR/Aktin. Entsprechend höhere Werte zeigten die EtOH-Präparate von Pat.19, da eine kräftige AR-Bande im Western Blot zu sehen war.

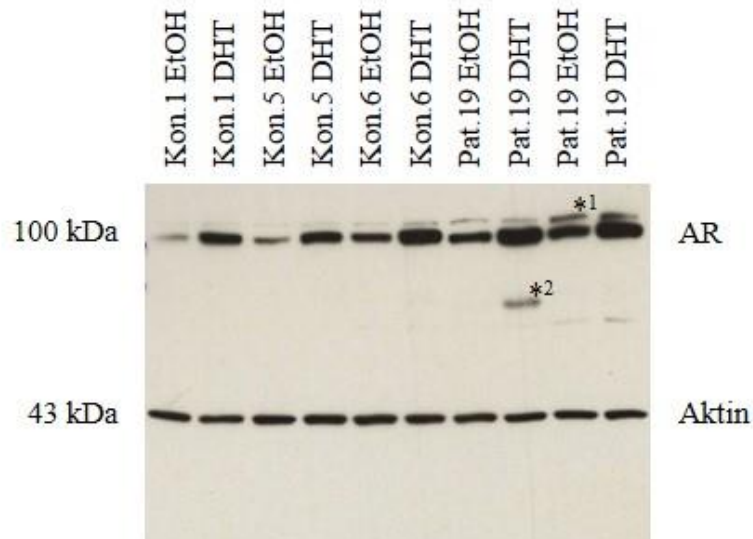


Abb. 24 **Proteinanalyse aus mit EtOH oder DHT behandelten Zellen.** Darstellung des AR und von Aktin durch Antikörper. Die EtOH-Präparate der Kontrollen zeigten eine schwächere AR-Bande als die Mutante. Nach DHT-Behandlung war eine stärkere AR-Bande als nach EtOH-Behandlung für alle Zelllinien sichtbar. Dabei war die Bande der Mutante kräftiger als die der Kontrollen. DHT = Dihydrotestosteron, EtOH = Ethanol, Kon. = Kontrolle, Pat. = Patient, *1 = unspezifische Bande, *2 = Degradationsprodukt des AR.

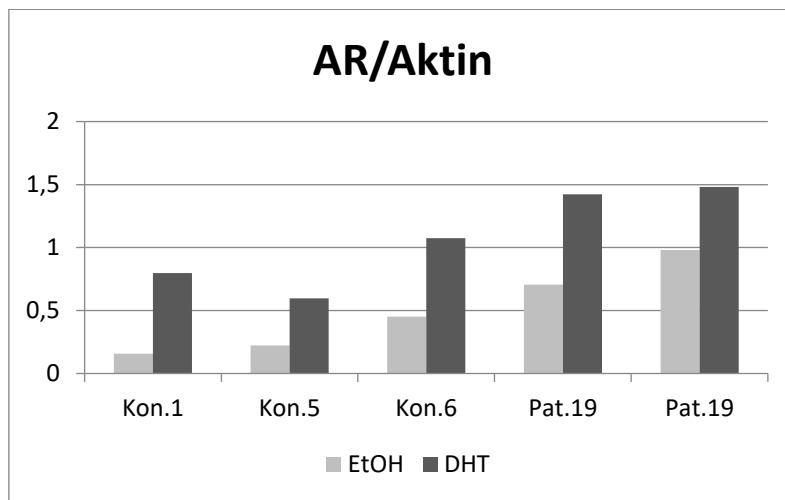


Abb. 25 **Proteinanalyse von mit EtOH- oder DHT-behandelten Zellen.** Dargestellt ist der Quotient AR/Aktin der durch ImageJ ermittelten Werte für die Intensitäten der einzelnen Banden im Western Blot. Die EtOH-Inkubation ist in hellgrau und die DHT-Inkubation in dunkelgrau dargestellt. Nach DHT-Behandlung war ein höherer Pixelwert als nach EtOH-Behandlung für alle Zelllinien erkennbar. Die EtOH-Präparate der Mutante lieferten im Vergleich zu den EtOH-Präparaten der Kontrollen einen höheren Pixelwert. DHT = Dihydrotestosteron, EtOH = Ethanol, Kon. = Kontrolle, Pat. = Patient.

Die DHT-Präparate der Kontrollen ließen die Werte der Quotienten nahe 1 streben, da die AR-Banden ähnlich kräftig wie die Aktin-Banden waren. Im t-Test wurden die Werte der Quotienten AR/Aktin der Kontrollzelllinien mit den Quotienten der Mutante verglichen. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied der EtOH-Kontrollzellen zu der Mutante ($p = 0,04$). Ebenso war ein signifikanter Unterschied der mit DHT behandelten

Kontrollzelllinien zu den Proben der Mutante vorhanden ($p = 0,04$). Des Weiteren wurde der Quotient aus den Werten für EtOH und DHT bestimmt, sodass für jede Zelllinie der Quotient EtOH/DHT berechnet wurde. Dieser Quotient wurde im t-Test zwischen Indexzelle und Kontrollen verglichen. Hierbei ergab sich keine statistische Signifikanz ($p = 0,14$).

3.5.2 Analyse von Proteinen aus mit 0,1% FBS, DCC-kultivierten Zellkulturen

Um zu analysieren, wie sich die Proteine des AR und von KPNA1 hinsichtlich ihrer Quantität und ihrer Lokalisation in der Zelle unter hormonfreien Bedingungen verhalten, wurde eine weitere Proteinanalyse durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen für 72 h in einem hormonfreien, nährstoffarmen Medium (0,1% FBS, DCC) kultiviert. Für die Proteinanalyse im Western Blot wurden die zytoplasmatischen Proteine getrennt von den nukleären Proteinen aus den Zellen extrahiert. Als zytoplasmatisches Markerprotein wurde GAPDH durch Antikörper markiert. Als nukleäres Markerprotein diente YY1. Der AR wurde in den nukleären und in den zytoplasmatischen Proteinextrakten untersucht, um zu ermitteln, wie viel AR-Protein sich im Zytoplasma bzw. im Nukleus der Zellen befindet, wenn diese zuvor unter hormonfreien Bedingungen kultiviert worden waren. Hierbei wurden Unterschiede zwischen Indexzelle und Kontrollzelle vermutet. Das Transportprotein KPNA1, was im Zytoplasma u. a. an den AR bindet und am nukleären Import beteiligt ist, wurde in der zytoplasmatischen Fraktion analysiert (Ni et al. 2013). Hierbei sollte untersucht werden, ob die KPNA1-mutierte Patientenzelllinie eine andere Menge an KPNA1-Protein aufweist als die Kontrolle ohne diese Mutation. Die Abb. 26 zeigt die Banden des Western Blots. GAPDH zeigte sich als zytoplasmatischer Marker durch kräftige Banden im zytoplasmatischen Extrakt und geringfügige Banden im nukleären Extrakt, wodurch dargelegt wurde, dass das nukleäre Extrakt kaum zytoplasmatische Anteile enthielt. Das YY1-Protein wies dagegen ausschließlich in den nukleären Proben deutliche Banden auf, was deutlich machte, dass das zytoplasmatische Extrakt frei von nukleären Anteilen war. Der AR war im zytoplasmatischen Extrakt beider Zelllinien nicht nachweisbar. In den korrespondierenden nukleären Extrakten dagegen waren AR-spezifische Banden zu erkennen. Die AR-Bande der Kon.3-Zelllinie zeigte sich in ihrer Intensität deutlich schwächer als die AR-Bande der Mutante. Das KPNA1-Protein war in der zytoplasmatischen Fraktion der Kontrolle durch eine starke Bande nachweisbar. In der Probe der Mutante zeichnete sich hingegen eine schwächere Bande ab. So wurde in diesem Experiment gezeigt, dass bei der Mutante im Gegensatz zur Kontrolle auch unter hormonfreien Wachstumsbedingungen viel AR-Protein vorhanden war und sich im Nukleus anreicherte. Das

an dem nukleären Transport beteiligte KPNA1-Protein war dagegen bei der mutierten Zelllinie weniger vorhanden als bei den Kontrollzellen.

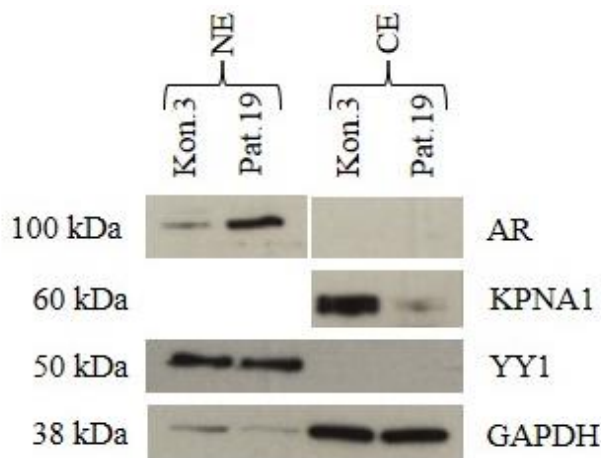


Abb. 26 Proteinanalyse von mit 0,1% FBS, DCC-haltigem Medium inkubierten Zellen. Untersucht wurden die nukleären und zytoplasmatischen Proteine aus Fibroblasten von Pat.19 und Kon.3. In der Abbildung des Western Blots sind die Banden des AR sowie von KPNA1, YY1, GAPDH zu sehen. GAPDH als zytoplasmatischer Marker zeigte eine starke Bande im CE bei beiden Zelllinien. YY1 als nukleärer Marker zeigte bei beiden Zelllinien ausschließlich eine Bande im NE. KPNA1 wurde im NE untersucht und war bei Pat.19 nur wenig vorhanden (schwache Bande). Der AR zeigte in den NE bei Pat.19 eine kräftigere Bande als im NE der Kontrolle. Da die Banden auf mehrere Blots bzw. Membranen verteilt waren, wurden für diese Abbildung Bildausschnitte der jeweiligen Blots verwendet. CE = zytoplasmatisches Extrakt, Kon. = Kontrolle, NE = nukleäres Extrakt, Pat. = Patient.

3.6 Wachstumsanalyse

Durch Beobachten der verschiedenen Zelllinien während der Zellkultur fiel auf, dass die Zellen von Pat.19 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien schneller wuchsen. Um das beschleunigte Wachstum für die mutierte Zelllinie zu untersuchen, wurde wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben eine Wachstumskurve für die Indexzelllinie sowie für eine Kontrollzelllinie (Kon.5) bestimmt. Nach 24 h waren die Zellzahlen der Mutante sowie der Kontrolle nahezu gleich. Nach 48 h waren die Zellen in ihrer Zellzahl bereits unterschiedlich (s. Abb. 27). Obwohl die Zellen beider Zelllinien nach 48 h bereits konfluent waren, wuchsen die Zellen von Pat.19 noch deutlich weiter, sodass ihre Zellzahl nach 72 h erneut zugenommen hatte. Die Kontrollzelllinie zeigte ab 48 h einen zurückhaltenderes Wachstum, sodass sich ihre Zellzahl bis 72 h kaum erhöhte. Es wurde somit eine gesteigerte Proliferation der Zellen von Pat.19 im Vergleich zu der verwendeten Kontrolle (Kon.5) festgestellt. Dieses Ergebnis konnte in einem Folgeexperiment unter Verwendung von 3 Kontrollzelllinien (Kon.1, Kon.5, Kon.6) und der Mutante erneut reproduziert werden.

