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

Untersuchung androgener Steroidhormone in ihrer Metabolisierung sowie deren Einfluss auf die Androgenrezeptor-Aktivität in Genitalhautfibroblasten mit Hilfe des APOD-Assays

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Lea Große-Schute

aus

Münster

Kiel 2024

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Paul-Martin Holterhus, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Dominik M. Schulte, Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.04.2025

gez.: **Prof. Dr. Franziska Theilig**
(Vorsitzende des Promotionsausschusses)

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Untersuchung androgener Steroidhormone in ihrer Metabolisierung sowie deren Einfluss auf die Androgenrezeptor-Aktivität in Genitalhautfibroblasten mit Hilfe des APOD-Assays" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

L. Große-Thuta

Münster, den 24.04.2024 ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis IV

Tabellenverzeichnis V

Abkürzungsverzeichnis VI

1 Einleitung 1

1.1 Geschlechtsentwicklung 1
1.1.1 Geschlechtliche Determinierung 1
1.1.2 Geschlechtliche Differenzierung 2
1.2 Steroidhormone 2
1.2.1 Delta-5-Pathway 3
1.2.2 Backdoor-Pathway 4
1.3 Androgenrezeptor (AR) 5
1.4 Störungen der Geschlechtsentwicklung (DSD) 6
1.4.1 Sinnecker Score 7
1.4.2 Störungen der Androgenwirkung 7
1.4.3 5α-Reduktase-II-Defizienz 8
1.5 Apolipoprotein D 9
1.5.1 APOD-Assay 9
1.6 Fragestellungen 9

2 Material 11

2.1 Geräte 11
2.2 Chemikalien 12
2.3 Verbrauchsartikel 14
2.4 Kits 15
2.5 Oligonukleotide 15
2.5.1 Primer für die SRD5A2-Sequenzierung 15
2.6 Software 15
2.7 Patientenkollektiv und Zellkulturen 15
2.7.1 Zellreihen 15
2.7.2 Bestimmung der 5α-Reduktase-Enzymaktivität 16
2.8 Ethikvotum 17

3 Methoden 18

3.1 Zellkultur 18
3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen 18

3.1.2 Auftauen von Zellen 18
3.1.3 Passagieren von Zellen 18
3.1.4 Einfrieren von Zellen 18
3.1.5 Bestimmung der Zellzahl 19
3.1.6 Aussähen von Zellen in Petrischalen 19
3.1.7 Voruntersuchungen 19
3.1.8 Hormoninkubation 20
3.1.9 Abnehmen von Zellen 21
3.2 RNA-Extraktion und –Messung 21
3.2.1 RNA-Extraktion 21
3.2.2 RNA-Messung 22
3.3 Reverse Transkription 22
3.4 qRT-PCR 23
3.4.1 Prinzip 23
3.4.2 Durchführung 24
3.4.3 Auswertung 24
3.5 Sanger Sequenzierung 25
3.5.1 Prinzip 25
3.5.2 Durchführung 25
3.6 mRNA-Messung 28
3.7 Hormonanalytik 28
3.8 Statistik 29
3.8.1 Wilcoxon-Rangsummentest 29

4 Ergebnisse 30

4.1 APOD-Assay und Sanger-Sequenzierung 30
4.1.1 APOD-Assay der Kontrollzelllinien 30
4.1.2 Sanger-Sequenzierung der Zellen mit V.a. 5α-Reduktase-Mutation sowie qRT-PCR der 5α-Reduktase-Enzyme in den einzelnen Zellen 31
4.1.3 APOD-Assay: Vergleich zwischen Kontrollzelllinien und Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression 35
4.2 Zellüberstand-Messungen 37
4.2.1 Zellüberstand-Messungen: Androstendion vorgelegt 38
4.2.2 Zellüberstand-Messungen: Testosteron vorgelegt 43
4.2.3 Zellüberstand-Messungen: Dihydrotestosteron vorgelegt 47
4.2.4 Zellüberstand-Messungen: Dihydrotestosteron vorgelegt → Androstandiol und Androsteron gemessen 51

5 Diskussion 54

5.1 APOD-Assay der Kontrollzelllinien und der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression 54
5.1.1 Sequenzierung der Zellen mit V.a. 5α-Reduktase-Mutation 55
5.2 Zellüberstand-Messungen 57
5.2.1 Zellüberstand-Messungen: Androstendion vorgelegt 57
5.2.2 Zellüberstand-Messungen: Testosteron vorgelegt 58

5.2.3 Zellüberstand-Messungen: Dihydrotestosteron vorgelegt 59
5.2.4 Zellüberstand-Messungen: Dihydrotestosteron vorgelegt → Androstandiol und Androsteron gemessen 60
5.2.5 Zellüberstand-Messungen: Zusammenfassung 61
5.3 Methoden-Kritik und Ausblick 62

6 Zusammenfassung 65

7 Anhang 67
7.1 Ethikvotum 67
7.2 Variationskoeffizient der Hormonanalytik 71
7.3 Mittelwerte der APOD-Werte sowie der Quotienten der Hormonanalytik 72

8 Literaturverzeichnis 73

9 Danksagung 79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Der delta-5-Pathway der Androgenbiosynthese (Miller and Auchus, 2019) 3
Abbildung 2 Der Delta-5-Pathway sowie der Backdoor-Pathway der Androgen-Biosynthese (Miller and Auchus, 2019) 4
Abbildung 3 Einteilung der Androgenresistenz nach Phänotyp (Sinnecker *et al.*, 1997) 7
Abbildung 4 Versuchsaufbau APOD-Assay 20
Abbildung 5 APOD Expression der Kontrollzelllinien (jeweils der Mittelwert aus zwei Versuchen) 31
Abbildung 6 Kontrollzelllinien verglichen mit Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (jeweils der Mittelwert aus zwei (Kontrollen) bzw. drei (Mutation/Mangel) Versuchen) 37
Abbildung 7 Delta-5-Biosynthesepathway von Androstendion 38
Abbildung 8 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Androstendion 10 nM vorgelegt 41
Abbildung 9 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Androstendion 100 nM vorgelegt 43
Abbildung 10 Delta-5-Biosynthesepathway von Testosteron 43
Abbildung 11 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Testosteron 1 nM vorgelegt 45
Abbildung 12 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Testosteron 10 nM vorgelegt 47
Abbildung 13 Delta-5-Biosynthesepathway von Dihydrotestosteron 47
Abbildung 14 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Dihydrotestosteron 1 nM vorgelegt 49
Abbildung 15 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Dihydrotestosteron 10 nM vorgelegt 51
Abbildung 16 Backdoor-Pathway von Dihydrotestosteron zu Androstandiol und Androsteron 51
Abbildung 17 a-d Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Dihydrotestosteron 1 bzw. 10 nM vorgelegt 53
Abbildung 18 Vereinfachte graphische Zusammenfassung der Zellüberstand-Messungen der Kontrollzelllinien und der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression 62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte für den APOD Assay und die Sequenzierung....11
Tabelle 2 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte für die Hormonanalytik....12
Tabelle 3 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien für den APOD Assay und die Sequenzierung....12
Tabelle 4 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien für die Hormonanalytik....13
Tabelle 5 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Verbrauchsartikel für den APOD Assay und die Sequenzierung....14
Tabelle 6 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Verbrauchsartikel für die Hormonanalytik....14
Tabelle 7 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Kits für den APOD-Assay und die Sequenzierung....15
Tabelle 8 SRD5A2- Primer, von Dr. Ralf Werner, Pädiatrische Endokrinologie, CBBM, Universität zu Lübeck....15
Tabelle 9 Software....15
Tabelle 10 Auflistung der Genitalhautfibroblasten-Zellreihen....16
Tabelle 11 Mastermix Vorbereitung....23
Tabelle 12 Mastermix je Reaktions-Ansatz....24
Tabelle 13 LightCycler Programm für die qPCR....24
Tabelle 14 PCR Reaktionsansatz (HotStarTaq DNA Polymerase)....26
Tabelle 15 HotStarTaq Polymerase – PCR-Programm....26
Tabelle 16 Mastermix (Cycle Sequencing)....27
Tabelle 17 Thermocycler Programm....28
Tabelle 18 Kurzprotokoll Extraktion, SOP des akkreditierten Kinderendokrinologischen Labors des UKSH Kiel, Version 2, 01.11.2017 (S. Olin, 2017)....29
Tabelle 19 Ergebnisse der Sequenzierung der Zelllinien mit V.a. 5α-Reduktase-Mutation....33
Tabelle 20 mRNA der 5α-Reduktase von den Kontrollzelllinien....35
Tabelle 21 Variationskoeffizienten der Hormonanalytik....71
Tabelle 22 Mittelwerte der gemessenen APOD-Werte sowie Mittelwerte der gebildeten Quotienten aus der Hormonanalytik der Zellüberstände in den Kontroll-Zelllinien sowie den Zelllinien mit 5α-RD-Mutation oder geringer 5α-RD-Expression....72

Abkürzungsverzeichnis

AIS	Androgeninsensitivitätssyndrom
AKR1C2	Aldo-Keto-Reduktase-Familie 1, Mitglied C2
AMH	Anti-Müller-Hormon
Andro	Androstendion
APOD	Apolipoprotein D
ARE	Androgen-responsive Elemente
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DBD	DNA-Bindungsdomäne
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
delta4	Androstendion
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DSD	*Disorders of Sex Development*
EtOH	Ethanol
FBS	Fetales Kälberserum
GF	Genitalhautfibroblasten
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
K	Kontrollzelllinien
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression
MW	Mittelwert
Ns	Nicht signifikant
NTB	N-terminale Domäne
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDHA	Succinatdehydrogenase-complex, subunit A
SRD5A2	5α-Reduktase-Typ-II-Gen
SRY	*Sex-determining region Y*
T	Testosteron
t2-	Negativkontroll-Versuchsansatz ohne Inkubation mit einem Hormon für 48 h
3α-HSD	3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
3ß-HSD	3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
17ß-HSD	17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
17-OH-Pregnenolon	17-Hydroxypregnenolon
17-OH-Progesteron	17-Hydroxyprogesteron

1 Einleitung

1.1 Geschlechtsentwicklung

Durch die Verschmelzung von Eizelle und Spermium wird zu Beginn der menschlichen Geschlechtsentwicklung das chromosomale Geschlecht festgelegt. Es entsteht entweder der Karyotyp 46, XY oder der Karyotyp 46, XX (Holterhus, 2009). Danach kann in der Embryonalentwicklung zwischen zwei Abschnitten der Geschlechtsentwicklung unterschieden werden, der geschlechtlichen Determinierung und der geschlechtlichen Differenzierung. Dabei wird die geschlechtliche Determinierung hauptsächlich von Genen kontrolliert, während die geschlechtliche Differenzierung vor allem von Hormonen bestimmt wird (Miller and Auchus, 2019).