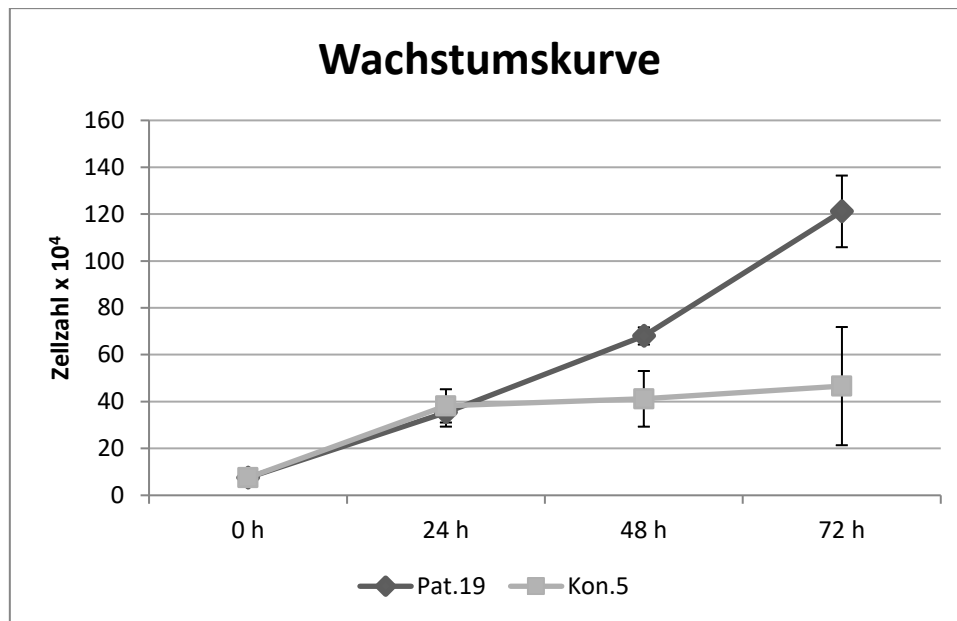


Abb. 27 **Wachstumskurve.** Grafisch dargestellt sind die ermittelten Zellzahlen für die Zelllinien von Pat.19 (dunkelgrau) und Kon.5 (hellgrau) im Verlauf nach 24 h, 48 h und 72 h. Ab 24 h nahm die Zellzahl von Pat.19 weiterhin zu. Die Zellzahl der Kontrolle nahm bis zwischen 24 h und 72 h weniger zu. Kon. = Kontrolle, Pat. = Patient.

4 Diskussion

4.1 Detektion der Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung

Die im Vorfeld zu dieser Arbeit durch NGS (Illumina) ermittelten 23 Mutationen, wobei 18 hemizygoten Mutationen innerhalb des AR-Gens lagen und 5 heterozygote Mutationen andere Gene betrafen, konnten durch die Sanger-Sequenziermethode erfolgreich verifiziert werden. Somit wird deutlich, dass ein NGS-Verfahren ein ebenso genaues Ergebnis erzielt wie die heutzutage bislang noch als Goldstandard verwendete Sequenzierung nach Sanger. Dieses Ergebnis bekräftigt NGS als einsetzbare Methode bei vergleichbaren Ergebnissen in der klinischen Routinediagnostik. Zur Zeit wird NGS als Hochdurchsatzverfahren vorrangig in der Forschung verwendet, wobei sich die NGS-Methoden gegenüber der Sanger-Methode als zeitsparende, kostengünstigere Alternative erweist (Holterhus 2013; Park und Kim 2016). Durch Methoden wie NGS können neue Erkenntnisse hinsichtlich der Vielfältigkeit verschiedener DSD-Formen gewonnen werden (Hiort et al. 2014). Im Rahmen eines AIS kann in mehr als 95% der CAIS-Fälle eine Mutation im AR-Gen nachgewiesen werden (Tadokoro-Cuccaro und Hughes 2014). Gehört ein CAIS-Patient jedoch zu den <5%, die keine Mutation im AR-Gen tragen, ist die Suche nach der molekulargenetischen Erkrankungsursache mittels NGS durch eine genomweite Analyse möglich (Mongan et al. 2015; Tadokoro-Cuccaro und Hughes 2014). Auch die Mehrheit der PAIS-Patienten weist in der Regel keine Mutation im AR-Gen auf und profitiert ebenfalls von der Anwendung von NGS durch die zeitgleiche Untersuchung mehrerer Gene auf der Suche nach den zugrundeliegenden Mutationen (Tadokoro-Cuccaro und Hughes 2014). Für eine schnellere Diagnosestellung insbesondere bei solchen AIS-Patienten, bei denen keine Mutation im AR-Gen detektiert werden kann, ist die Etablierung von zeit- und kosteneffizienten Hochdurchsatzverfahren wie NGS in der Genomsequenzierung eine vielversprechende Alternative. Dabei ist der Vergleich beider Methoden, Sanger-Sequenzierung und NGS, ein wichtiger Schritt auf dem Weg der Weiterentwicklung der diagnostischen Verfahren im klinischen Alltag. In diesem Zusammenhang wird durch diese Doktorarbeit unterstützt, dass sich NGS durch eine vergleichbare Genauigkeit in den Ergebnissen zu einer bewährten Methode als Routineverfahren für die Sequenzierung des AR-Gens im klinischen Alltag eignet und damit ein zukünftiger Einsatz als etablierte Methode in der AIS-Diagnostik gerechtfertigt ist. Des Weiteren kann NGS als vielversprechende und effiziente Methode in der Erkennung von verschiedenen DSD-Formen im klinischen Alltag hinsichtlich der Differentialdiagnostik, der

genetischen Beratung und einer zügigen Versorgung betroffener Patienten einen Beitrag leisten (Dong et al. 2016). Darüber hinaus geht aus der Literatur hervor, dass der Einsatz von NGS durch die parallele Untersuchung mehrerer Gene die Diagnostik monogenetischer kongenitaler Erkrankungen verbessern kann und damit ebenfalls das Patientenmanagement beeinflusst werden kann (Eggers et al. 2016; Jamuar und Tan 2015). Dabei ist NGS gegenwärtig für den Nachweis seltener Varianten bei Patienten mit einem Phänotyp, der vermutlich auf einer monogenen Erkrankung beruht, indiziert (Jamuar und Tan 2015). Dies ist der Fall, wenn die vorangegangene gezielte Untersuchung von Kandidatengen negativ ist oder wenn eine genetische Heterogenität vorliegt, sodass die Sanger-Sequenzierung zur Untersuchung mehrerer Gene zeit- und kostenintensiv wäre (Jamuar und Tan 2015). Somit geht aus der Literatur hervor, dass NGS eine nützliche Untersuchungsmethode für die Mehrheit an monogenen Erkrankungen darstellt und des Weiteren an Akzeptanz in der medizinischen Gemeinschaft gewinnt (Jamuar und Tan 2015). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, die sich auf die molekulare Diagnostik von AIS-Patienten beziehen, unterstützen diese Aussage.

4.2 Diskussionspunkte zu Pat.19

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Zelllinie entstammt dem Labiengewebe von Pat.19. Aus den NGS-Daten zu diesem Patienten geht u. a. eine vorher nicht bekannte homozygote Mutation im HSD17B3-Gen (Chromosom 9, Position 99017146, T>A) hervor. Dieses Gen kodiert für das Enzym 17-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-3 (17 β -HSD3) in der Kaskade der Steroidbiosynthese, welches die Umwandlung von Androstendion zu Testosteron katalysiert (Mendonca et al. 2017). Ein 17 β -HSD3-Defekt lässt sich klinisch schwer von anderen Formen von 46,XY-DSD unterscheiden, da Betroffene u. a. ein weibliches Genitale mit blind endender Vagina zeigen (Mendonca et al. 2017). In der Literatur wird die hier detektierte Mutation (c.277+4A>T) von Andersson et al. in mehreren Fällen mit einem bei Geburt komplett weiblichen Phänotyp beschrieben, wobei diese Patienten zum erwarteten Zeitpunkt der Pubertät eine Virilisierung aufweisen (Andersson et al. 1996). Darüber hinaus wird diese Mutation auch im Zusammenhang mit einem uneindeutigen äußeren Genitale aufgeführt (Boehmer et al. 1999). Dieser durch Boehmer et al. beschriebene Patient zeigt bei Geburt ein virilisiertes äußeres Genitale und wächst ohne Gonadektomie als Junge auf. Das Vorliegen von Mutationen in Genen, die die Geschlechtshormonbiosynthese betreffen, zusammen mit Mutationen im AR-Gen wird in der Literatur bereits beschrieben und ist ein mögliches Erklärungsmodell für die phänotypische Variabilität bei Individuen mit AIS

(Boehmer et al. 1999; Idkowiak et al. 2010). Der betroffene Pat.19 fällt phänotypisch in die Gruppe eines CAIS, was am ehesten durch die Mutation im HSD17B3-Gen erklärt werden kann. In der Literatur wird für diese Mutation eine phänotypische Variabilität genannt, wobei bereits eine Virilisierung bei Geburt möglich sein kann (Boehmer et al. 1999). Da Pat.19 laut den uns vorliegenden Informationen präpubertär keine Zeichen einer Virilisierung zeigt, lässt sich vermuten, ob zusätzlich zu dem Defekt der Steroidhormonbiosynthese eine Beeinträchtigung der Steroidhormonwirkung vorliegt. Auffällig ist bei diesem Patienten, dass der ApoD-Assay unter *serum starvation* Werte zeigt, durch welche der Patient als funktionell Androgen-resistent eingestuft werden kann. Patienten mit einem 46,XY-DSD-Form, wie einem 17 β -HSD3-Defekt, zeigen dagegen eine ApoD-Induktion, die mit den Werten männlicher Kontrollzellen vereinbar ist und damit die Funktionalität des AR bestätigt (Hornig et al. 2016). Der pathologische ApoD-Assay unter *serum starvation* weist darauf hin, dass in den Genitalhautfibroblasten von Pat.19 die Wirkung der Androgene und damit gegebenenfalls die Funktionstüchtigkeit des AR beeinträchtigt sein könnten. Bei Pat.19 liegt des Weiteren eine heterozygote Mutation vor, die das Gen von KPNA1 betrifft. In diesem Kontext ergibt sich die Frage, ob das KPNA1-Protein als Co-Faktor des AR fungiert und ob KPNA1 möglicherweise die Bindung des AR am ARE und folglich auch die Induktion der Transkription von Zielgenen des AR beeinflussen kann. Es besteht die Möglichkeit, dass diese heterozygote KPNA1-Mutation im Fall von Pat.19 das entsprechende Protein dahingehend stört, dass KPNA1 teilweise nicht mehr in Interaktion mit dem AR treten kann und damit die Regulation des hormonaktivierten AR bei diesem Patienten verändert. Hier entsteht Raum für Spekulation, ob in diesem Fall der AR trotz Bindung an das ARE nicht zur Transkription oder zu einer veränderten Transkription seiner Zielgene führt und damit freie Bindungsstellen an der DNA (ARE) für unbeeinträchtigte AR-Moleküle blockiert. Daraus könnte die geringe ApoD-Induktion unter *serum starvation* resultieren. Des Weiteren ergibt sich die Frage, ob die KPNA1-Mutation die Lokalisation des AR in der Zelle von Pat.19 beeinflusst und damit letztlich eine funktionelle Relevanz für den DSD-Phänotyp von Pat.19 haben könnte. Dieser Aspekt wird in den folgenden Abschnitten näher betrachtet.

4.3 Untersuchung der Lokalisation des AR in Genitalhautfibroblasten mittels Immunfluoreszenz

Die Experimente unter Anwendung der Immunfluoreszenzfärbung dienen der Untersuchung der Lokalisation des AR in den Zellen und sind einerseits vergleichend an mit EtOH- oder

DHT-behandelten Zellen durchgeführt worden und andererseits an Zellen, die mit 0,1% FBS (*serum starvation*), DCC-haltigem Nährmedium inkubiert worden waren. Dabei zeigen die Indexzellen unter EtOH-Inkubation im Vergleich zu den Kontrollen anteilig ein verstärktes AR-Fluoreszenzsignal im Zellkern. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass der AR bei Pat.19 teilweise auch ohne Bindung des Liganden DHT in den Nukleus transloziert. Wie bereits erwähnt, hat dieser Patient eine heterozygote Mutation im KPNA1-Gen. Diese Mutation könnte die Stabilität des KPNA1-Proteins stören und somit den ligandengesteuerten nukleären Import beeinträchtigen. Die KPNA-Importproteine werden u. a. von Ni et al. untersucht, wobei deren Ergebnisse zeigen, dass KPNA2-7 erst durch das Vorhandensein von Androgen am NLS des AR binden und den nukleären Import ermöglichen. KPNA1 dagegen zeigt in deren Experimenten unter hormonfreien Bedingungen eine verstärkte Bindung am AR (Ni et al. 2013). Des Weiteren beschreiben Ni et al. das Protein Importin 7 als wesentlichen Faktor an der zytoplasmatischen Retention des AR durch Abschirmung des NLS unter hormonfreien Bedingungen. Auffallend ist, dass KPNA1 ähnlich wie Importin 7 unter dem Fehlen von Hormon eine verstärkte Bindung am AR zeigt und durch das Vorhandensein von Hormon weniger am AR gebunden zu sein scheint (Ni et al. 2013). Hierbei ergibt sich die Frage, ob KPNA1 und Importin 7 eine ähnliche Funktion besitzen und somit beide zum Rückhalt des AR im Zytoplasma beitragen. Führt die heterozygote Mutation bei Pat.19 zu einem defekten KPNA1, würde somit eine Komponente fehlen, die den ligandenungebundenen AR im Zytoplasma hält. Der AR könnte dann ohne Vorhandensein von DHT in den Kern wandern. Dies könnte sich in den Experimenten dieser Arbeit mit einem verstärkten AR-Signal im Nukleus bei Pat.19-Zellen widerspiegeln. Möglicherweise sind jedoch nicht alle KPNA1-Proteine defekt, da die heterozygote Mutation zu einer variablen Expression des Proteins führt und daher noch intakte KPNA1-Proteine vorhanden sind. Dies könnte erklären, warum das AR-Kernsignal durch Inkubation der Zellen mit DHT noch stärker als unter EtOH-Behandlung ist. Die intakten KPNA1-Proteine dissoziieren durch Ligandenbindung vom AR und ermöglichen unter Beteiligung weiterer Faktoren den physiologischen nukleären Import. Das könnte im Rahmen dieser Experimente durch die deutlichen roten nukleären Fluoreszenzsignale reflektiert sein. Diese Hypothese wird durch die Experimente gestützt, in denen ein durch Aktivkohle behandeltes, hormonfreies Medium (0,1% FBS, DCC) zur Kultivierung der Zellen benutzt wird. Unter dieser genannten Bedingung zeigt die Indexzelllinie im Vergleich zu den Kontrollzelllinien ebenfalls ein intensiveres nukleäres AR-Signal. Die KPNA1-Mutation dieses Patienten behindert möglicherweise die physiologische Funktion dieses Proteins, wodurch die zytoplasmatische

Retention des ligandenungebundenen AR beeinträchtigt wird, sodass einige AR-Proteine ohne Hormoninduktion in den Nukleus translozieren können.

4.4 Untersuchung des AR-Proteins unter EtOH- bzw. DHT-Inkubation mittels Western Blot

Die Experimente zur Analyse des AR-Proteins und des Zytoskelettproteins Aktin als Ladekontrolle in Zellen von Pat.19 im Vergleich zu den Proteinen aus Kontrollzelllinien wird an mit EtOH- oder DHT-inkubierten Zellen durchgeführt. Das Verhältnis von AR/Aktin ist unter EtOH-Behandlung bei der Mutante signifikant höher als bei den Kontrollen. Daraus resultiert eine größere Proteinmenge von AR in der Indexzelllinie, da im Vergleich dazu die Menge von Aktin unabhängig von der Art der Inkubation (EtOH oder DHT) gleich ist. Möglicherweise wird die Stabilität des AR-Proteins durch die Mutation beeinflusst, sodass die größere Menge von AR-Protein in den Zellen der Mutante im Vergleich zu der in den Kontrollzelllinien erklärbar ist. Dass die Stabilität des AR durch Vorhandensein von DHT verstärkt wird, bekräftigt der Nachweis von mehr AR-Protein nach DHT-Inkubation in den Kontrollen sowie in der Mutante. Darüber hinaus wird deutlich, dass die bereits erhöhte AR-Menge in den Pat.19-Zellen durch Hormoninkubation mit DHT weiter steigerbar ist.

4.5 Untersuchung von Proteinen unter 0,1% FBS, DCC-Inkubation mittels Western Blot

Eine weitere Proteinanalyse mittels Western Blot betrifft mit 0,1% FBS, DCC-behandelte Zellen. Dabei ließ sich das nukleäre Markerprotein YY1 ausschließlich im nukleären Extrakt und das zytoplasmatische Markerprotein GAPDH nahezu ausschließlich im zytoplasmatischen Extrakt in gleichen Mengen bei der Mutante sowie der Kontrolle nachweisen. Der geringe Nachweis von GAPDH im nukleären Extrakt kann durch geringe Überreste des zytoplasmatischen Extrakts bei der Separation erklärt werden. Die Analyse von KPNA1 zeigt, dass die Zellen der Mutante deutlich weniger Protein beinhalten als die der Kontrollzelllinie. Dies bestärkt den Verdacht, dass die Mutation bei Pat.19 zu einer verringerten Stabilität des KPNA1-Proteins führen könnte. Da die Mutation heterozygot ist, könnte ein negativer Effekt auf die Proteinstabilität des Wildtypallels vorliegen. Die Untersuchung des AR-Proteins im nukleären und zytoplasmatischen Extrakt zeigt das Vorhandensein des AR bei beiden Zelllinien, jedoch deutlich mehr bei der Mutante als bei der Kontrolle. Möglicherweise greift die KPNA1-Mutation und die damit verbundene verringerte Menge an KPNA1 im Zytoplasma

derart in die Regulation des AR ein, dass dieser ohne Hormonaktivierung unter *serum starvation* in den Nukleus transloziert. Fraglich ist, ob der AR nach der Translokation im Nukleus an die DNA bindet und die Transkription seiner Zielgene entsprechend reguliert. Da der ApoD-Assay unter *serum starvation* pathologisch geringe Werte zeigt, kann es möglich sein, dass die Transkription teilweise beeinflusst wird. Auffallend ist auch, dass der AR ausschließlich im nukleären Extrakt nachgewiesen wird. Auch Sar et al. beobachten in Experimenten an Zellen verschiedener Gewebetypen von Ratten, dass der AR unter Androgenentzug vorrangig im Kern lokalisiert ist (Sar et al. 1990).

4.6 Untersuchung des Zellwachstums

Die Analyse des Wachstumsverhaltens der Zellen von Pat.19 zeigt im Vergleich zu den Kontrollzelllinien ein deutlich erhöhtes Teilungsvermögen. Eine mögliche Erklärung liefert an dieser Stelle ebenfalls die ligandenunabhängige nukleäre Translokation des AR durch die KPNA1-Mutation. Neben dem Differenzierungsreiz induziert der AR auch einen Wachstumsreiz. Dieser Wachstumsreiz auf Genitalgewebe spielt beispielsweise bei der Entwicklung der sekundären männlichen Geschlechtsorgane eine wichtige Rolle (Nieschlag et al. 2009). Wenn der AR in den Genitalhautfibroblasten von Pat.19 durch die genannte KPNA1-Mutation im Vergleich zu den Kontrollen vermehrt im Nukleus vorliegt, könnte er dort seine transkriptive Wirkung entfalten, wodurch das verstärkte Wachstum der mutierten Zelllinie erklärt werden könnte. Des Weiteren haben Hall et al. in Experimenten an Skelettmuskelzellen im Mausmodell beobachtet, dass ein *Gen-Knockdown* von KPNA1 zu einer um etwa 25% signifikant erhöhten Zellzahl der Muskelzellen führt (Hall et al. 2011). In der Maus existieren 6 KPNA-Moleküle, die mit den menschlichen Homologen in 80–90% in der Aminosäuresequenz übereinstimmen (Hall et al. 2011). Daher lassen diese Ergebnisse in gewissen Grenzen Rückschlüsse auf die Auswirkung eines funktionsgeminderten KPNA1-Proteins im Menschen zu. Somit bekräftigen die Ergebnisse von Hall et al. die Hypothese, dass die heterozygote Mutation im Gen von KPNA1 in den Zellen von Pat.19 zu einer eingeschränkten Funktion des Proteins bzw. zu einer reduzierten Proteinmenge führt und sich damit die Zellproliferation erhöhen kann. Im Zusammenhang mit einer gesteigerten Zellproliferation stellt sich des Weiteren die Frage, ob eine Verbindung von KPNA1 mit Tumoren vorliegt. Beispielsweise benennen Kim et al. KPNA1 neben KPNA5 und KPNA6 als wesentliche Importfaktoren eines Tumorsuppressors (PHB2) in Brustkrebszellen (Kim et al. 2015). In diesen Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebszellen verhindert ein Protein (BIG3) die

Bindung von PHB2 an KPNA1 sowie KPNA5 und KPNA6, wodurch der nukleäre Import dieses Tumorsuppressors gestört ist (Kim et al. 2015). Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass im Rahmen von Tumorerkrankungen ein beeinträchtigter nukleärer Import durchaus eine Rolle spielen kann. Laut einem weiteren Artikel sind jedoch bisher keine Informationen über einen Zusammenhang von KPNA1 mit einem spezifischen Tumor verfügbar (Çağatay und Chook 2018).

4.7 Fazit und Ausblick zu Pat.19

Die Mutation im HSD17B3-Gen bei Pat.19 erklärt vermutlich den Phänotyp des Patienten. Jedoch wird für diese Mutation in der Literatur eine phänotypische Variabilität beschrieben, sodass sich vermuten lässt, ob im Fall von Pat.19 zusätzlich zu dem Defekt der Steroidhormonbiosynthese eine Beeinträchtigung der Steroidhormonwirkung vorliegen könnte (Boehmer et al. 1999). In diesem Zusammenhang weist der ApoD-Assay auf eine funktionelle Androgenresistenz in den Genitalhautfibroblasten von Pat.19 hin. Aus den NGS Daten zu diesem Patienten geht keine Mutation im kodierenden Bereich des AR-Gens hervor. Jedoch wurde eine heterozygote Mutation im Gen von KPNA1 detektiert. KPNA1 gehört zur Familie der Importrezeptoren, die am nukleären Import des AR beteiligt sind (Ni et al. 2013). Es lässt sich vermuten, ob die detektierte Mutation im KPNA1-Gen zu dem Befund der funktionellen Androgenresistenz im Fibroblastenmodell beitragen könnte. Die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Untersuchungen an den Genitalhautfibroblasten von Pat.19 unterstützen diese Hypothese und lassen zusammenfassend vermuten, dass KPNA1 einen Co-Faktor im Signalweg des AR darstellen könnte. Um diesen Sachverhalt weiter zu charakterisieren sollten unbedingt zusätzliche zellbiologische Untersuchungen erfolgen. Beispielsweise könnte ein *Gen-Knockdown* von KPNA1 im Fibroblastenmodell neue Informationen liefern und könnte damit weitere Rückschlüsse auf die Funktion von KPNA1 zulassen.

5 Zusammenfassung

Das Androgeninsensitivitätssyndrom (AIS) stellt eine der häufigsten Diagnosen, die eine Störung der Geschlechtsentwicklung mit männlichem Genotyp (46,XY-DSD) verursachen, dar. Die Phänotypen sind extrem variabel, sodass Subgruppen charakterisiert werden. Dabei zeigt sich ein Patient mit einer kompletten Androgenresistenz (CAIS) als phänotypisch weiblich, wohingegen ein Patient mit einer partiellen Androgenresistenz (PAIS) mit einem ambivalenten Genitale imponiert. Die milde Androgenresistenz (MAIS) kann durch eine vorhandene Infertilität auffallen. Eine Mutation im Gen des Androgenrezeptors (AR) bildet für ein CAIS die häufigste Ursache, dagegen deutlich seltener für ein PAIS. Die molekulargenetische Untersuchung ist daher bei Bestehen eines Verdachtes auf ein AIS unverzichtbar. Gegenüber älteren bewährten Methoden, wie der Sanger-Sequenzierung, ist *Next Generation Sequencing* (NGS) als Hochdurchsatzverfahren in der Genomanalyse in Bezug auf Zeitersparnis und Kosteneffizienz besonders vorteilhaft, um eine große Menge an Genen parallel zu untersuchen. Dadurch können im Zuge der AIS-Diagnostik nicht nur das AR-Gen, sondern auch weitere Gene, die mit der Krankheitsentstehung in Verbindung gebracht werden könnten, zeitgleich untersucht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Validierung der NGS-Ergebnisse von AIS-Patienten mittels der Sanger-Sequenzierung war in allen Fällen erfolgreich. Dieses Ergebnis bestärkt NGS als Hochdurchsatzverfahren in seiner Genauigkeit hinsichtlich der Mutationsanalyse für das AR-Gen und damit in der Anwendbarkeit in der AIS-Diagnostik. Somit leistet diese Arbeit einen Beitrag auf dem Weg zur Etablierung von NGS in der klinischen Anwendung im Rahmen der DSD-Diagnostik.