1.1.1 Geschlechtliche Determinierung

Der Prozess der geschlechtlichen Determinierung beinhaltet die Entwicklung der zunächst noch bipotenten Gonaden in die Anlage von entweder Hoden oder Ovar (Biason-Lauber *et al.*, 2013). Zu Beginn der Gestation unterscheiden sich die Embryonen der beiden Geschlechter nur durch ihren Karyotyp, da die Gonaden in der sogenannten Genitalleiste als morphologisch indifferente paarige Organe angelegt sind. Zu diesem Zeitpunkt gibt es zwei Gangpaare, die Wolff-Gänge und die Müller-Gänge (Schünke, 2012). Spezifische Gene führen ab der dritten Embryonalwoche zur Entwicklung der Gonadenanlagen in Hoden oder Ovar (Biason-Lauber, 2010; Schünke, 2012). Beim Karyotyp 46, XY beginnt diese Kaskade von Genen mit dem hodendeterminierenden Faktor SRY (sex-determining region Y), welcher sich auf dem Y-Chromosom befindet (Sinclair *et al.*, 1990; Holterhus, 2009; Flück *et al.*, 2011). Das SRY Gen induziert die testikuläre Entwicklung, indem es für das Protein Testisdeterminierender Faktor (TDF) kodiert, welches dann als Transkriptionsfaktor die Expression weiterer autosomaler Gene reguliert (Hiort and Holterhus, 2000). Zu diesen nachgeschalteten Genen gehören z.B. SOX9, WT1, SF1, DMRT1 und CXorf6 (Holterhus, 2009; Biason-Lauber, 2010). Bei der weiblichen Embryogenese sind andere Gene für die Ovarentwicklung verantwortlich. Eines dieser Gene ist das WNT4, das die Leydig-Zellen supprimiert und somit die Hodenentwicklung hemmt (Holterhus, 2009). Ab der 7. Embryonalwoche ist dann die morphologische Unterscheidung der nun geschlechtsspezifischen Gonaden möglich (Schünke, 2012).

1.1.2 Geschlechtliche Differenzierung

Die geschlechtliche Differenzierung beschreibt die Entwicklung der inneren und äußeren Genitale durch den Einfluss von Hormonen. Beim männlichen Karyotyp beginnen im angelegten Hoden die Sertoli-Zellen durch den Einfluss des SRY mit der Produktion des Anti-Müller-Hormons (AMH) und die Leydig-Zellen mit der Bildung von Testosteron (T). Zudem bindet das SF1-Protein an den Promoter des AMH-Gens und aktiviert somit direkt dessen Transkription (Hiort and Holterhus, 2000). Das AMH verhindert die Entwicklung der Müller-Gänge in die weiblichen Genitale (Miller and Auchus, 2019). Für die Entwicklung der Wolff-Gänge in Nebenhoden, Samenleiter, Samenbläschen und Prostata wird T benötigt, dessen Produktion in der frühen Schwangerschaft vom humanen Choriongonadotropin (hCG) kontrolliert wird und später dann vom luteinisierenden Hormon (LH) des Fetus (Siiteri and Wilson, 1974; Biason-Lauber, 2010). Beide Hormone entfalten ihre Wirkung am LH-Rezeptor der Leydig-Zellen, die dann das T bilden (Hiort and Holterhus, 2000; Flück *et al.*, 2011). Während das T für die Entwicklung der Wolff-Gänge benötigt wird, ist Dihydrotestosteron (DHT) für die Virilisierung des äußeren Genitale verantwortlich (Miller and Auchus, 2019). Das Testosteron erreicht die Genitalhaut der Labioskrotalfalten, wo es durch die 5α-Reduktase Typ II in DHT umgewandelt wird. Dieses induziert dann die Entstehung des Penis und der Urethralfalten, sowie die Verschmelzung der Labioskrotalwülste zum Corpus cavernosum und zum Skrotum, die bis zur 12. Woche p.c. abgeschlossen sind (Holterhus, 2009; Biason-Lauber *et al.*, 2013).

Beim weiblichen Karyotyp hingegen werden keine hochkonzentrierten Androgene vom angelegten Ovar produziert (Biason-Lauber *et al.*, 2013). Die Müller-Gänge können sich durch die Abwesenheit vom AMH zu Uterus, Eileiter und oberem Drittel der Vagina entwickeln. Die Wolff-Gänge dagegen bilden sich durch die Abwesenheit von T zurück (Holterhus, 2009; Flück *et al.*, 2011).

1.2 Steroidhormone

Wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, nehmen die Androgene T und DHT eine wichtige Stellung in der Ausbildung des inneren und äußeren männlichen Genitale ein. Abbildung 1 zeigt die Biosynthese der Steroidhormone, zu denen die Mineralokortikoide, die Glukokortikoide und die Geschlechtshormone gehören, ausgehend vom Cholesterin. Aus dem Cholesterin wird durch die Cholesterin-Monooxygenase das Pregnenolon, aus welchem dann durch die Steroid-17α-Hydroxylase das 17- Hydroxypregnenolon (17-OH-Pregnenolon) entsteht. Das gleiche Enzym wandelt das 17-OH-Pregnenolon anschließend in Dehydroepiandrosteron (DHEA) um, aus dem dann die in

dieser Doktorarbeit untersuchten Androgene Androstendion (Andro), T und DHT hervorgehen (Miller and Auchus, 2019).

1.2.1 Delta-5-Pathway

Zunächst wird aus dem DHEA durch die 3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (3ß-HSD2) Androstendion. Aus der Vorstufe Androstendion entsteht im Delta-5-Hormon-Biosyntheseweg dann über die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 3/5 (17ß-HSD3/5) das T, welches anschließend in den Blutkreislauf sezerniert wird. In den Genitalhautfibroblasten wird es aufgenommen und über die 5α-Reduktase Typ 2 letztlich in DHT umgewandelt (Abbildung 1) (Hiort and Holterhus, 2000; Miller and Auchus, 2019).

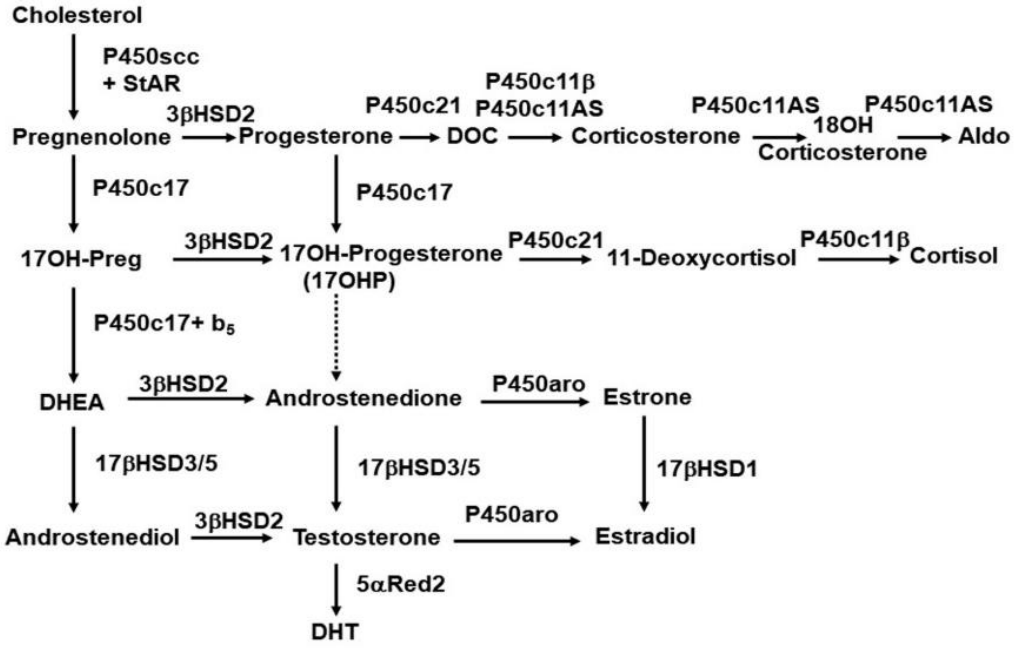


Abbildung 1 Der delta-5-Pathway der Androgenbiosynthese (Miller and Auchus, 2019)

Zusätzlich entsteht das Androstendion zu einem geringeren Anteil auch aus 17-Hydroxyprogesteron (17-OH-Progesteron). Hier entsteht in der Biosynthese zuerst erneut aus Cholesterin durch die Cholesterin-Monooxygenase das Pregnenolon. Dieses wird durch die 3ß-HSD2 zu Progesteron, welches anschließend durch die Steroid-17α-Hydroxylase zunächst zu 17-OH-Progesteron und dann zu Androstendion metabolisiert wird (Hiort and Holterhus, 2000; Kulle *et al.*, 2010).

Das Androstendion als häufigster Vorläufer der Sexualhormone wird sowohl von den Nebennieren als auch von den Gonaden freigesetzt. Die daraus entstehende Bildung von T und die darauf folgende Umwandlung zu DHT im Zielgewebe während der Gestation ist immens wichtig für die in Abschnitt 1.1.2 beschriebene männliche geschlechtliche Differenzierung (Kulle *et al.*, 2010).

1.2.2 Backdoor-Pathway

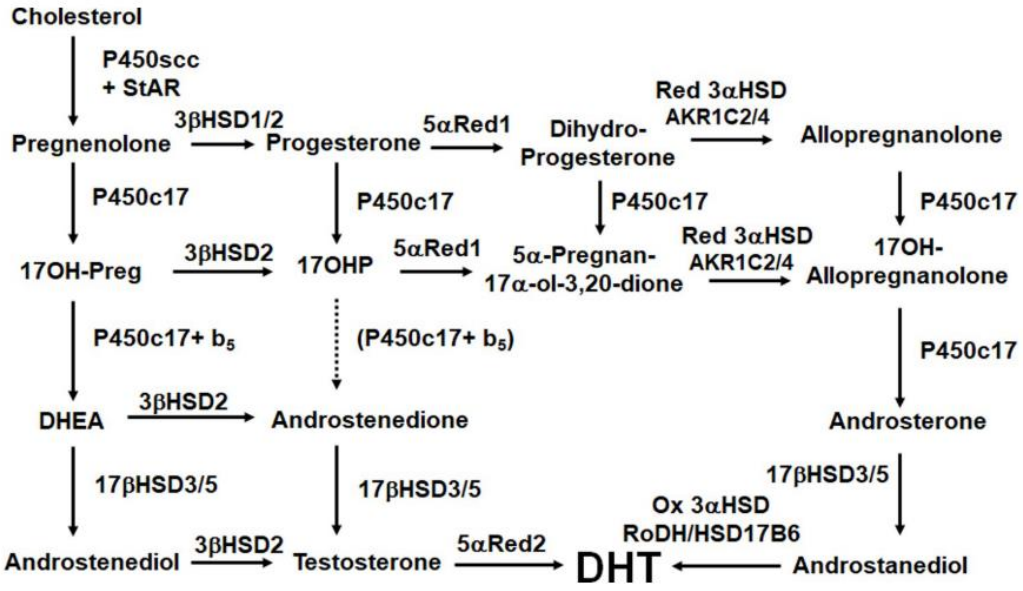


Abbildung 2 Der Delta-5-Pathway sowie der Backdoor-Pathway der Androgen-Biosynthese (Miller and Auchus, 2019)

Neuere Studien zeigen, dass für die Virilisierung der männlichen äußeren Geschlechtsorgane durch DHT-Bildung nicht wie lange angenommen nur der „klassische" Delta-5-Biosyntheseweg von Bedeutung ist, sondern genauso der sogenannte Backdoor-Pathway (Auchus, 2004; Flück *et al.*, 2011; O'Shaughnessy *et al.*, 2019). Es konnte festgestellt werden, dass eine Mutation in dem Enzym Aldo-Keto-Reduktase-Familie 1, Mitglied C2 (AKR1C2), das in der Androgen-Biosynthese ausschließlich im Backdoor-Pathway von Bedeutung ist, genauso zu Störungen der Geschlechtsentwicklung führen kann, wie bei Mutationen von Enzymen aus dem Delta-5-Steroidbiosyntheseweg (Biason-Lauber *et al.*, 2013). Für den Delta-5-Pathway spielen vor allem die Hoden eine wichtige Rolle, in denen das T gebildet wird. Beim Backdoor-Pathway wird jedoch DHT gebildet, ohne über die Zwischenprodukte Androstendion und T zu gehen (O'Shaughnessy *et al.*, 2019).

Abbildung 2 zeigt sowohl den Delta-5- als auch den Backdoor-Pathway. Beim Letzteren findet die Umwandlung von Cholesterin über Pregnenolon zu 17-OH-Pregnenolon genauso statt wie beim Delta-5-Biosyntheseweg. Dieses wird dann allerdings mithilfe der 3ß-HSD2 zu 17-OH-Progesteron, welches über die 5α-Reduktase Typ 1 in 17-Hydroxydihydroprogesteron (5α-Pregnan-17α-ol-3,20-dion) umgewandelt wird. Daraus entsteht im nächsten Schritt durch die Enzyme Aldo-Keto-Reduktase-Familie 1, Mitglied C2 oder C4 (AKR1C2 oder AKR1C4) das 17-Hydroxy-Allopregnanolon, aus dem durch die Steroid-17α-Hydroxylase Androsteron entsteht. Anschließend wird aus dem Androsteron durch die 17ß-HSD3/5 Androstandiol, welches im letzten Schritt durch die 17ß-HSD6 in DHT metabolisiert wird (Miller and Auchus, 2019).

In einer Studie von O'Shaughnessy et al. aus 2019 konnten v.a. hohe T- und Androsteron-Konzentrationen im fetalen männlichen Blutkreislauf gemessen werden, während die DHT-Konzentration im Blutkreislauf nicht messbar war (<1 ng/ml). Die Zwischenstufen des Backdoor-Pathways konnten am meisten in der fetalen Leber und in der Plazenta gemessen werden, während zusätzlich signifikante Androsteron-Konzentrationen auch in der fetalen Nebenniere gemessen wurden. Es scheint, als wäre das Progesteron aus der Plazenta das Substrat für die Synthese der Androgene über den Backdoor-Pathway. Das würde erklären, warum eine Plazenta-Insuffizienz mit Störungen der Geschlechtsentwicklung assoziiert ist. Dagegen waren die Zwischenstufen des Backdoor-Pathways kaum messbar im fetalen Hoden. Die Studie zeigt, dass die Virilisierung des männlichen Fetus nicht nur von der T-Bildung im Hoden abhängig ist, sondern auch von der Androsteron-Synthese im Backdoor-Pathway in nicht-gonodalen Geweben. Beide führen letztendlich zu einer Umwandlung der Vorstufen in DHT in der Genitalhaut (O'Shaughnessy *et al.*, 2019).

1.3 Androgenrezeptor (AR)

Der Androgenrezeptor gehört wie der Östrogen-, Progesteron-, Glukokortikoid- und Mineralkortikoidrezeptor zu den Steroidrezeptoren, die Teil der Familie der Kernrezeptoren sind (Lubahn *et al.*, 1988; Carson-Jurica, Schrader and O'Malley, 1990). Das AR-Gen liegt auf dem langen Arm des X-Chromosoms und besteht aus 8 Exons (Brown *et al.*, 1989; Lubahn *et al.*, 1989).

Wie auch andere Mitglieder der Kernrezeptoren-Familie besteht der Androgenrezeptor aus drei Hauptdomänen: der DNA-Bindungsdomäne (DBD), der N-terminalen Domäne (NTD) und der C-terminalen Liganden-Bindungsdomäne (LBD) (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Der Androgenrezeptor wird durch die Bindung von Liganden wie der Androgene T und DHT aktiviert, bindet an die DNA und kontrolliert so als Transkriptionsfaktor die Expression von Androgen-abhängigen Genprodukten im Zielgewebe (Truss and Beato, 1993; Tan *et al.*, 2015). In der NTD befindet sich die „activation function-1" (AF-1), welche für die Aktivierung des AR essentiell ist (Jenster *et al.*, 1991). Solange der Rezeptor inaktiv ist, ist er an Hitzeschockproteine im Zytosol gebunden. Bindet dann ein Androgen an die LBD des Rezeptors, löst sich die Verbindung zu den Hitzeschockproteinen und es kommt zu Konformationsänderungen des Rezeptors, die für die Dimerisierung des Rezeptors wichtig sind. Mithilfe von Co-Aktivatoren kann der aktivierte Androgenrezeptor in den Zellkern wandern und dort Androgen-responsive Elemente (ARE) der DNA erkennen und mit den zwei Zinkfingern in der DBD daran binden (Koochekpour, 2010; Koryakina, Ta and Gioeli, 2014; Tan *et al.*, 2015; Watson, Arora and Sawyers, 2015). Für den Start der Transkription ist zusätzlich

eine Rekrutierung von Co-Aktivatoren und -Repressoren notwendig (Elshan, Rettig and Jung, 2019).

1.4 Störungen der Geschlechtsentwicklung (DSD)

Störungen der Geschlechtsentwicklung, auch Disorders of Sex Development (DSD) genannt, sind eine heterogene Gruppe von seltenen angeborenen Erkrankungen, bei denen es zu Auffälligkeiten in der Entwicklung des chromosomalen, gonadalen oder anatomischen Geschlechts kommt. Bei ungefähr 1 von 4.500 Lebendgeburten kommt es zu einer DSD (Lee *et al.*, 2006; Ono and Harley, 2013). Man kann die DSD nach ihrem Karyotyp einteilen in 46, XY-DSD, 46, XX-DSD und DSD mit Aberrationen der Geschlechtschromosomen (Erdoan *et al.*, 2011). Bei den 46, XY- bzw. 46, XX-DSD handelt es sich entweder um eine unzureichende Virilisierung der äußeren Genitale von einem 46, XY Fetus z.B. durch unzureichende frühembryonale Androgenbildung oder einer zu starken Virilisierung eines 46, XX Fetus mit unterschiedlich stark ausgeprägter labioskrotaler Verschmelzung, was meist durch eine gestörte geschlechtliche Determinierung oder Differenzierung geschieht (Holterhus, 2009; Paris *et al.*, 2012). Es gibt eine große Breite von Phänotyp-Variationen, die von einer leichten physischen Veränderung bis hin zu gravierenden Störungen mit Konsequenzen für die spätere Funktion der Organe reichen kann (Alhomaidah, McGowan and Ahmed, 2017). Dabei kommt es in ca. 1 von 250 Jungen nur zu leichten Formen der Hypospadie oder zu einem Mikrophallus, in 1 von 20.000 Geburten aber auch zu kompletten Geschlechtsumkehrungen (Baskin, Himes and Colborn, 2001; Ohnesorg, Vilain and Sinclair, 2014; Eggers *et al.*, 2016; Ayers *et al.*, 2019).