Durch NGS konnten bei einigen Patienten, bei denen ein Verdacht auf ein AIS ohne eine Mutation im AR-Gen vorlag, weitere Mutationen in anderen Genen entdeckt werden. Diese Mutationen betreffen Gene, deren Funktionen mit dem AR oder mit der Synthese und Wirkung von Androgenen in der Literatur assoziiert wird. Dabei gab ein untersuchter Fall Anlass für weitere Untersuchungen, da ohne AR-Gen-Mutation, aber mit einer Mutation im Gen von 17-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 3, ein pathologischer ApoD-Assay, der auf eine funktionelle Androgenresistenz der Fibroblasten hinweist, auffiel. Im Rahmen der Diagnostik wurde mittels NGS eine Mutation im KPNA1-Gen gefunden. Dieses Protein ist u. a. direkt am Import von nukleären Rezeptoren, wie dem AR, in den Zellkern beteiligt. Die Experimente zur Untersuchung der nukleären Translokation des AR wurden durch Immunfluoreszenz und Western Blot an kultivierten Genitalhautfibroblasten und deren Proteinen durchgeführt. Dabei

fielen Differenzen zu der mutierten Zelllinie von Patient 19 (Pat.19) auf. In der Immunfluoreszenz wiesen die Zellen von Pat.19 im Vergleich zu den Kontrollen eine verstärkte Signalanreicherung des AR im Nukleus auf. Des Weiteren zeigte sich im Western Bot eine erhöhte Menge an AR-Protein in den Zellen von Pat.19 im Vergleich zu Kontrollen. Auch wurde eine größere Menge an AR-Protein im Nukleus in den Zellen von Pat.19 im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen. Eine mögliche Begründung für die veränderte Lokalisation des AR in Zellen von Pat.19 im Vergleich zu Kontrollzelllinien könnte die heterozygote Mutation, die auf dem Chromosom 3 im KPNA1-Gen liegt, liefern. Damit beleuchtet diese Arbeit erstmalig eine KPNA1-Mutation vor dem Hintergrund einer funktionellen Androgenresistenz im Fibroblastenmodell und stellt einen Ausgangspunkt dar, den veränderten nukleären Import des AR bei Pat.19 in weiteren Untersuchungen noch genauer zu charakterisieren. Dadurch sollten weitere Informationen über KPNA1 als potenziellen Co-Faktor des AR gewonnen werden, was möglicherweise einen Beitrag leistet, AIS-Patienten ohne Mutation im AR-Gen, ein besseres Krankheitsverständnis zu ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

- Andersson, S., Geissler, W. M., Wu, L., Davis, D. L., Grumbach, M. M., New, M. I., Schwarz, H. P., Blethen, S. L., Mendonca, B. B., Bloise, W., Witchel, S. F., Cutler, G. B., Griffin, J. E., Wilson, J. D., Russel, D. W. (1996): Molecular genetics and pathophysiology of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 130–136 (1) 81
- Appari, M., Werner, R., Wünsch, L., Cario, G., Demeter, J., Hiort, O., Riepe, F., Brooks, J. D., Holterhus, P.-M. (2009): Apolipoprotein D (APOD) is a putative biomarker of androgen receptor function in androgen insensitivity syndrome. *J Mol Med (Berl)*, 623–632 (6) 87
- Barbierato, M., Argentini, C., Skaper, S. D. (2012): Indirect Immunofluorescence Staining of Cultured Neural Cells. In: Skaper, S. D. (Hrsg.): *Neurotrophic Factors: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ 846, 235–246
- Biason-Lauber, A. (2010): Control of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 163–186 (2) 24
- Birnbaum, W., Marshall, L., Werner, R., Kulle, A., Holterhus, P.-M., Rall, K., Köhler, B., Richter-Unruh, A., Hartmann, M. F., Wudy, S. A., Auer, M. K., Lux, A., Kropf, S., Hiort, O. (2018): Oestrogen versus androgen in hormone-replacement therapy for complete androgen insensitivity syndrome. A multicentre, randomised, double-dummy, double-blind crossover trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 771–780 (10) 6
- Boehmer, A. L., Brinkmann, A. O., Sandkuijl, L. A., Halley, D. J., Niermeijer, M. F., Andersson, S., Jong, F. H. de, Kayserili, H., Vroede, M. A. de, Otten, B. J., Rouwé, C. W., Mendonça, B. B., Rodrigues, C., Bode, H. H., Ruiten, P. E. de, Delemarre-van Waal, H. A. de, Drop, S. L. (1999): 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency. Diagnosis, phenotypic variability, population genetics, and worldwide distribution of ancient and de novo mutations. *J Clin Endocrinol Metab*, 4713–4721 (12) 84
- Brinkmann, A. O. (2011): Molecular mechanisms of androgen action--a historical perspective. In: Saatcioglu, F. (Hrsg.): *Androgen Action. Methods and Protocols*. SpringerLink Bücher Bd. 776. Springer Science+Business Media LLC, Totowa, NJ 776, 3–24
- Brinkmann, A. O. (2001): Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol*, 105–109 (1-2) 179

- Brown, C. J., Goss, S. J., Lubahn, D. B., Joseph, D. R., Wilson, E. M., French, F. S., Willard, H. F. (1989): Androgen receptor locus on the human X chromosome. Regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet*, 264–269 (2) 44
- Çağatay, T., Chook, Y. M. (2018): Karyopherins in cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 30–42 52
- Chang, C., Kokontis, J., Liao, S. (1988): Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science*, 324–326 (4850) 240
- Chaudhry, S., Tadokoro-Cuccaro, R., Hannema, S. E., Acerini, C. L., Hughes, I. A. (2017): Frequency of gonadal tumours in complete androgen insensitivity syndrome (CAIS). A retrospective case-series analysis. *J Pediatr Urol* 2017
- Cools, M., Looijenga, L. (2017): Update on the Pathophysiology and Risk Factors for the Development of Malignant Testicular Germ Cell Tumors in Complete Androgen Insensitivity Syndrome. *Sex Dev* 2017
- Cutress, M. L., Whitaker, H. C., Mills, I. G., Stewart, M., Neal, D. E. (2008): Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J Cell Sci*, 957–968 (Pt 7) 121
- Döhnert, U., Wunsch, L., Hiort, O. (2017): Gonadectomy in Complete Androgen Insensitivity Syndrome. Why and When? *Sex Dev* 2017
- Dong, Y., Yi, Y., Yao, H., Yang, Z., Hu, H., Liu, J., Gao, C., Zhang, M., Zhou, L., Asan, Yi, X., Liang, Z. (2016): Targeted next-generation sequencing identification of mutations in patients with disorders of sex development. *BMC Med Genet*, 23 17
- Eggers, S., Sadedin, S., van den Bergen, J. A., Robevska, G., Ohnesorg, T., Hewitt, J., Lambeth, L., Bouty, A., Knarston, I. M., Tan, T. Y., Cameron, F., Werther, G., Hutson, J., O'Connell, M., Grover, S. R., Heloury, Y., Zacharin, M., Bergman, P., Kimber, C., Brown, J., Webb, N., Hunter, M. F., Srinivasan, S., Titmuss, A., Verge, C. F., Mowat, D., Smith, G., Smith, J., Ewans, L., Shalhoub, C., Crock, P., Cowell, C., Leong, G. M., Ono, M., Lafferty, A. R., Huynh, T., Visser, U., Choong, C. S., McKenzie, F., Pachter, N., Thompson, E. M., Couper, J., Baxendale, A., Gecz, J., Wheeler, B. J., Jefferies, C., MacKenzie, K., Hofman, P., Carter, P., King, R. I., Krausz, C., van Ravenswaaij-Arts, C. M. A., Looijenga, L., Drop, S., Riedl, S., Cools, M., Dawson, A., Juniarto, A. Z., Khadilkar, V., Khadilkar, A., Bhatia, V., Dũng, V. C., Atta, I., Raza, J., Thi Diem Chi, N., Hao, T. K., Harley, V., Koopman, P., Warne, G., Faradz, S., Oshlack, A., Ayers, K. L., Sinclair, A. H. (2016): Disorders of sex development. Insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol.*, 243 (1) 17

- Gobinet, J., Pujol, N., Sultan, C. (2002): Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol*, 15–24 (1-2) 198
- Gomez-Lobo, V., Amies Oelschläger, A.-M. (2016): Disorders of Sexual Development in Adult Women. *Obstet Gynecol*, 1162–1173 (5) 128
- Hall, M. N., Griffin, C. A., Simionescu, A., Corbett, A. H., Pavlath, G. K. (2011): Distinct roles for classical nuclear import receptors in the growth of multinucleated muscle cells. *Dev Biol*, 248–258 (1) 357
- Hiort, O., Birnbaum, W., Marshall, L., Wunsch, L., Werner, R., Schröder, T., Döhnert, U., Holterhus, P.-M. (2014): Management of disorders of sex development. *Nat Rev Endocrinol*, 520–529 (9) 10
- Holterhus, P.-M. (2013): Intersexualität und Differences of Sex Development (DSD). Grundlagen, Diagnostik und Betreuungsansätze. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 1686–1694 (12) 56
- Hornig, N. C., Ukat, M., Schweikert, H. U., Hiort, O., Werner, R., Drop, S. L. S., Cools, M., Hughes, I. A., Audi, L., Ahmed, S. F., Demiri, J., Rodens, P., Worch, L., Wehner, G., Kulle, A. E., Dunstheimer, D., Müller-Rossberg, E., Reinehr, T., Hadidi, A. T., Eckstein, A. K., van der Horst, C., Seif, C., Siebert, R., Ammerpohl, O., Holterhus, P.-M. (2016): Identification of an AR Mutation-Negative Class of Androgen Insensitivity by Determining Endogenous AR Activity. *J Clin Endocrinol Metab*, 4468–4477 (11) 101
- Hughes, I. A., Davies, J. D., Bunch, T. I., Pasterski, V., Mastroyannopoulou, K., MacDougall, J. (2012): Androgen insensitivity syndrome. *Lancet*, 1419–1428 (9851) 380
- Hughes, I. A., Houk, C., Ahmed, S. F., Lee, P. A. (2006): Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child*, 554–563 (7) 91
- Idkowiak, J., Malunowicz, E. M., Dhir, V., Reisch, N., Szarras-Czapnik, M., Holmes, D. M., Shackleton, C. H. L., Davies, J. D., Hughes, I. A., Krone, N., Arlt, W. (2010): Concomitant mutations in the P450 oxidoreductase and androgen receptor genes presenting with 46,XY disordered sex development and androgenization at adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab*, 3418–3427 (7) 95
- Jamuar, S. S., Tan, E.-C. (2015): Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases. *Hum Genomics*, 10 9
- Kim, N.-H., Yoshimaru, T., Chen, Y.-A., Matsuo, T., Komatsu, M., Miyoshi, Y., Tanaka, E., Sasa, M., Mizuguchi, K., Katagiri, T. (2015): BIG3 Inhibits the Estrogen-Dependent Nuclear Translocation of PHB2 via Multiple Karyopherin-Alpha Proteins in Breast Cancer Cells. *PloS one*, e0127707 (6) 10