1.4.1 Sinnecker Score

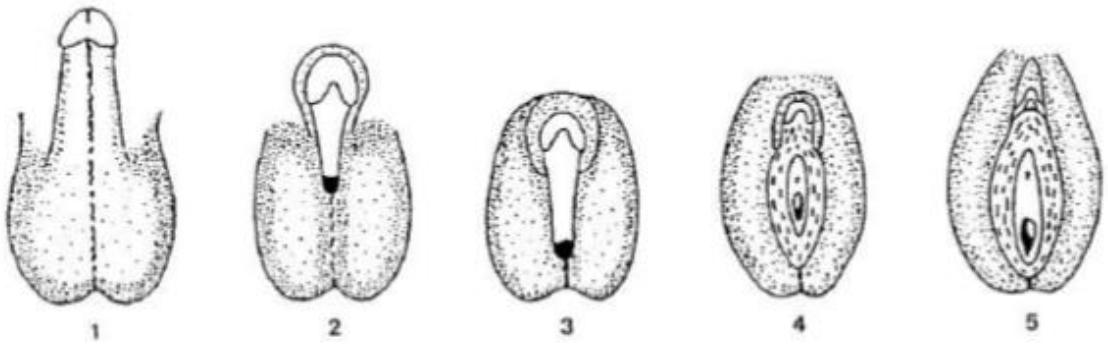


Abbildung 3 Einteilung der Androgenresistenz nach Phänotyp (Sinnecker *et al.*, 1997) (1) Vollständig männliches äußeres Genitale; Spermatogenese und pubertäre Virilisierung können beeinträchtigt sein (2) Überwiegend männlich mit Hypospadie, Mikropenis oder geteiltem Skrotum (3) Ambivalent, Mikrophallus erscheint wie Klitoris, geteiltes Skrotum wie Labia majora, kurzer blind endender Vaginalstumpf (4) Überwiegend weiblich; Klitorishypertrophie, partielle labiale Fusion (5) Vollständig weibliches äußeres Genitale

Der Sinnecker Score beschreibt in fünf Stadien die möglichen Phänotypen der äußeren Genitale beim Androgeninsensitivitätssyndrom (AIS) als einem der häufigsten Beispiele für DSD als Zwischenstufen von männlich und weiblich, wobei ein Score von 1 für vollständig männlich steht und ein Score von 5 für vollständig weiblich. Tatsächlich handelt es sich um ein phänotypisches Kontinuum. Es erleichtert aber eine klinische Zuordnung in unterschiedliche Schweregrade der Störungen der Geschlechtsentwicklung (Sinnecker *et al.*, 1997).

1.4.2 Störungen der Androgenwirkung

Androgene und der Androgenrezeptor spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des männlichen Phänotyps (Lubahn *et al.*, 1988). Störungen der Androgenwirkung im Sinne von Mutationen im AR-Gen oder einer gestörten Androgensynthese führen zu einem breiten Spektrum am Krankheitsbildern wie z.B. dem AIS oder Prostatakarzinomen (Tan *et al.*, 2015).

Beim AIS kann man zwischen dem kompletten (CAIS), dem partiellen (PAIS) und dem minimalen (MAIS) AIS unterscheiden (Jääskeläinen, 2012; Hiort, 2013). Bei dem X-chromosomal-rezessiv vererbten Androgenrezeptordefekt handelt es sich um eines der häufigsten Ursachen für eine 46, XY-DSD (Holterhus, 2009). Trotz normalen oder erhöhten Androgenkonzentrationen kommt es bei den betroffenen Patienten zu einer unzureichenden Virilisierung, die zwischen fast vollständig weiblich und fast vollständig männlich variiert (Hiort, 2013). In über 85 % der Patienten mit CAIS ist der Grund für das Krankheitsbild eine Mutation im AR-Gen. Bei Patienten mit PAIS kann dagegen in weniger als 30 % der Patienten eine Mutation im AR-Gen nachgewiesen werden (Audi *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2013). Häufig gibt es zudem keine klare Korrelation zwischen dem

Genotyp und dem Phänotyp (Paris *et al.*, 2012). Deshalb müssen bisher unbekannte Mechanismen angenommen werden, die letztlich den Phänotyp bei diesem Syndrom bestimmen (Hiort, 2013). Es wird vermutet, dass Co-Faktoren des AR ebenfalls eine große Rolle in der Entstehung eines AIS spielen, falls sie mutiert sind (Hughes *et al.*, 1986; Adachi *et al.*, 2000).

In weiteren Studien wurde schließlich eine AIS-Untergruppe mit reduzierter AR-Aktivität ohne AR-Mutation gefunden, die AIS Typ II genannt wurde (Hornig *et al.*, 2016). Kürzlich konnte erstmals die Rolle von Koaktivatoren als Ursache von AIS Typ II bewiesen werden (Knerr *et al.*, 2023).

1.4.3 5α-Reduktase-II-Defizienz

Die 5α-Reduktase-Enzyme katalysieren die Umwandlung von T zu DHT. Dabei gibt es zwei Isoenzyme, die sich in ihren biochemischen Charakteristiken und ihrer Expression in verschiedenen Gewebearten unterscheiden (Andersson and Russell, 1990). Sie werden als 5α-Reduktase Typ I und Typ II bezeichnet, dessen Gene (SRD5A1 und SRD5A2) sich auf verschiedenen Chromosomen befinden (Thomas *et al.*, 2009). Das für die 5α-Reduktase-Defizienz entscheidende SRD5A2-Gen ist auf dem Chromosom 2 lokalisiert und besteht aus 5 Exons (Wilson, Griffin and Russell, 1993). Während beide Isoenzyme gleichermaßen in der Leber exprimiert werden, wird die 5α-Reduktase Typ II häufiger in der Prostata, den Nebenhoden, der Samenblase und der Genitalhaut exprimiert. Die 5α-Reduktase Typ I findet man dagegen vor allem in der nicht-genitalen Haut (Thigpen *et al.*, 1993).

Wie im Abschnitt 1.1.2 bereits beschrieben, wird für die Entwicklung der äußeren männlichen Geschlechtsorgane eine Umwandlung von T in DHT im peripheren Zielgewebe benötigt (Imperato-McGinley and Zhu, 2002). Dieser Schritt ist bei der 5α-Reduktase-Defizienz meist durch Mutationen im SRD5A2-Gen gestört (Schweikert, Schluter and Romalo, 1989; Wilson, Griffin and Russell, 1993). Die 5α-Reduktase-Defizienz ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die bei Männern mit 46, XY-Karyotyp auftritt (Leshin, Griffin and Wilson, 1978; Lee *et al.*, 2006). Sie geht charakteristischerweise mit normalen T-Konzentrationen im Plasma sowie normal männlichen inneren Genitalien einher. Durch die Störung in der Umwandlung von T zu DHT haben die Patienten allerdings bei Geburt mehrdeutige äußere Genitalien, die von fast vollständig männlich bis zu fast vollständig weiblich reichen (Leshin, Griffin and Wilson, 1978; Imperato-McGinley and Zhu, 2002). In der Pubertät kommt es schließlich bei der Mehrzahl der Patienten zu einer spontanen Virilisierung der äußeren Geschlechtsorgane (Gernot H G Sinnecker *et al.*, 1996; Cohen-Kettenis, 2005).

1.5 Apolipoprotein D

Apolipoprotein D (APOD) ist ein glykolysiertes Protein und Mitglied der Lipocalin-Superfamilie. Die Aminosäure-Sequenz zeigt keine Ähnlichkeit zu anderen Apolipoproteinen (Drayna *et al.*, 1987; Rassart *et al.*, 2020). Lipocaline sind eine heterogene Gruppe aus Proteinen, die von einigen Körperzellen sezerniert werden und die bestimmte hydrophobe Moleküle binden und in die Zelle transportieren (Flower, 2000). Apolipoprotein D wird im Menschen in vielen verschiedenen Geweben wie z.B. in den Nebennieren, dem Pankreas, den Nieren, der Milz, der Plazenta, der Leber und dem Gehirn exprimiert (Drayna *et al.*, 1986). Es ist ein multifunktionales Protein und es konnte eine große Gruppe von potentiellen Liganden unterschiedlicher Struktur identifiziert werden (Rassart *et al.*, 2000). So kann APOD z.B. die Trans-3-Methyl-2-Hexensäure, dem in Männern am häufigsten vorkommenden Achselhöhlen-Duftstoff, der als Pheromon dient, zur Hautoberfläche transportieren (Zeng *et al.*, 1996). Des Weiteren ist APOD involviert in Entzündungsreaktionen, der Regulation der Essensaufnahme, antioxidativen Reaktionen, Neuroprotektion, Lipidtransporten und noch vielen anderen Prozessen (Liu, Chang and Leibowitz, 2001; Muffat and Walker, 2010). In verschiedenen Zelllinien wurde zudem nachgewiesen, dass Androgene die Expression von APOD stimulieren, während Östrogene sie inhibieren (Simard *et al.*, 1990, 1991, 1992).

1.5.1 APOD-Assay

Während in Prostatakarzinom-Zellen viele Androgenrezeptor-Zielgene nachgewiesen werden konnten, sind bisher nur sehr wenige AR-Zielgene in gesundem männlichen Genitalgewebe bekannt. Von diesen zeigt APOD als direktes Transkriptionsziel des AR die stärkste DHT-abhängige Induktion (Appari *et al.*, 2009).

Mit der Etablierung des APOD-Assays bot sich erstmals die Möglichkeit, die DHT-abhängige transkriptionelle Induktion eines AR-Zielgens in humanen Genitalhautfibroblasten zu quantifizieren, ohne eine Transfektion von exogenen Reportergenen zu benötigen (Appari *et al.*, 2009; Hornig *et al.*, 2016).

1.6 Fragestellungen

Es ist bekannt, dass T bei der Ausbildung der inneren männlichen Geschlechtsorgane direkt auf den AR wirkt. Für die äußere Virilisierung wird T jedoch in den Genitalhautfibroblasten normalerweise in das potentere DHT umgewandelt (Miller and Auchus, 2019). Dennoch scheint T auch im peripheren Zielgewebe auf den AR zu wirken, da Patienten mit einem 5α-Reduktase-Mangel, die somit kaum DHT bilden können, bei hohem T-Anstieg trotzdem in der Pubertät virilisieren

(Gernot H G Sinnecker *et al.*, 1996; Cohen-Kettenis, 2005). Dabei ist es zellbiologisch unklar, ob dieses in humanem Genitalgewebe durch T unabhängig von der Umwandlung in DHT geschieht.

Eine direkte aktivierende Wirkung von T und Andro auf den AR wurde bereits in vitro untersucht. Der Nachteil dieser Untersuchungen war, dass sie auf der Transfektion von unterschiedlichen artifiziellen Reportergenkonstrukten basierten, welche in AR-negativen Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen transfiziert wurden. Dies zeigte eine starke Promotorabhängigkeit in der Aktivierung der Reportergenexpression, wobei T und DHT das stärkste Aktivierungspotential aufwiesen (Holterhus, Piefke and Hiort, 2002). Der 2016 neu etablierte APOD-Assay bot erstmals die Möglichkeit, die AR-Aktivierung endogen in den Genitalhautfibroblasten, die das periphere Zielgewebe für die Entwicklung der äußeren Genitale darstellen, mithilfe der APOD-Expression zu messen. Allerdings wurde in dieser Studie zunächst nur die APOD-Expression nach Inkubation mit DHT gemessen (Hornig *et al.*, 2016). In dieser Arbeit wurde nun im APOD-Assay die AR-Aktivierung bei Inkubation sowohl mit DHT als auch mit T und Andro gemessen.

Als wichtige experimentelle Konstellation wurde untersucht, welche Unterschiede sich bei Zellen mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression, in denen kaum T zu DHT metabolisiert werden kann, in der Metabolisierung der gewählten Steroidhormone sowie im APOD-Assay ergeben. Somit ergeben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Können neben DHT auch T und Andro den Androgenrezeptor endogen im humanen peripheren Zielgewebe des äußeren Genitals (APOD-Assay) aktivieren?

   1a Welche Hinweise finden sich aus Funktionsverlust-Mutationen der 5α-Reduktase? (Ausschluss der endogenen Metabolisierung von T zu DHT)

2. Wie werden die ausgewählten Steroidhormone in den GF metabolisiert?

   2a Liegt eine von den Kontrollen differentielle Metabolisierung vor, wenn die 5α-Reduktase mutiert ist?

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 1 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte für den APOD Assay und die Sequenzierung

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	HeraCell150i-CO2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einkanal-Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Elektronische Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Elektrophoresekammer	Modell 41-2026	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, DE
Feinwaage	LC620P	Sartorius AG, Göttingen, DE
Geldokumentation	DeVision DBOX	Decon Science Tec GmbH, Hohengandern, DE
Spektralphotometer	NanoDrop® ND-1000 Spectrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop	n/a	Carl Zeiss , Oberkochen, DE
Mikrowelle	M500	Philips, Hamburg, Deutschland
qRT-PCR System	LightCycler® 480 II	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Sicherheitswerkbank	GELAIRE® BSB 4A	Gelaire Pty Ltd, Sydney, AU
Spannungsquelle	Electrophoresis Powerpack	P24 Biometra, Göttingen, DE
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler®	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Vakuum Arbeitsstation	Vacuum prep workstation	Biotage, Uppsala, SE
Vakuum Pumpe	Vacuum Pump	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA
Vakuum-Verteiler	Vac-Man®	Promega, Fitchburg, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Zählkammer	Neubauer-improved Marienfeld Superior	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen DE
Zentrifugen	AllegraC X-22R	Beckman Coulter, Brea, USA
	Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Sequenzierautomat	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Waltham, USA

Tabelle 2 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte für die Hormonanalytik

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Massenspektrometer	Quattro Premier/Xe	Waters Corporation, Milford, USA
Mehrfachpipette	Mehrfachpipette einstellbar auf 10 µL	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipetten	Pipette für 10 µL/ 200 µl/ 100 µl/ Multipette/ 12-Kanal-pipette	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Vakuum Pumpe	SPE Vakuum Pumpe	Oasis, Waters Corporation, Milford, USA
Folienschweißgerät	Heat Sealer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Flüssigchromatographie-System	Acquity UPLC	Waters Corporation, Milford, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
SPE Extraktions-Platte	SPE Extraktions Plate Manifold Kit A für 96-well Plates	Waters Corporation, Milford, USA

2.2 Chemikalien

Tabelle 3 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien für den APOD Assay und die Sequenzierung

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Biozym LE Agarose	Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Androstendion	Androstendion (CAS-Nr. 63-05-8)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Dihydrotestosteron	Dihydrotestosteron (CAS-Nr. 521-18-6)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
DNA-Farbstoff	6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNA Längenmarker	GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
dNTP-Mix	100 mM dNTP Set	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Einfriermedium	Recovery Cell Culture Freezing Medium	Life Technologies™, Carlsbad, USA
Ethanol	Ethanol Absolut	J.T. Baker®, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Ethidiumbomide solution, 1 % (10mg/ml)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Fetales Kälberserum	FBS superior	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Laufpuffer	Ultra Pure 10x TBE Buffer	Life Technologies™, Carlsbad, USA
L-Glutamin	L-Glutamine 100x, 200 mM	Biowest, Nuaillé, FR

Lyse Puffer	RLT Buffer	Qiagen, Hilden, DE
Nährmedium	Dulbecco‘s Modified Eagle Medium	Life Technologies™, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	Penicillin/Streptomycin	Life Technologies™, Carlsbad, USA
Primer für qRT-PCR	SDHA-Primer	Qiagen, Hilden, DE
	APOD-Primer	Qiagen, Hilden, DE
Puffer	HEPES Buffer Solution, 1M	Life Technologies™, Carlsbad, USA
Testosteron	Testosteron (CAS-Nr. 58-22-0)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Trypsin	Trypsin-EDTA 10x	Biowest, Nuaillé, FR
Wasser	Ampuwa	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg v.d.H., DE
Waschpuffer	Gibco™ PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) (1X) pH 7.4	Life Technologies™, Carlsbad, USA

Tabelle 4 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien für die Hormonanalytik

Chemikalie	**Bezeichnung**	**Hersteller**
Acetonitril	Acetonitril, LCMS Chromasolv	Honeywell, Offenbach, DE
Aktivkohle	Norit A	Serva, Heidelberg, DE
Ameisensäure	Ameisensäure, LCMS grade	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Ammoniak	Ammoniumhydroxidlösung LCMS	Fluka, Seelze, DE
Androstandiol	Androstandiol (CAS-Nr. 1852-53-5)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Androstendion	Androstendion (CAS-Nr. 63-05-8)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Androsteron	Androsteron (CAS-Nr. 53-41-8)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Dihydrotestosteron	Dihydrotestosteron (CAS-Nr. 521-18-6)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Ethanol	Ethanol, LCMS Chromasolv	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Interner Standard	17-Hydroxyprogesteron D8 98%	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA
Isopropanol	Isopropanol, LCMS Chromasolv	Fluka, Seelze, DE
Methanol	Methanol, LCMS Chromasolv	Honeywell, Offenbach, DE
Phosphorsäure	Phosphorsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Plasma	Plasma FFP	Transfusionsmedizin
Testosteron	Testosteron (CAS-Nr. 58-22-0)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Wasser	Wasser, LCMS Chromasolv	Th. Geyer, Renningen, DE

2.3 Verbrauchsartikel

Tabelle 5 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Verbrauchsartikel für den APOD Assay und die Sequenzierung

Artikel	Bezeichnung	Hersteller
Aufreinigungs-säulen	illustra™ Microspin G-50 Columns	GE-Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
Einfriergefäße	Cryotubes Cryo S ™ 2 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT
Klebefolie	Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Kulturflasche	TC-Flasche T25/T75/T175, Standard	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Objektträger	Objektträger (76x26mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Pasteurpipette	Assistent® Glaswarenfabrik	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, DE
PCR Platten	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips Serological Pipette	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reagiergefäße	0,2 ml Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reagiergefäß	Reagiergefäß, 1,5 ml/2 ml/3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Sequenzierplatte	PSQ™ Plate 96	Biotage, Uppsala, SE
Transferpipette	Transferpipette, 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Röhre	Schraubröhre 15 ml/50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturschale	TC-Schale 60, Standard	Sarstedt, Nürnberg, DE

Tabelle 6 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Verbrauchsartikel für die Hormonanalytik

Artikel	Bezeichnung	Hersteller
Auffangplatte	Oasis Collection Plate 700 µl/2 ml	Waters Corporation, Milford, USA
Dispenserspitzen	Combitips Plus 0,5 ml/ 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Elutionsplatte	Oasis MAX µ Elution Plate 30 µm	Waters Corporation, Milford, USA
Folie	Heatsealer	Waters Corporation, Milford, USA
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips Serological Pipette	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reagiergefäß	Reagiergefäß, 1,5 ml/2 ml/3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE

2.4 Kits

Tabelle 7 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Kits für den APOD-Assay und die Sequenzierung

Kit	Hersteller
HotStarTaq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden, DE
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden DE
QuantiNova® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, DE
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE

2.5 Oligonukleotide

2.5.1 Primer für die SRD5A2-Sequenzierung

Tabelle 8 SRD5A2- Primer, von Dr. Ralf Werner, Pädiatrische Endokrinologie, CBBM, Universität zu Lübeck

SRD5A2 Exon 1	Forward	5' -GGCGCTCCATAAAGGGGTTGC- 3'
SRD5A2 Exon 2	Forward	5' -GTTAAGGCGAAATGGCAGAGC- 3'
SRD5A2 Exon 3	Reverse	5' -AGCCGATTCCAACCCTACTCAA- 3'
SRD5A2 Exon 4	Forward	5' -AGGCCACTCTTCGCAACTCCAG- 3'
SRD5A2 Exon 5	Forward	5' -CGAAATAGTCAGGCCCAAAATAAC- 3'

2.6 Software

Tabelle 9 Software

Software	Hersteller
Chromas Lite 2.6.6	Technelysium, Australien
R-Software	R Core Team, 2017, Österreich
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, 2020, USA
Excel	Microsoft Corporation, 2019, USA

2.7 Patientenkollektiv und Zellkulturen

2.7.1 Zellreihen

Die Kontrollproben wurden nach informed consent für die Forschung verwendet. Die historischen Patientenproben stellen vollständig anonymisierte Zellkulturen dar (s. Ethikvotum unter 2.8).