- Kretz, K., Callen, W., Hedden, V. (1994): Cycle sequencing. *Genome Res*, 107–112 (5) 3
- Kurien, B. T., Scofield, R. H. (2006): Western blotting. *Methods*, 283–293 (4) 38
- Lubahn, D., Joseph, D., Sullivan, P., Willard, H., French, F., Wilson, E. (1988): Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science*, 327–330 (4850) 240
- Lucas-Herald, A., Bertelloni, S., Juul, A., Bryce, J., Jiang, J., Rodie, M., Sinnott, R., Boroujerdi, M., Lindhardt Johansen, M., Hiort, O., Holterhus, P. M., Cools, M., Guaragna-Filho, G., Guerra-Junior, G., Weintrob, N., Hannema, S., Drop, S., Guran, T., Darendeliler, F., Nordenstrom, A., Hughes, I. A., Acerini, C., Tadokoro-Cuccaro, R., Ahmed, S. F. (2016): The Long-Term Outcome of Boys With Partial Androgen Insensitivity Syndrome and a Mutation in the Androgen Receptor Gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 3959–3967 (11) 101
- Lucas-Herald, A. K., Bashamboo, A. (2014): Gonadal development. *Endocr Dev*, 1–16 27
- Lüllmann-Rauch, R. (2009): Taschenlehrbuch Histologie. 3. Aufl. Thieme, Stuttgart
- McBride, L. J., Koepf, S. M., Gibbs, R. A., Salser, W., Mayrand, P. E., Hunkapiller, M. W., Kronick, M. N. (1989): Automated DNA sequencing methods involving polymerase chain reaction. *Clin Chem*, 2196–2201 (11) 35
- Mendonca, B. B., Gomes, N. L., Costa, E. M. F., Inacio, M., Martin, R. M., Nishi, M. Y., Carvalho, F. M., Tibor, F. D., Domenice, S. (2017): 46,XY disorder of sex development (DSD) due to 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 79–85 (Pt A) 165
- Mongan, N. P., Tadokoro-Cuccaro, R., Bunch, T., Hughes, I. A. (2015): Androgen insensitivity syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 569–580 (4) 29
- Morel, Y., Roucher, F., Mallet, D., Plotton, I. (2014): Genetic of gonadal determination. *Ann Endocrinol (Paris)*, 32–39 (2) 75
- Morozova, O., Marra, M. A. (2008): Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, 255–264 (5) 92
- Nieschlag, E., Behre, H. M., Nieschlag, S. (2009): *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 3. Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Ni, L., Llewellyn, R., Kesler, C. T., Kelley, J. B., Spencer, A., Snow, C. J., Shank, L., Paschal, B. M. (2013): Androgen induces a switch from cytoplasmic retention to nuclear import of the androgen receptor. *Mol Cell Biol*, 4766–4778 (24) 33

- Park, S. T., Kim, J. (2016): Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *Int Neurourol J*, 76–83 (Suppl 2) 20
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., Baumeister, K. (1987): A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, 336–341 (4825) 238
- Quigley, C. A., Bellis, A. de, Marschke, K. B., el-Awady, M. K., Wilson, E. M., French, F. S. (1995): Androgen receptor defects. Historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev*, 271–321 (3) 16
- Richter-Appelt, H. (2007): Intersexualität. Störungen der Geschlechtsentwicklung. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 52–61 (1) 50
- Rizzo, J. M., Buck, M. J. (2012): Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)*, 887–900 (7) 5
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 5463–5467 (12) 74
- Sar, M., Lubahn, D. B., French, F. S., Wilson, E. M. (1990): Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology*, 3180–3186 (6) 127
- Shendure, J., Ji, H. (2008): Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 1135–1145 (10) 26
- Sinnecker, G. H.G., Hiort, O., Dibbelt, L., Albers, N., Dörr, H. G., Hauß, H., Heinrich, U., Hemminghaus, M., Hoepffner, W., Holder, M., Schnabel, D., Kruse, K. (1996): Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Am J Med Genet*, 223–230 (1) 63
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B., Hood, L. E. (1986): Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 674–679 321
- Tadokoro-Cuccaro, R., Hughes, I. A. (2014): Androgen insensitivity syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 499–503 (6) 21
- Thyen, U., Lanz, K., Holterhus, P.-M., Hiort, O. (2006): Epidemiology and initial management of ambiguous genitalia at birth in Germany. *Horm Res*, 195–203 (4) 66
- Werner, R., Holterhus, P.-M. (2014): Androgen action. *Endocr Dev*, 28–40 27

7 Anhang

7.1 Verwendete Primer zur Detektion von Mutationen

Tab. 8 Primer zur Detektion von Mutationen im AR-Gen

Exon	Primer-Bezeichnung	Sequenz
Exon 1 Segment 1	AR_E1_Seg1s	5'- CCTGTTGAACTCTTCTGAGC -3'
	AR_E1_Seg1a	5'- GCCTTACACAACTCCTTGGC -3'
	AR_E1_Seg1_Seq2A	5'- CCTGGGGCCCGGGTTCTGGAT-3'
Exon 1 Segment 2	AR_E1_Seg2s_2	5'- GCAGCAGCAGGGTGAGGATGGTTC -3'
	AR_E1_Seg2a_2	5'- CTCGCCTTCTAGCCCTTTGGTGTA -3'
Exon1 Segment 3	AR_E1_Seg3s_2	5'- CATGGGCCTGGGTGTGGAG -3'
	AR_E1_Seg3a_2	5'- GCGGCGGCTGAGGGTGAC -3'
Exon 1 Segment 4	AR_E1_Seg4s_2	5'- CCCCATCCCCACGCTCGCATCAAG -3'
	AR_E1_Seg4s_2	5'- AGCACCCAGGGCACGCAGCAGAAA -3'
Exon 2	AR_E2s_2	5'- TAATCCCAGAGAACTTCCCTAATC -3'
	AR_E2a_2	5'- GCCTTGCCAATGACTCTAT -3'
Exon 3	AR_E3s_2	5'- TGCCATACTCTGTCCACTTT -3'
	AR_E3a_2	5'- GCCACGTTGCCTATGAA -3'
Exon 4	AR_E4s_2	5'- TTTCTTAGCTAGGGCAGTTTTTCT -3'
	AR_E4a_2	5'- TGAGTTTCGATCCCTGTATGTTTA -3'
Exon 5	AR_E5s_3	5'- GGATGCCCGAATACCAGA -3'
	AR_E5a_3	5'- GCAAAGCCGCCTCATACT -3'
Exon 6	AR_E6s_2	5'- CCTGGCCAGAGAAGATGAGTAGTT -3'
	AR_E6a_2	5'- AGGGGGAATGAAGAAGGGAAATGT -3'
Exon 7	AR_E7s_2	5'- GTGGGGGTGGGGGTCAAGTC -3'
	AR_E7a_2	5'- TCAAAGCCAGAGGGGAATG -3'
Exon 8	AR_E8s_4	5'- GGGGGAGGACCAAGGAAGTA -3'
	AR_E8a_4	5'- AAAAAGCCCAGCAAATAGAAT -3'

Tab. 9 Primer zur Detektion von Mutationen außerhalb des AR-Gens

Gen	Primer-Bezeichnung	Sequenz
ZNF335	ZNF335-fw	5'- ATCTGCCGTGGTGATCTCTT -3'
	ZNF335-rev	5'- AAAGGCACCACTGGGTACAG -3'
	ZNF335-seq	5'- GGACCAAGACAGCTCTAGCC -3'
KPNA1	KPNA1-fw	5'- TGCCAAGTACTTTTTGTAGCC -3'
	KPNA1-rev	5'- CACTTTGAATGGGGTGCCTA -3'
	KPNA1-seq	5'- ACTGGTGCCATCTCCATGTT -3'
CHD7	CHD7-fw	5'- CAGTTTGCAATGGGTTTTGA -3'
	CHD7-rev	5'- TATGGTGGTCCTCACCGTCT -3'
	CHD7-seq	5'- GCTGTCCAATCTCTGCAGGT -3'
RAB3GAP2	RAB3GAP2-fw	5'- CCAAGTGGTTGCTGATCTGA -3'
	RAB3GAP2-rev	5'- TTCTAGACGCCATGGTGAAA -3'
	RAB3GAP2-seq	5'- AACATTGCTCAACTATTGGGGTA -3'
CYP4F12	CYP4F12-fw	5'- GCAGGGTTTTGATGAGGAAA -3'
	CYP4F12-rev	5'- GAGGGAAGGAGAGCTGGAAC -3'
	CYP4F12-seq	5'- AACATCACCTCACCCAAAA -3'

7.2 Reaktionsbedingungen für verschiedene Polymerasen

Tab. 10 Mastermix-Zusammensetzung und PCR-Bedingungen für die AmpliTaq Gold Polymerase

Mastermix		Thermocycler-Programm	
Wasser	17,3 µl	95 °C	5 min
10 x PCR-Puffer II	2,5 µl	95 °C	30 s
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl	X °C (<i>Annealing</i> -Temp.)	30 s
dNTPs (5 mM je Nukleotid)	1 µl	72 °C	30 s
F-Primer (20 pmol/µl)	0,5 µl	72 °C	5 min
R-Primer (20 pmol/µl)	0,5 µl	4 °C	Pause
AmpliTaqGold Polymerase	0,2 µl		
DNA (100 ng/µl)	1 µl		

36 Zyklen

Tab. 11 Mastermix-Zusammensetzung und PCR-Bedingungen für die Accuprime-Polymerase

Mastermix		Thermocycler-Programm		
Wasser	20,2 µl	95 °C	5 min	36 Zyklen
10 x Puffer II	2,5 µl	95 °C	30 s	
F-Primer (20 pmol/µl)	0,5 µl	X °C (<i>Annealing-Temp.</i>)	30 s	
R-Primer (20 pmol/µl)	0,5 µl	68 °C	30 s	
Accuprime Polymerase	0,3 µl	68 °C	5 min	
DNA (100 ng/µl)	1 µl	4 °C	Pause	

Tab. 12 Mastermix-Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen für die Sequenzierungsreaktion

Mastermix		Thermocycler-Programm		
Wasser	15 µl	96 °C	2 min	26 Zyklen
5 x Puffer	2 µl	96 °C	10 s	
F-Primer (20 pmol/µl)	1 µl	57 °C	5 s	
Big Dye Terminator	1 µl	60 °C	4 min	
PCR-Amplifikat	1 µl	4 °C	Pause	

7.3 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Tab. 13 Waschlösung bei dem Experiment der Immunfluoreszenz

PBS, 0,2% TritonX-100	
PBS	500 ml
TritonX-100	1 ml

Tab. 14 Verdünnungen der Antikörperlösungen beim Western Blot

Verdünnung der Antikörper mit Blocklösung	
Anti-Aktin	1:10000
Anti-AR	1:100
Anti-GADPH	1:10000
Anti-mouse	1:4000
Anti-rabbit	1:4000
Anti-SRP1	1:5000
Anti-YY1	1:200

Tab. 15 Pufferlösungen zur Proteinextraktion

Puffer A		Puffer C	
Bestandteil	Finale Konzentration	Bestandteil	Finale Konzentration
Hepes pH8	10 mM	NaCl	150 mM
MgCl ₂	1,5 mM	Tris pH8	25 mM
NaCl	10 mM	EDTA	5 mM
DTT	0,5 mM	DTT	0,5 mM
IGEPAL CA 630 (Sigma Aldrich, USA)	0,5%	IGEPAL CA 630 (Sigma Aldrich, USA)	0,5%
cOmplete (Roche, Schweiz)	1 x	cOmplete (Roche, Schweiz)	1 x

Tab. 16 Ladelösung für den Western Blot

Ladelösung	
4 x LDS Sample Buffer	3 µl
Protein Template	X µl (7,5 µg/µl)
Aqua dest.	X µl
Gesamtvolumen	12 µl

Tab. 17 Pufferlösung für die Elektrophoresekammer beim Western Blot

Transferpuffer	
Tris	3,03 g
Glycin	14,4 g
Methanol	100 ml
Aqua bidest	1000 ml

Die hier verwendeten Chemikalien wurden von Sigma Aldrich (USA) bezogen.