Tabelle 10 Auflistung der Genitalhautfibroblasten-Zellreihen

Zellreihe	Anatomischer Ursprung	Anatomischer Phänotyp äußeres Geschlecht/ Sinnecker Score	Alter bei Biopsie (Jahre)	AR-Gen Mutationsstatus
GF-6 (Kontrolle)	Skrotum	1	43,18	AR Mutationsnegativ
GF-8 (Kontrolle)	Skrotum	1	42,37	AR Mutationsnegativ
GF-9 (Kontrolle)	Skrotum	1	48,76	AR Mutationsnegativ
GF-35 (Kontrolle)	Skrotum	1	0,88	AR Mutationsnegativ
GF41 (Kontrolle)	Skrotum	1	0,99	AR Mutationsnegativ
GF-52	Genitalhaut	3	0,5	AR Mutationsnegativ
GF-53	Labia majora	4	0,58	AR Mutationsnegativ
GF-54	Genitalhaut (vermutlich Labioskrotalhaut)	4	13,5	AR Mutationsnegativ
GF-55	Skrotum		4,15	AR Mutationsnegativ
GF-56	Labia majora	4	2,69	AR Mutationsnegativ
GF-57	Labioskrotalhaut	4	14,41	
GF-145	Präputium	2-3	4,18	AR Mutationsnegativ
GF-240	Labia minora		27,24	AR Mutationsnegativ
GF-241	Skrotalhaut	2-3	1,25	AR Mutationsnegativ
GF-242	Hodengewebe		2,04	AR Gen nicht untersucht

2.7.2 Bestimmung der 5α-Reduktase-Enzymaktivität

Bei den Zellreihen GF-52, GF-53, GF-54, GF-55, GF-56, GF-57, GF-145, GF-240, GF-241 und GF-242 handelt es sich um Zelllinien, bei denen zuvor im Labor von Prof. Dr. Hans-Udo Schweikert in der Universität Bonn eine verringerte 5α-Reduktase-Enzymaktivität gemessen wurde. Allerdings wurde zuvor keine 5α-Reduktase-Mutation nachgewiesen.

Die 5α-Reduktase-Enzymaktivität wird angegeben in pmol/h/mg Protein und sollte normalerweise über 1 pmol/h/mg Protein liegen. Je kleiner der Wert, desto weniger Substrat wird in einer

Stunde umgewandelt. In dem Assay wird radioaktives T zu den Zellen gegeben und nach einer Stunde gemessen, wieviel pmol DHT entstanden ist.

Teilweise lag die Enzymaktivität der Zelllinien zwar noch im Normbereich, allerdings trotzdem in einem sehr niedrigen Bereich (s. Tabelle 19) (Leshin, Griffin and Wilson, 1978; Schweikert, Schluter and Romalo, 1989).

2.8 Ethikvotum

Die Verwendung von Genitalhautfibroblasten in anonymisierter Form zur Untersuchung der Androgen-regulierten Genexpression wurde von der Ethikkomission der Universität Kiel bewilligt (Aktenzeichen D401/14, D552/16, D421/14, D).

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Sämtliche Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO2-Sättigung kultiviert. Es wurden alle Arbeiten steril ausgeführt. Als Kulturmedium wurden 450 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 50 ml fetalem Kälberserum (FBS), 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 10 ml 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer verwendet und die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen ausgesät.

3.1.2 Auftauen von Zellen

Nachdem die Einfriergefäße mit den eingefrorenen Zellen aus dem Stickstofftank genommen wurden, wurden die Zellen zunächst für 30 Sekunden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend mit Hilfe einer Kunststoff-Transferpipette rasch in einem 15 ml Röhrchen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Das 15 ml Röhrchen wurde für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt, sodass nur noch das Pellet am Boden des Röhrchens übrig blieb. Dieses wurde nun mit 10 ml Kulturmedium gelöst und in eine T75 Zellkulturflasche gegeben.

3.1.3 Passagieren von Zellen

Zellen wurden passagiert, sobald sie am Boden der Zellkulturflasche eine Konfluenz von 80-90 % erreichten. Dabei wurde zunächst das Medium aus der Flasche abgesaugt, dann wurden die Zellen mit 10 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die PBS-Lösung wurde ebenfalls abgesaugt und bei den T175 Zellkulturflaschen wurde 1,5 ml Trypsin auf die Zellen gegeben, bei den T75 Zellkulturflaschen 1 ml Trypsin, bevor sie für vier Minuten zurück in den Brutschrank gestellt wurden. Durch das Spalten von Proteinen durch das Enzym Trypsin lösen sich die Adhäsionen der Zellen, welche in Suspension übergehen. Nach vier Minuten wurden die letzten Adhäsionen durch Klopfen an der Flasche gelöst und die Reaktion wurde durch 10 ml Kulturmedium gestoppt. Nun konnten die Zellen entweder 1:2 oder 1:3 gesplittet werden.

3.1.4 Einfrieren von Zellen

Nicht mehr benötigte Zellen wurden erneut ausgesät, bis sie 90-100% konfluent und wie in 3.1.3 trypsinisiert waren. Anschließend wurden sie mit 10 ml Kulturmedium in ein 15 ml Röhrchen

gegeben, welches für 5 min bei 1000 U/m in die Zentrifuge gestellt wurde, wodurch sich ein Pellet aus Zellen am Boden bildete. Das überschüssige Medium wurde abgesaugt und anschließend das Pellet in 1 ml Gefriermedium resuspendiert und in ein 2 ml Einfriergefäß gegeben, welches direkt auf Trockeneis gestellt wurde. Zunächst wurden die Einfriergefäße in einer -80 °C Truhe aufbewahrt und dann im Stickstofftank langfristig gelagert.

3.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl pro ml bestimmen zu können, mussten die Zellen wie in 3.1.3 beschrieben durch Trypsin gelöst werden und anschließend so in Zellkulturmedium resuspendiert werden, dass die Zellen vereinzelt vorlagen. Dann wurden ca. 20 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter das Mikroskop gelegt. Dort wurden die Zellen in vier Großquadraten mit jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt und die Zellzahl anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellzahl}/4 \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$$

3.1.6 Aussähen von Zellen in Petrischalen

Zum Aussähen wurden die Zellen wie in 3.1.5 beschrieben ausgezählt. Pro 6 cm Petrischale wurden $1{,}65 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Danach kamen die Zellen für 24 h in den Brutschrank.

3.1.7 Voruntersuchungen

Erste kurze Voruntersuchungen wurden mit der GF-Kontrollzelllinie Kis6 durchgeführt, indem ich im APOD-Assay und in der anschließenden Hormonanalytik der Zellüberstände untersucht habe, nach wie vielen Stunden der Inkubation sich Andro kaum noch zu T und T sich kaum zu DHT umgewandelt hat. Nach Zusammenschau der Ergebnisse wurde beschlossen, die Zelllinien im APOD-Assay für 48 h zu inkubieren.

Zudem wurden verschiedene Hormonkonzentrationen zur Inkubation im APOD-Assay getestet. Es zeigte sich, dass man bei Andro höhere Konzentrationen benötigt, um eine APOD-Induktion zu erreichen, sodass dort die beiden Konzentrationen 10 und 100 nM im Vergleich zu 1 und 10 nM bei T und DHT gewählt wurden.

3.1.8 Hormoninkubation

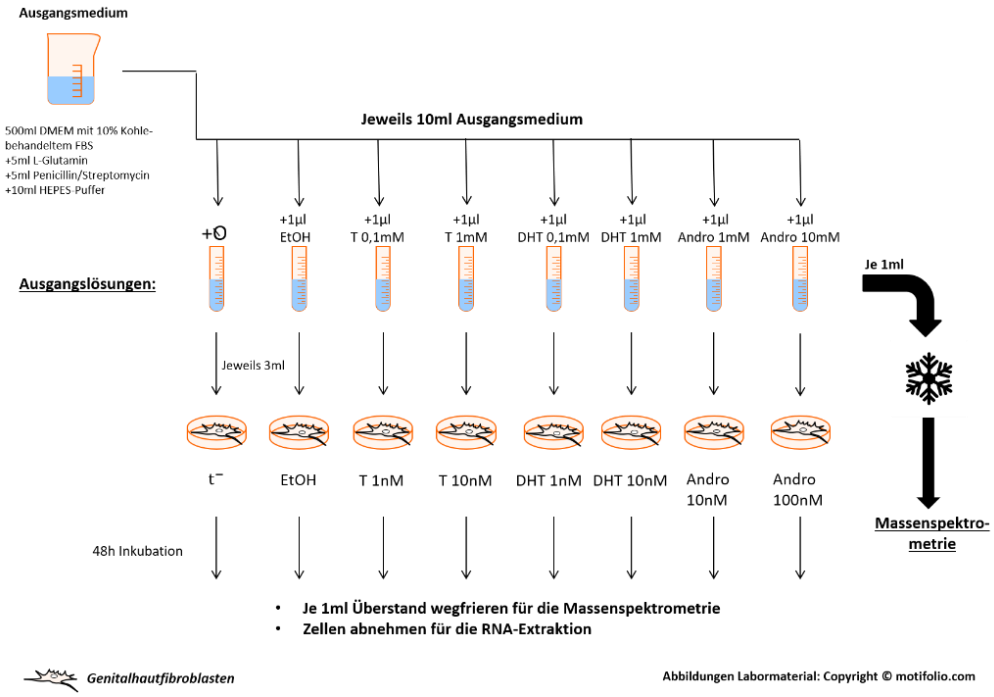


Abbildung 4 Versuchsaufbau APOD-Assay

Für die Hormoninkubation wurde ein Medium verwendet, bei dem das FBS mit Kohle bearbeitet wurde, um alle Hormone aus dem Medium zu entfernen. Das Kohle-behandelte FBS wurde hergestellt, indem man 100 ml FBS mit 1 g Aktivkohle bei Raumtemperatur ca. 6-12 h rührte und danach bei 14.000 rpm abzentrifugierte. Dieser Vorgang wurde 3 x wiederholt und dann wurde das FBS mit der Aktivkohle mittels eines Vacuflo-Filters filtriert. Zum Schluss wurde die Lösung auf seine Steroidkonzentration am Tandem-Massenspektrometer analysiert, wobei alle Hormone unter der Bestimmungsgrenze (limit of quantification) liegen sollten. 500 ml DMEM wurden mit 50 ml Kohle-behandeltem FBS (10 %), 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 10 ml HEPES-Puffer versetzt. Anschließend wurden je 10 ml dieses Mediums mit 1 µl des jeweiligen Hormons mit den Ausgangskonzentrationen 0,1 und 1 mM bei DHT und T bzw. 1 und 10 mM bei Andro gut vermischt. Zum Waschen der Zellen wurde ein weiteres Medium erstellt, bei dem das DMEM mit 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 10 ml HEPES-Puffer vermengt wurde.

24 h nach dem Aussähen in die 6 cm Petrischalen wurden die Zellen aus dem Brutschrank genommen. Die Zellen hatten eine Konfluenz von 60-70 %. Dann wurde das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend dreimal mit je 3 ml des Waschmediums gewaschen, welches jedes Mal wieder abgesaugt wurde. Anschließend wurden 3 ml des erstellten Inkubationsmediums mit dem jeweiligen Hormon auf die Petrischale gegeben und die Schale leicht geschwenkt. In dieser Doktorarbeit

wurden für den APOD-Assay DHT und T jeweils in den End-Konzentrationen 1 und 10 nM verwendet sowie Andro in den Konzentrationen 10 und 100 nM. Die Petrischalen wurden nun für eine Inkubationszeit von 48 h zurück in den Brutschrank gestellt (Abbildung 4).

Für jeden Versuchsansatz wurden zusätzlich eine Petrischale zur Kontrolle als t2- nur mit 3 ml des 10 % kohlebehandelten FBS Mediums ohne Hinzufügen eines Hormons inkubiert, sowie eine Petrischale mit 1 µl EtOH, dem Lösungsmittel der Hormone. Diese beiden Petrischalen wurden zur gleichen Zeit mit den anderen Schalen nach der jeweiligen Inkubationszeit abgenommen.

Von jeder Inkubationsmedium-Hormon-Mischung wurde 1 ml in ein 1,5 ml Röhrchen umgefüllt und bei -20 °C aufbewahrt, um sie später zusammen mit den Zellüberständen im Massenspektrometer als Ausgangslösung untersuchen zu können.

3.1.9 Abnehmen von Zellen

Nach der vorgegebenen Inkubationszeit wurden die Zellen aus dem Brutschrank genommen und jeweils 1 ml Zellkulturüberstand pro Petrischale in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben, welche wie die bereits vorher eingefrorenen Hormoninkubationsmedien bei -20 °C aufbewahrt wurden. Im Anschluss wurde das Medium in den Petrischalen abgesaugt, wobei für jede Schale eine neue Glaspipette genommen wurde. Die Zellen wurden danach mit jeweils 600 µl RLT-Puffer (Qiagen) lysiert, in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben und direkt auf Trockeneis gestellt. Für die längere Aufbewahrung wurden die Röhrchen anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2 RNA-Extraktion und –Messung

3.2.1 RNA-Extraktion

Als nächsten Schritt musste die RNA aus den lysierten Zellen extrahiert werden. Hierzu wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Zunächst wurden die bei -80 °C eingefrorenen Röhrchen aufgetaut und pro Probe jeweils ein 1,5 ml Auffangröhrchen und ein 2 ml Röhrchen mit einer RNeasy-Mini-Zentrifugiersäule beschriftet. Dann wurden je 600 µl 70 % Ethanol zu dem Lysat gegeben, gut vermischt und nacheinander jeweils die Hälfte der Lösung auf eine RNeasy-Mini-Zentrifugiersäule pipettiert, welche dann jeweils für mindestens 15 sek bei mindestens 8.000 x g zentrifugiert wurde. Nach dem Zentrifugieren musste jedes Mal der Durchfluss, der sich in dem 2 ml Röhrchen gesammelt hatte, weggeworfen werden. Im nächsten Schritt wurden 700 µl RW1 Puffer dazugegeben und die Mini-Zentrifugiersäule wieder für 15 sek bei mindestens 8.000 x g zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, kamen 500 µl RPE Puffer auf die

Membran der Filtersäule, die wiederum für 15 sek bei mindestens 8.000 x g zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, diesmal wurde allerdings für 2 min bei mindestens 8.000 x g zentrifugiert und die Mini-Zentrifugiersäule anschließend in ein neues 2 ml Auffangröhrchen platziert, welches diesmal bei voller Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert wurde, um die Membran zu trocknen. Im Anschluss wurde die Filtersäule in das zuvor beschriftete 1,5 ml Auffangröhrchen gestellt und es wurden 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben. Abschließend wurde das Röhrchen ein letztes Mal für 1 min bei mindestens 8.000 x g zentrifugiert. Die Röhrchen mit der eluierten RNA wurden direkt auf Eis gestellt und die Filtersäulen verworfen.

3.2.2 RNA-Messung

Nach der RNA-Extraktion wurde die RNA-Konzentration gemessen. Dazu wurde ein Spektralphotometer, der Nano-Drop, verwendet. Für die Leermessung wurden 2 µl Wasser auf den Nano-Drop pipettiert. Danach wurden jeweils 2 µl einer Probe, die zuvor mit dem Vortexer gemischt wurde, auf das Gerät gegeben und damit die RNA-Konzentration in ng/µl gemessen. Eine Ratio der Extinktionsmessungen bei 260 nm und 280 nm von 2,0 spricht für eine gut aufgereinigte RNA und wurde stets kontrolliert.

3.3 Reverse Transkription

Für die spätere qPCR wurden 500 ng RNA zunächst mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transkription Kit von Qiagen in cDNA umgeschrieben. Mit folgender Formel wurde berechnet, wieviel µl RNA eingesetzt werden musste:

Einzusetzende RNA-Probe (µl) = 500 ng/RNA-Konzentration (ng/µl)

Die RNA musste die gesamte Zeit auf Eis gelagert werden und die Proben wurden ebenfalls alle auf Eis pipettiert. Zuerst wurden für jede Probe ein 0,5 ml Röhrchen und ein 1,5 ml Röhrchen für den Mastermix beschriftet. Dann wurde in jedes 0,5 ml Röhrchen zunächst die für die Probe errechnete Wassermenge pipettiert und anschließend die RNA-Menge, wobei die RNA vorher durch kurzes Vortexen gemischt wurde. Anschließend wurde in jedes Röhrchen 2 µl cDNA Wipeout Puffer gegeben, um verbliebende DNA zu entfernen, und die Proben kurz zentrifugiert. Diese wurden dann in den Mastercycler gestellt, wo die DNAse-Reaktion für 5 min bei 42°C ablief. In der Zwischenzeit wurde der Mastermix nach dem Schema aus Tabelle 11 erstellt, wobei die Reverse Transkriptase (RT) zuletzt direkt aus dem -20 °C Kühlfach genommen und hinzu pipettiert wurde.

Tabelle 11 Mastermix Vorbereitung

Mastermix Vorbereitung	Pro Reagiergefäß
RT	1 µl
RT-Buffer	4 µl
RT-Primer	1 µl
Gesamt	**6 µl**

Sobald das Programm am Mastercycler beendet war, wurden die Röhrchen zurück auf Eis gestellt und 6 µl des Mastermix pro Röhrchen hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben noch einmal kurz zentrifugiert und zurück in den Mastercycler gestellt, wo dieses Mal für 30 min bei 42 °C die reverse Transkription ablief. Danach wurde die reverse Transkriptase 3 min bei 95 °C inaktiviert. Die cDNA konnte anschließend bei -20 °C aufbewahrt werden.

3.4 qRT-PCR

3.4.1 Prinzip

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR bietet sie zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung der DNA-Amplifikation. Zunächst musste die RNA durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt werden. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der interkalierende DNA-Farbstoff SYBR Green I aus dem QuantiTech SYBR Green PCR Kit verwendet, der an doppelsträngiger DNA bindet. Im LightCycler wurde dann die Fluoreszenz gemessen, die mit der Menge der sich akkumulierenden PCR-Produkte in jedem Zyklus korreliert. Als Housekeeping-Gen diente das Succinatdehydrogenase-complex, subunit A (SDHA) -Gen. Dieses Gen ist nicht reguliert und wird in konstanter Menge unter jeglichen Bedingungen exprimiert. Das Ziel-Gen APOD wurde relativ zu SDHA quantifiziert.

Da bei diesem Verfahren der interkalierende Farbstoff auch an unspezifische PCR-Produkte binden kann, die dadurch ebenfalls gemessen werden, wurde am Ende jeder Messung eine Schmelzkurvenanalyse durch den LightCycler durchgeführt. Hierbei wurde bei laufender Fluoreszenzmessung die Temperatur von 95 °C ausgehend kontinuierlich gesenkt, bis sich der DNA-Doppelstrang an dem für dieses PCR-Produkt charakteristischen Schmelzpunkt auftrennte, wodurch es zu einer Fluoreszenzabnahme kam.

3.4.2 Durchführung

Nachdem die Primer, der SYBR Green PCR Mix und die cDNA aus dem Kühlschrank genommen wurden, wobei der SYBR Green PCR Mix direkt auf Eis gestellt wurde, wurde pro Probe ein 1,5 ml Röhrchen beschriftet und ein zusätzliches Röhrchen für die Kontrollen ohne cDNA, welche dem Kontaminationsausschluss der Primer dienten. In jedes Röhrchen für die einzelnen Proben wurde der in Tabelle 12 beschriebene Mastermix in 4,5facher Ausführung pipettiert und die cDNA der jeweiligen Probe zunächst im Vortexer gemischt.

Tabelle 12 Mastermix je Reaktions-Ansatz

Mastermix je Reaktions-Ansatz	
SYBR Green PCR Mix	10 µl
Wasser	7,5 µl
cDNA	0,5 µl
	= 18 µl

In dem Röhrchen für die Kontrollen wurde die cDNA durch Wasser ersetzt.