Tab. 18 Blocklösung zum Waschen und Verdünnen

Blocklösung (5%)	
TBS + 0,1% Tween	200 ml
Milchpulver	20 g

7.4 Agarose-Gelelektrophoresen der PCR-Produkte bezüglich Mutationen im AR-Gen

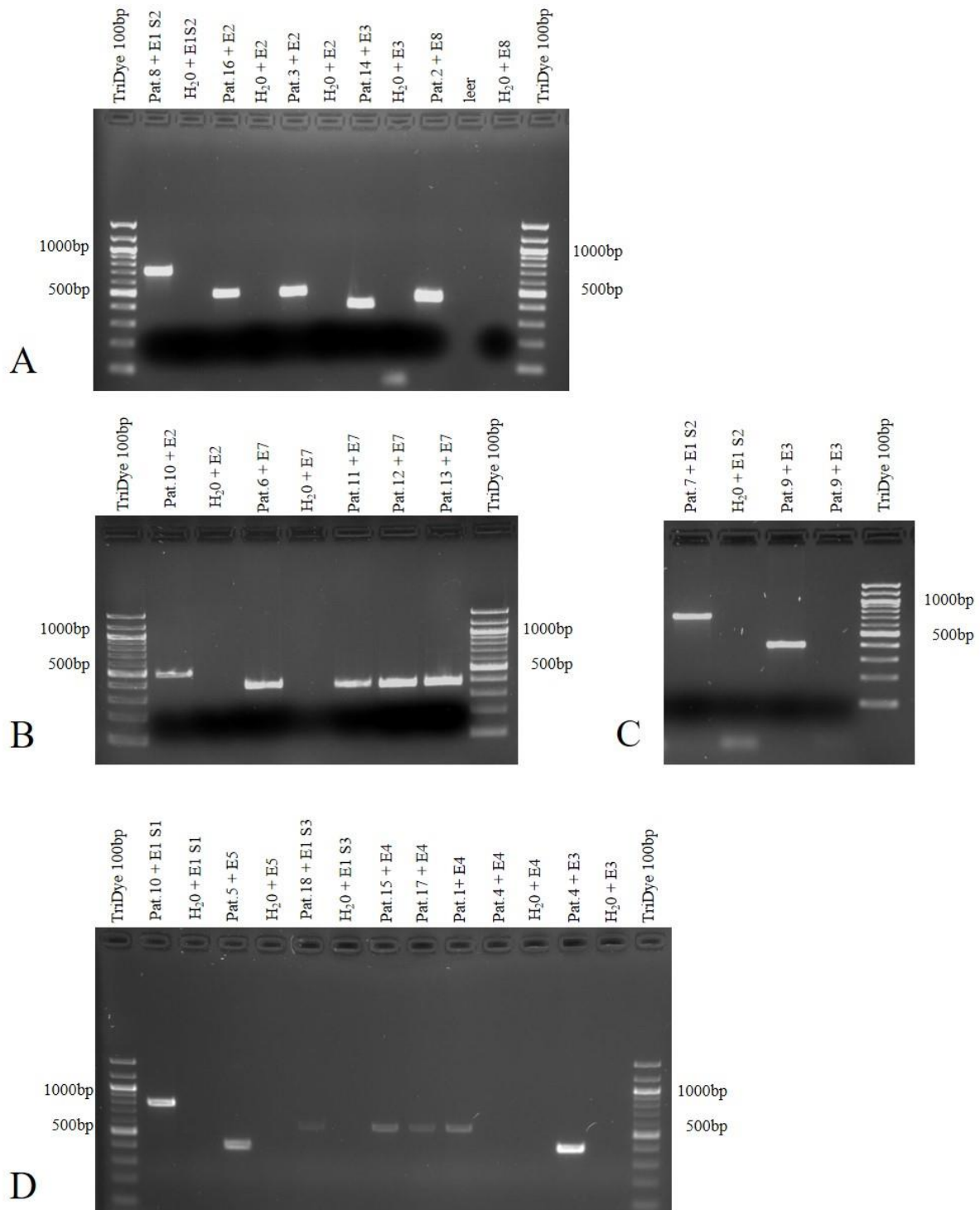


Abb. 28 **Auswertung der PCR mittels Agarosegel.** A, B, C, D: Verwendung von Patienten-DNA (Pat.) mit einem Primerpaar für das jeweilige Exon (E) und ggf. Segment (S). Bei stattgefundenener Amplifikation zeigte sich eine Bande in der Gelelektrophorese. Außer bei der Probe Pat.4 mit dem Primer E4 funktionierten alle PCRs. Für alle Negativkontrollen zeigten sich keine Banden.

7.5 Agarose-Gelelektrophoresen der PCR-Produkte bezüglich Mutationen außerhalb des AR-Gens

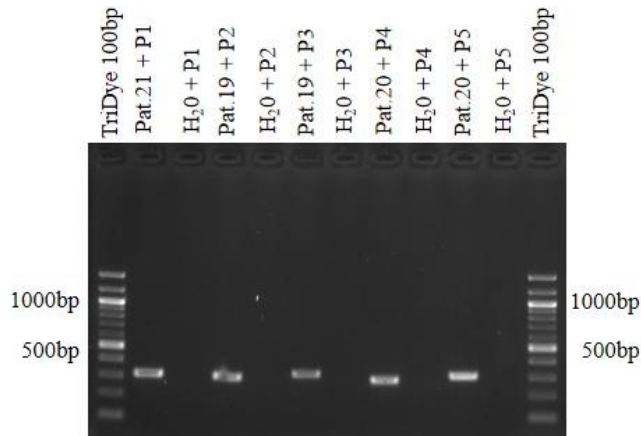


Abb. 29 *Auswertung der PCR mittels Agarosegel.* Verwendung der Patienten-DNA (Pat.) mit den jeweiligen Primerpaaren: P1 (11849/11850), P2 (11855/11856), P3 (11858/1159), P4 (11861/11862), P5 (11864/11865). Für jedes Primerpaar war die PCR erfolgreich (Bande sichtbar). Bei den Negativkontrollen fand keine Amplifikation statt, sodass keine Bande sichtbar ist.

7.6 PCR-Bedingungen für die Primer

Tab. 19 *PCR-Bedingungen der Primer bezogen auf Mutationen im AR-Gen*

Primerpaar	Polymerase	Annealing-Temperatur
Exon 1 Segment 1	AmpliTaq Gold	53 °C
Exon 1 Segment 2	AmpliTaq Gold	65 °C
Exon 1 Segment 3	AmpliTaq Gold	68 °C
Exon 1 Segment 4	AmpliTaq Gold	65 °C
Exon 2	AmpliTaq Gold	59 °C
Exon 3	AmpliTaq Gold	59 °C
Exon 4	AmpliTaq Gold	59 °C
Exon 5	AmpliTaq Gold	56 °C
Exon 6	AmpliTaq Gold	59 °C
Exon 7	AmpliTaq Gold	56 °C
Exon 8	AmpliTaq Gold	53 °C

Tab. 20 *PCR-Bedingungen der Primer bezogen auf Mutationen außerhalb des AR-Gens*

Gen	Primerpaar	Polymerase	Annealing-Temperatur
ZNF335	11849/11850	AmpliTaq Gold	55 °C
KPNA1	11855/11856	Accuprime	55 °C
CHD7	11858/11859	AmpliTaq Gold	55 °C
RAB3GAP2	11861/11862	AmpliTaq Gold	58 °C
CYP4F12	11864/11865	AmpliTaq Gold	58 °C

7.7 Eigenschaften der Mutationen

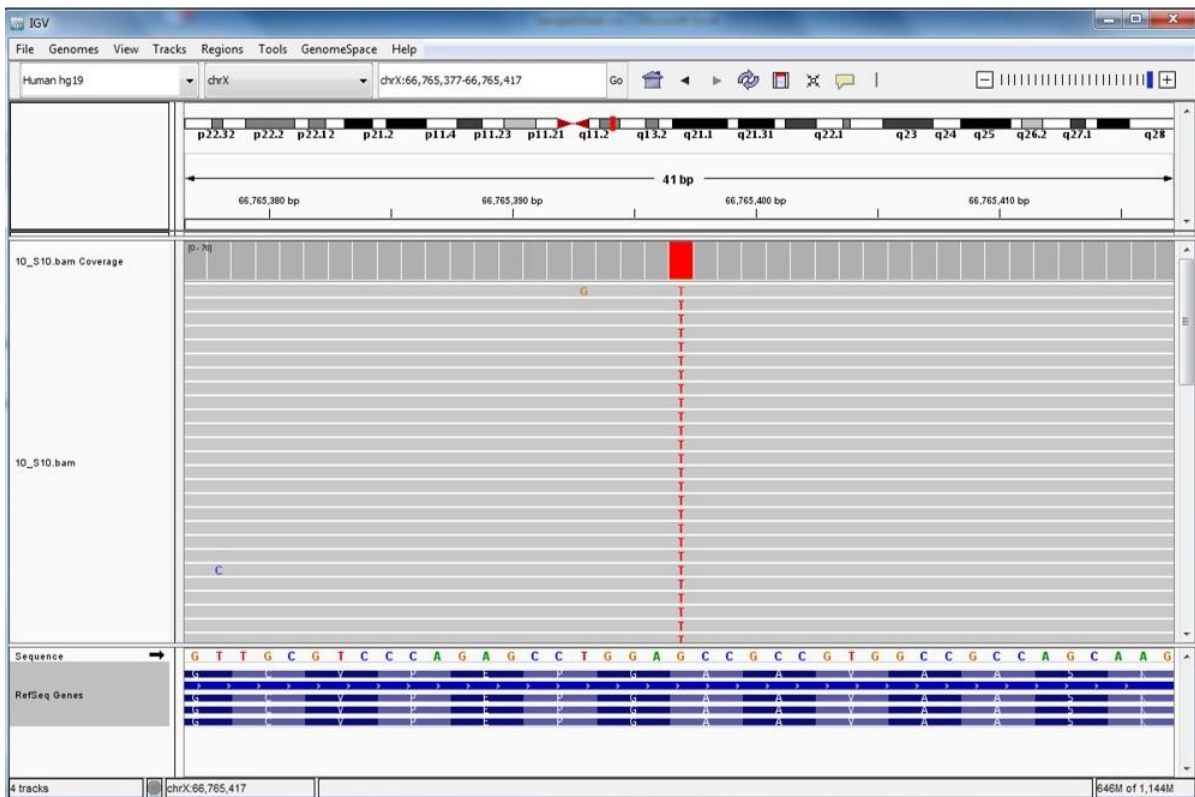
Tab. 21 Eigenschaften der Mutationen im AR-Gen und der Mutationen außerhalb des AR-Gens.

Pat.	Aminosäuren- veränderung	Gen	NM-Nummer	Chr.	Position
1	Spleißmutation	AR	NM_000044.3:c.2173+1G>T	X	66931532
2	P893S	AR	NM_000044.3:c.2677C>T	X	66943597
3	G569V	AR	NM_000044.3:c.1706G>T	X	66863187
4	k. A.	AR	NM_000044 Deletion ab Position 66912908	X	66912908
5	P767fs	AR	NM_000044.4:c.2301delT	X	66937446
6	R847fs	AR	NM_000044.3:c.2541insA	X	66942760
7	A137S	AR	NM_000044.3:c.409G>T	X	66765397
8	S244*	AR	NM_000044.3:c.731C>A	X	66765719
8	V245fs	AR	NM_000044.3:c.734T>A	X	66765722
8	S244*	AR	NM_000044.3:c.731C>A	X	66765719
8	V245fs	AR	NM_000044.3:c.734T>A	X	66765722
9	A597T	AR	NM_000044.3:c.1789G>A	X	66905872
10	E2*	AR	NM_000044.3:c.4G>T	X	66764992
11	R841H	AR	NM_000044.3:c.2522G>A	X	66942741
12	R856C	AR	NM_000044.4:c.2566C>T	X	66942785
13	V867M	AR	NM_000044.3:c.2599G>A	X	66942818
14	N611T	AR	NM_000044.3:c.1832A>C	X	66905915
15	T653fs	AR	NM_000044.3:c.1957delC	X	66931315
16	G569R	AR	NM_000044.3:c.1705G>A	X	66863186
17	A720T	AR	NM_000044.3:c.2158G>A	X	66931516
18	S310fs	AR	NM_000044.3:c.910delC	X	66765916
19	R47Q	KPNA1	NM_002264.3:c.166C>T	3	122186266
19	R1317C	CHD7	NM_017780.3:c.3949C>T	8	61748802
20	G406S	RAB3GAP2	NM_012414.3:c.1216C>T	1	220366636
20	D441E	CYP4F12	NM_023944.3:c.1323C>G	19	15807248
21	V1188I	ZNF335	NM_022095.3:c.3562C>T	20	44578634

AR = Androgenrezeptor, Chr. = Chromosom, k. A. = keine Angabe, Pat. = Patient

7.8 Beispiel für eine gelungene Verifizierung anhand der Mutation von Pat.7

A



B

Patient 7

AR, ChrX, Exon 1 (Seg. 2), Position 66765397,

G>T

Referenz:

A G A G C C T G G A G C C G C C G T G G C

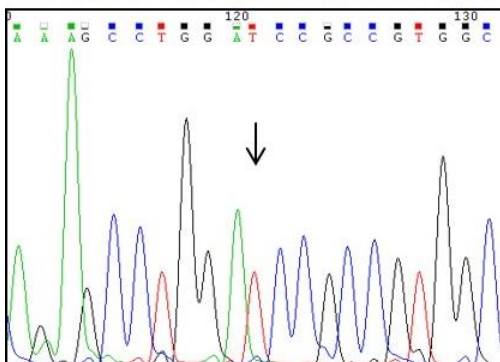


Abb. 30 **Mutation von Pat.7 A:** Zu sehen ist die mit NGS ermittelte Mutation im AR-Gen von Pat.7. An Position 66765397 auf dem X-Chromosom findet sich eine Substitution von Guanin (G, gelb) durch Thymin (T, rot). In der Zeile „Sequence“ ist die Wildtypsequenz mit den Basen Cytosin (C, blau), Adenin (A, grün) sowie Guanin und Thymin dargestellt. **B:** Abgebildet ist ein Auszug aus dem Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung der Probe von Pat.7. Untersucht wurde ein DNA-Abschnitt vom Chromosom X (ChrX) im Exon 1 Segment 2 (Seg.) des AR-Gens, wobei auch hier die Mutation G>T (ChrX, Position: 66765397) gefunden wurde. Adenin (A, grün), Cytosin (C, blau), Guanin (G, schwarz) sowie Thymin (T, rot).

7.9 Elektropherogramme zu den Mutationen innerhalb des AR-Gens

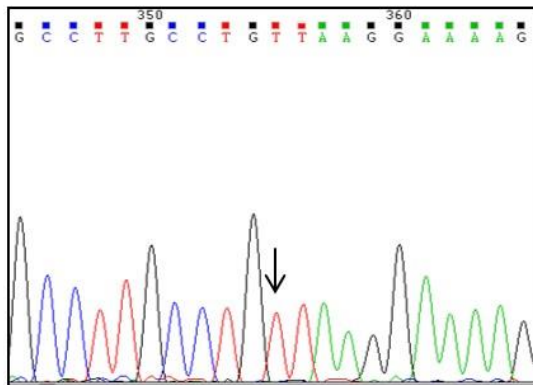
Im Folgenden sind Ausschnitte der Elektropherogramme zu den Sanger-Sequenzierungen der verschiedenen Proben gezeigt. Der Pfeil markiert die Mutation. A = Adenin (grün) AR = Androgenrezeptor, C = Cytosin (blau), ChrX = Chromosom X, G = Guanin (schwarz), T = Thymin (rot)

Patient 1

AR, ChrX, Exon 4, Position 66931532 G>T

Referenz:

G C C T T G C C T G G T A A G G A A A A G

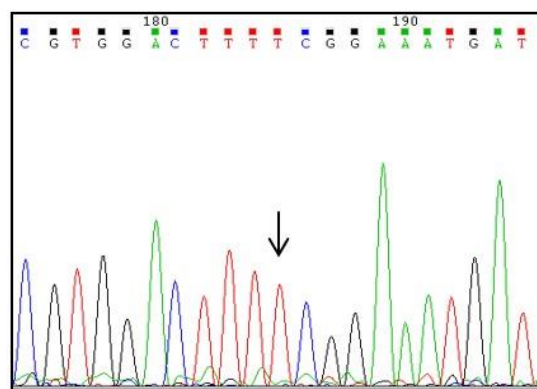


Patient 2

AR, ChrX, Exon 8, Position 66943597, C>T

Referenz:

C G T G G A C T T T C C G G A A A T G A T

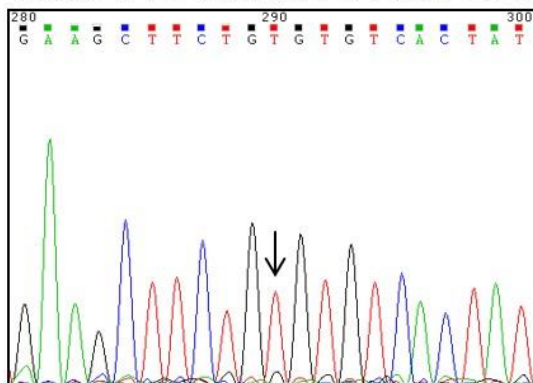


Patient 3

AR, ChrX, Exon 2, Position 66863187, G>T

Referenz:

G A A G C T T C T G G G T G T C A C T A T

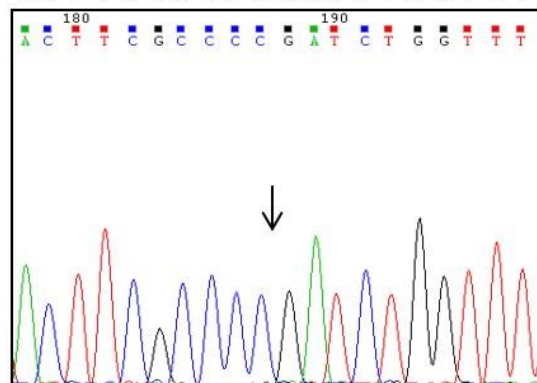


Patient 5

AR, ChrX, Exon 5, Position 66937446, Del T

Referenz:

A C T T C G C C C C T G A T C T G G T T T

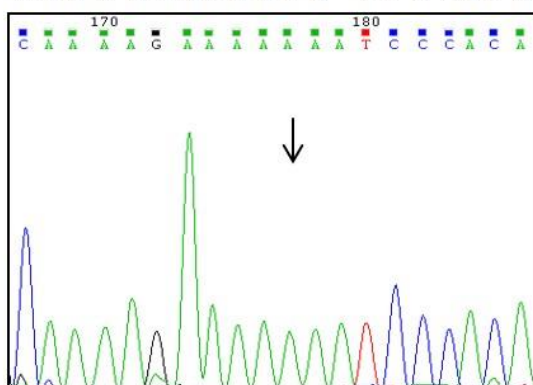


Patient 6

AR, ChrX, Exon7, Position 66942760, Ins A

Referenz:

C A A A A G A A A A A T C C C A C A

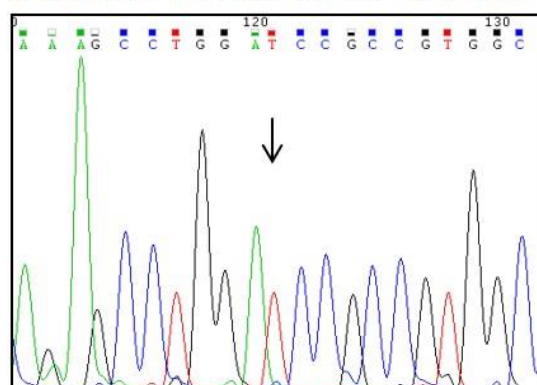


Patient 7

AR, ChrX, Exon 1 (Seg. 2), Position 66765397, G>T

Referenz:

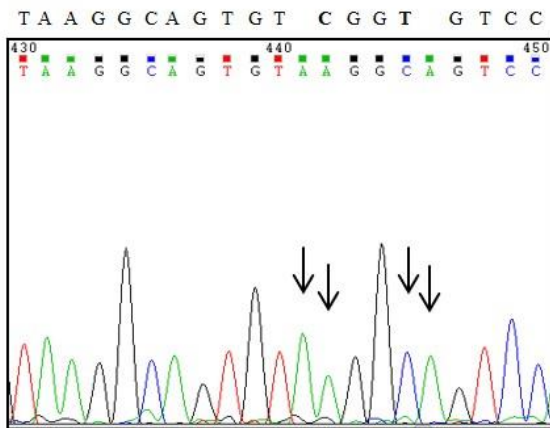
A G A G C C T G G A G C C G C C G T G G C



Patient 8

AR, ChrX, Exon 1 (Seg. 2), Positionen 66765719 und 66765722: Ins A, Ins A, C>A, T>C

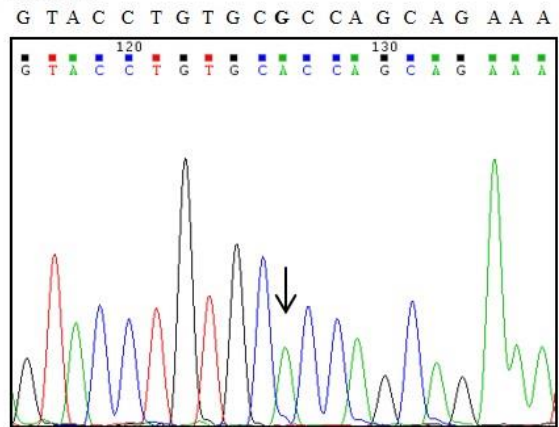
Referenz:



Patient 9

AR, ChrX, Exon 3, Position 66905872, G>A

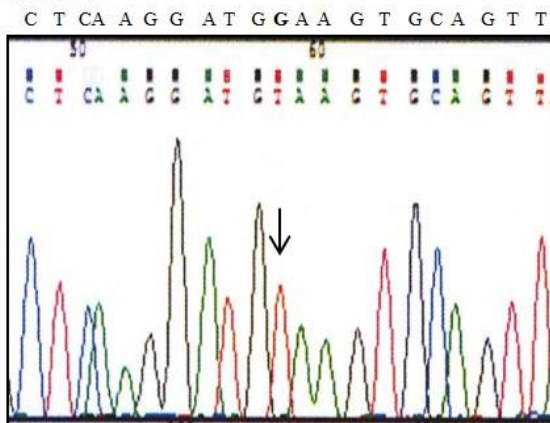
Referenz:



Patient 10

AR, ChrX, Exon 1 (Seg. 1), Position 66764992, G>T

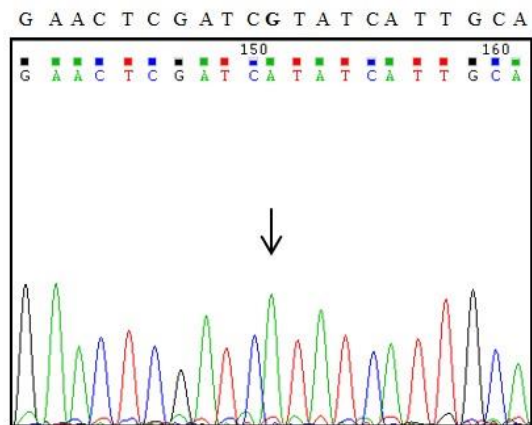
Referenz:



Patient 11

AR, ChrX, Exon 7, Position 66942741, G>A

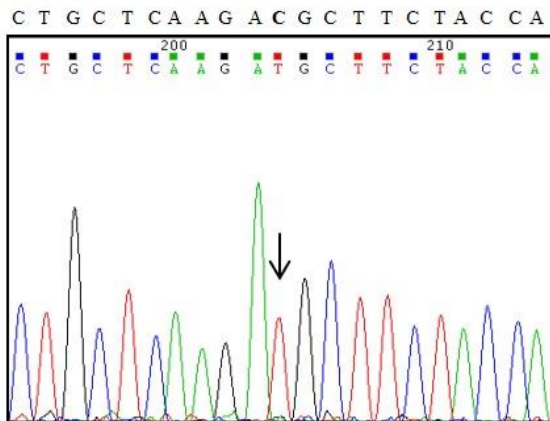
Referenz:



Patient 12

AR, ChrX, Exon 7, Position 66942785, C>T

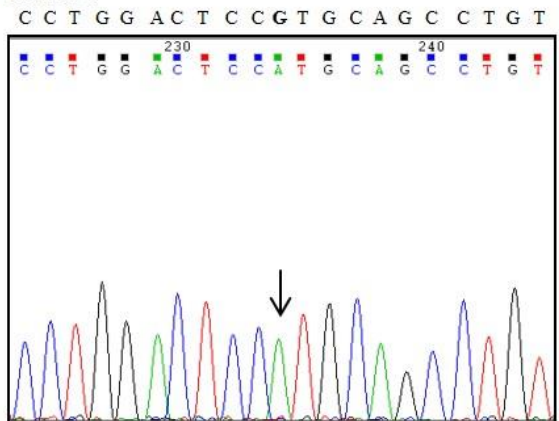
Referenz:



Patient 13

AR, ChrX, Exon 7, Position 66942818, G>A

Referenz:

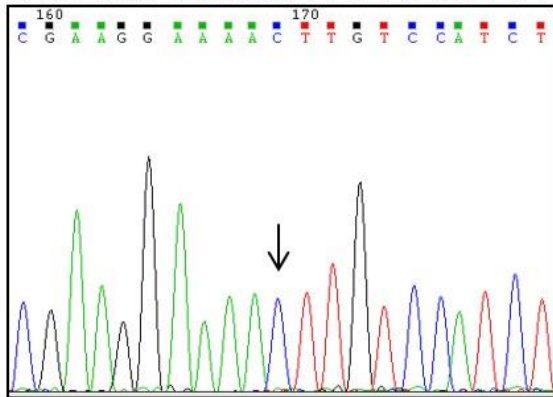


Patient 14

AR, ChrX, Exon 3, Position 66905915, A>C

Referenz:

C G A A G G A A A A T T G T C C A T C T

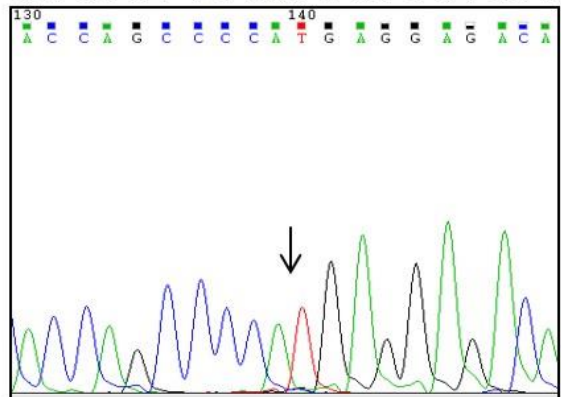


Patient 15

AR, ChrX, Exon 4, Position 66931315, Del C

Referenz:

A C C A G C C C C A C T G A G G A G A C A

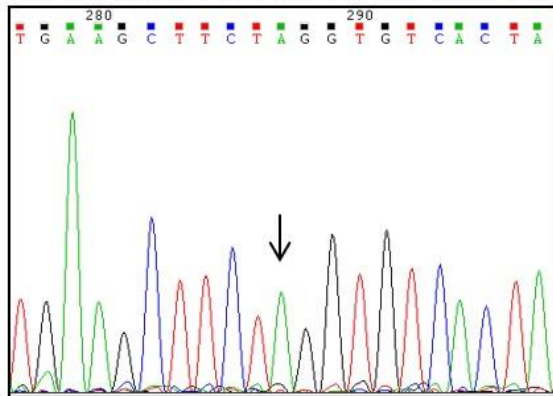


Patient 16

AR, ChrX, Exon 2, Position 66863186, G>A

Referenz:

T G A A G C T T C T G G G T G T C A C T A

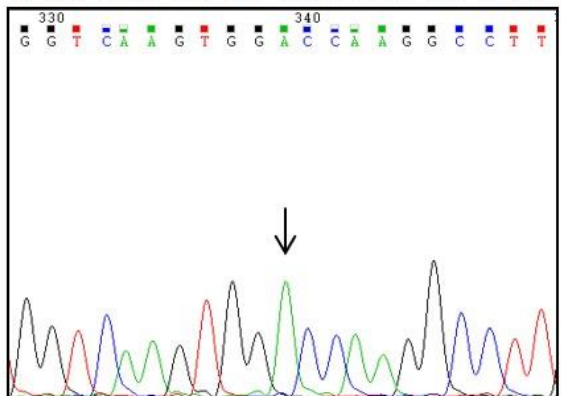


Patient 17

AR, ChrX, Exon 4, Position 66931516, G>A

Referenz:

G G T C A A G T G G G C C A A G G C C T T

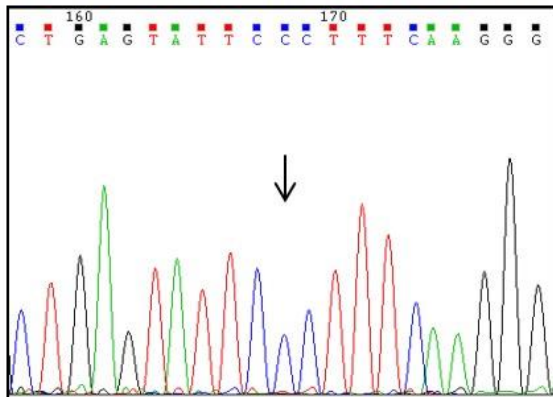


Patient 18

AR, ChrX, Exon1 (Seg. 3), Position 66765916, Del C

Referenz:

C T G A G T A T T C C C T T T C A A G G G



7.10 Elektropherogramme zu den außerhalb des AR liegenden Mutationen

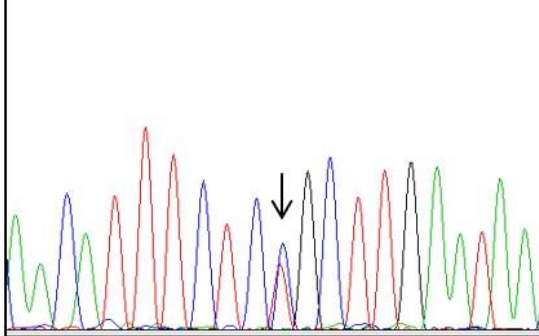
Im Folgenden sind Ausschnitte der Elektropherogramme zu den Sanger-Sequenzierungen der verschiedenen Proben gezeigt. Der Pfeil markiert die Mutation. A = Adenin (grün) AR = Androgenrezeptor, C = Cytosin (blau), Chr = Chromosom, G = Guanin (schwarz), Pos = Position, T = Thymin (rot)

Patient 19

KPNA1, Chr3, Pos 122186266, C>C/T

Referenz:

A A C A T T T C T C C G C T T G A A T A A
 A A C A T T T C T C C G C T T G A A T A A

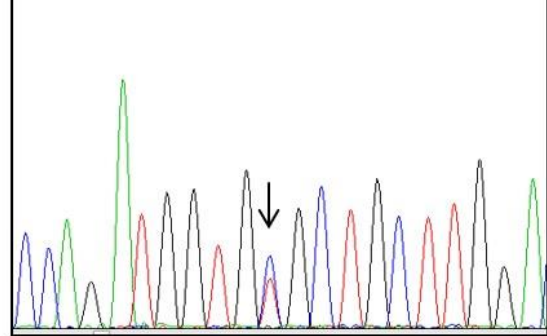


Patient 19

CHD7, Chr8, Pos 61748802, C>C/T

Referenz:

C C A G A T G G T G C G C T G C T T G G A
 C C A G A T G G T G C G C T G C T T G G A

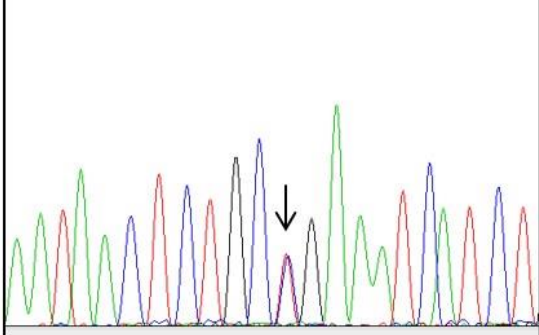


Patient 20

RAB3GAP2, Chr1, Pos 220366636, C>C/T

Referenz:

A A T A A C T C T G C C G A A A T C A T C T
 A A T A A C T C T G C C G A A A T C A T C T

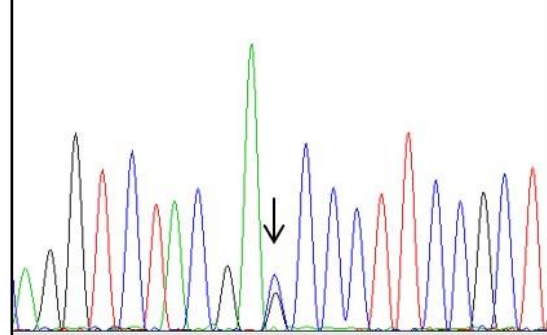


Patient 20

CYP4F12, Chr19, Pos 15807248, C>C/G

Referenz:

A G G T C T A C G A C C C C T T C C G C T
 A G G T C T A C G A C C C C T T C C G C T

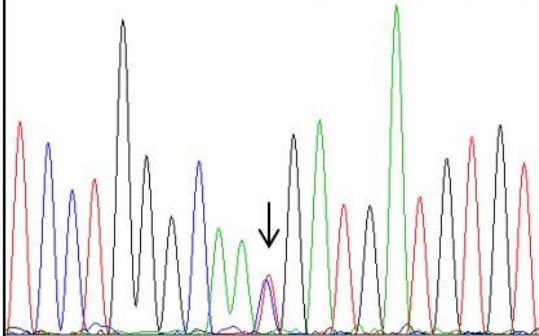


Patient 21

ZNF335, Chr20 Pos 44578634, C>C/T

Referenz:

T C C T G G G C A A C G A T G A T G T G T
 T C C T G G G C A A C G A T G A T G T G T



7.11 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL



A.D. 1665

ETHIK-KOMMISSION

Universitäts-Kinderklinik · Schwannenweg 20 · 24105 Kiel

Prof. Dr. med. P.-M. Holterhus
Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Endokrinologische Ambulanz
UKSH, Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 9
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-53 33
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum:

14.1.2014

AZ.: D 401/14

(bitte stets angeben)

DFG-Sachbeihilfeantrag:

Fortsetzungsantrag, Information und Einwilligungserklärung

In Bezug auf:

AZ.: D 415/11

Studienplan:

Androgenresistenz ohne Androgenrezeptorengenmutation: von der funktionellen Charakterisierung zum Epigenotyp
(In Bezug auf AZ. A 410/08: Investigation of the molecular pathogenesis and patho- physiology of Disorders of Sex Development (DSD) –EuroDSD)

Ihr Antrag vom: 13.1.2014 (Eingang 14.1.2014)

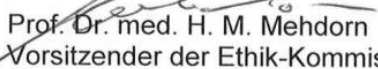
Sehr geehrter Herr Kollege Holterhus,

vielen Dank für Ihren obengenannten Antrag zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Fortführung des Projektes keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Projektleiter und den an der Studie teilnehmenden Ärzten.
3. Nach Abschluss der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


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


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

8 Veröffentlichung

Hornig, N. C., Ukat, M., Schweikert, H. U., Hiort, O., Werner, R., Drop, S. L. S., Cools, M., Hughes, I. A., Audi, L., Ahmed, S. F., Demiri, J., Rodens, P., Worch, L., Wehner, G., Kulle, A. E., Dunstheimer, D., Muller-Rossberg, E., Reinehr, T., Hadidi, A. T., Eckstein, A. K., van der Horst, C., Seif, C., Siebert, R., Ammerpohl, O., Holterhus, P.-M. (2016): Identification of an AR Mutation-Negative Class of Androgen Insensitivity by Determining Endogenous AR Activity. *J Clin Endocrinol Metab*, 4468–4477 (11) 101

9 Danksagung

Bei den praktischen Tätigkeiten im Labor sowie bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation haben mir einige Menschen unterstützend zur Seite gestanden. Ihnen allen gebührt mein herzlichster Dank.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ole Ammerpohl dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit mit diesem spannenden Thema durchzuführen und dass er durch seine Ratschläge zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen hat.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus meinen Dank für die hilfreichen Anmerkungen zu den praktischen sowie schriftlichen Arbeiten im Rahmen dieser Doktorarbeit aussprechen.

Des Weiteren möchte ich Dr. rer. nat. Nadine Hornig außerordentlich danken, dass sie mich an die Laborarbeit herangeführt hat und mich stets mit konstruktiver Kritik und vielen Anmerkungen auch bei der schriftlichen Ausarbeitung unterstützt hat.

Ein besonderer Dank für die große Hilfsbereitschaft bei der Einarbeitung im Labor und bei der praktischen Durchführung der Experimente gilt außerdem den medizinisch-technischen Assistentinnen im Labor des Instituts für Humangenetik. Auch Tanja Stampe und Brigitte Karwelies aus dem kinderendokrinologischen Labor möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich danken.

Im Besonderen danke ich meinen Eltern Kerstin und Uwe Worch, die mir zusammen mit meiner Schwester Jenny Worch, ihrem Lebensgefährten Andy Martin sowie meinem Freund Christian Schmidt immer eine Unterstützung sind.

Außerdem möchte ich mich bei Malena Buck für das aufmerksame Korrekturlesen bedanken.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich des Eides statt, dass ich meine Doktorarbeit selbstständig und ohne fremde unerlaubte Hilfe angefertigt habe und des Weiteren alle von anderen Autoren übernommenen Stellen sowie anlehrende Formulierungen und Gedanken als Quellen gekennzeichnet habe. Außerdem versichere ich, dass die elektronische Form meiner Dissertation mit der schriftlichen Ausführung übereinstimmt und bisher keiner Prüfungskommission als Promotionsleistung vorgelegt wurde.

Dresden, 15.12.2018

L. Worch