Als nächstes wurde die 96-well-PCR-Platte vorbereitet, indem in jede Vertiefung nach Protokoll 2 µl des jeweiligen Primers (SDHA oder APOD) pipettiert wurden. Anschließend wurden jeweils 18 µl des Mastermix ebenfalls in jede Vertiefung gegeben. In zwei Vertiefungen wurde einmal SDHA und einmal APOD nur mit dem Kontroll-Mastermix ohne cDNA gegeben. Auf die Platte wurde zum Schluss eine Folie mit Hilfe eines Spatels geklebt, wobei man darauf achten musste, möglichst nicht mit den Fingern die Folie zu berühren, da dies die photometrischen Messungen verfälschen könnte. Die Platte wurde für 1 min bei 2.700 rpm zentrifugiert und anschließend in den Rotor des LightCyclers gestellt. Damit konnte die qPCR nach dem in Tabelle 13 beschriebenen Programm gestartet werden.

Tabelle 13 LightCycler Programm für die qPCR

LightCycler Programm für die qPCR		
1. Denaturierung	95 °C	15 min
2. Cycling (38 Zyklen)	94 °C	15 sek
	55 °C	30 sek
	72 °C	30 sek
3. Schmelzkurve (Tm-Analyse)		

3.4.3 Auswertung

Am LightCycler wurden am Ende der Cp-Wert über AbsQuant/2nd-derivative-max sowie die Schmelzkurven über Tm-Calling bestimmt. Bei einer korrekten Amplifikation mussten die

Schmelzkurven eines Gens (z.B. APOD) übereinstimmen. Der Cp -bestimmt den Zyklus, an dem ein Schwellenwert überschritten wird und die Amplifikation beginnt. Die Cp-Werte wurden mittels Excel weiter analysiert. Zunächst wurde der Mittelwert (MW) für jede zweifach-Bestimmung der qPCR gebildet. Dann wurde jeweils der MW der Proben mit SDHA-Primern von denen mit APOD-Primern subtrahiert. Zum Schluss wurde dann t2- als Wert 1 festgelegt und die anderen Werte durch die Potenz der Differenz dazu ins Verhältnis gesetzt.

3.5 Sanger Sequenzierung

Aus der Zelldatenbank des Labors wurden Zelllinien ausgesucht, bei denen eine 5α-Reduktase-Mutation genetisch oder funktionell festgestellt wurde. Da bei den meisten Patienten keine Gen-Sequenzierung durchgeführt wurde, wurde nun im Rahmen der Doktorarbeit mittels Sanger Sequenzierung überprüft, ob tatsächlich eine 5α-Reduktase-Mutation in diesen Zelllinien vorlag.

3.5.1 Prinzip

Die Sanger Sequenzierung ist eine enzymatische Methode der DNA-Sequenzierung. Hiermit kann in einem Zyklus, bestehend aus drei Schritten, die Basenabfolge eines DNA-Moleküls bestimmt werden. Zunächst wird die DNA dafür denaturiert, um Einzelstränge zu erhalten. Anschließend erfolgt das Annealing, bei dem die Primer an die DNA binden. Bei der Elongation im Anschluss lagert sich die DNA-Polymerase an den Primer und kopiert komplementär den Einzelstrang. Jedem Zyklus wird ein Abbruch-Nukleotid hinzugefügt, sodass nach mehreren Zyklen DNA-Stränge in unterschiedlichen Längen entstehen. Die Abbruch-Nukleotide sind jeweils mit einem Fluorphosphor versehen. Diese werden anschließend mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und so die Basenabfolge mittels Detektion der Fluorophore bestimmt.

3.5.2 Durchführung

3.5.2.1 PCR

Zunächst wurde das 5α-Reduktase Gen mit Hilfe der PCR amplifiziert. Es wurde die HotStarTaq DNA Polymerase von Qiagen verwendet. Dafür wurden der 10x PCR-Puffer, die Q-Solution, die Primer und der dNTP-Mix aufgetaut und jeweils vor Verwendung mit dem Vortexer gemischt. Anschließend wurde ein Reaktionsgemisch wie in Tabelle 14 vorbereitet, wobei die DNA noch nicht hinzugefügt wurde. Das angegebene Volumen gilt für eine DNA-Probe und musste je nach Probenanzahl und zusätzlich plus insgesamt einer Kontrollprobe vervielfältigt werden. Bei

mehreren Proben sollte man grundsätzlich 10 % mehr als benötigt von dem Reaktionsmastermix herstellen.

Tabelle 14 PCR Reaktionsansatz (HotStarTaq DNA Polymerase)

PCR Reaktionsansatz (HotStarTaq DNA Polymerase)	
Wasser	30,75 µl
10x PCR-Puffer	5,00 µl
Q-Solution	10,00 µl
dNTP-Mix	1,00 µl
Primer forward (20 pmol/µl)	1,00 µl
Primer reverse (20 pmol/µl)	1,00 µl
DNA (ca. 200 ng)	1,00 µl
HotStar Polymerase	0,25 µl
Endvolumen	**50,00 µl**

Von dem hergestellten Reaktionsgemisch wurden nach gutem Durchmischen jeweils 49 µl in ein PCR-Röhrchen gegeben und 1 µl DNA (ca. 200 ng) hinzugefügt. Danach wurden die PCR-Röhrchen in den Thermocycler gestellt, der mit dem in Tabelle 15 erklärten Programm gestartet wurde.

Tabelle 15 HotStarTaq Polymerase – PCR-Programm

HotStarTaq Polymerase – PCR-Programm		
Initiale Hitzeaktivierung der Polymerase	95 °C	15 min
Cycling (35 Zyklen):		
Denaturierung	94 °C	30 sek
Annealing	65 °C	30 sek
Elongation	72 °C	1 min
Finale Elongation	72 °C	10 min
	4 °C	∞

3.5.2.2 Agarosegelelektrophorese

Nach der PCR mussten die DNA-Fragmente mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe in einem elektrischen Gleichstromfeld aufgetrennt werden, um zu zeigen, dass mit der PCR die Ziel-DNA tatsächlich amplifiziert wurde.

Hierzu wurde ein 1 %-iges Agarosegel verwendet, bei dem 1 g Agarose mit 100 ml TAE-Puffer vermischt und in der Mikrowelle für ungefähr 3-5 min erhitzt wurde, bis die Agarose vollständig gelöst war. Zwischendurch wurde das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde das Gemisch unter kaltem Wasser leicht abgekühlt und es wurden 3,5 µl Ethidiumbromid 1 % hinzugefügt. Nach kurzem Schwenken wurde das Gel langsam in die Elektrophorese-Gel-Kammer

gegossen und musste ungefähr 30 min auskühlen. Das Gel wurde in eine Gelkammer gestellt und mit 1 x TAE Ladepuffer bedeckt.

Zum Auftragen auf das Gel wurden 5 µl der DNA-Probe mit 1 µl Thermo Scientific 6x DNA Loading Dye vermischt. Davon wurden jeweils 5 µl in die Taschen des Gels gegeben und zusätzlich ein DNA-Längenmarker daneben aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte ungefähr 45 min bei einer Spannung von 100 Volt und die entstandenen Banden wurden mit Hilfe einer Kamera in einer UV-Kammer festgehalten.

3.5.2.3 Aufreinigung

Die PCR-Produkte mussten zunächst mit dem PCR Purification Kit von Qiagen gereinigt werden. Dazu wurde das gesamte Volumen des PCR-Produkts mit fünfmal so viel PB Puffer gemischt und in eine QIAquick Column gegeben. Diese wurde für 60 sek bei 10.000 g zentrifugiert, um die DNA zu binden. Der Durchfluss wurde weggeworfen, die Membran mit 750 µl PE Puffer gewaschen und erneut für 60 sek zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss abermals weggeworfen wurde, wurde die QIAquick Column noch einmal für 60 sek zentrifugiert, um die Reste des Puffers zu entfernen. Anschließend wurde die Column in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß gestellt und 25 µl Wasser auf die Membran pipettiert. Die QIAquick Column wurde für eine Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor sie ein letztes Mal für 60 sek zentrifugiert wurde. Die eluierte DNA wurde im Kühlschrank gelagert.

3.5.2.4 Cycle Sequencing

Bei dem Cycle Sequencing wurden für jede Zelllinie die Exons 1 bis 5 des 5α-Reduktase-Gens in einem eigenen Ansatz sequenziert, wobei nach anfänglichem Austesten für die Exons 1, 2, 4 und 5 der forward-Primer verwendet wurde und für Exon 3 der reverse-Primer. Zunächst wurde ein Mastermix nach dem Schema aus Tabelle 16 hergestellt. Die Primer wurden allerdings erst später zu den einzelnen Proben gegeben.

Tabelle 16 Mastermix (Cycle Sequencing)

Mastermix (Cycle Sequencing)	
Wasser	13,0 µl
5x Puffer	2,0 µl
Primer (20 pmol/µl)	1,5 µl (einzeln pipettiert)
Big Dye Terminator (BDT)	1,5 µl
Gesamtvolumen	**18,0 µl**

Von dem Mastermix wurden anschließend jeweils 16,5 µl pro Probe pro Exon in ein Reagiergefäß pipettiert und 1,5 µl des Primers und 2 µl des PCR-Amplifikats hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde unter dem Programm aus Tabelle 17 in einem Thermocycler inkubiert:

Tabelle 17 Thermocycler Programm

Thermocycler Programm			
		96 °C	2 min
Cycling (26x)	Denaturierung	96 °C	10 sek
	Annealing	57 °C	5 sek
	Extension	60 °C	4 min
		4 °C	∞

Nach der Sequenzierungsreaktion musste der Ansatz erneut gereinigt werden, um nicht eingebaute Dye-Terminatoren zu entfernen. Hierzu wurden die GE Healthcare illustra MicroSpin G-50 Columns verwendet. Die gereinigten Proben wurden nun verdünnt, indem 5 µl der Probe mit 20 µl Wasser vermischt wurden und anschließend konnten die Proben mit Hilfe des ABI PRISM 310 Genetic Analyzer analysiert werden. Die Daten erhielt man als Elektropherogramm mit farbigen Peaks, deren Qualität in dem Programm Chromas Lite beurteilt werden konnte. Außerdem wurde die Sequenz online beim UCSC Genome Browser im BLAT-Tool eingegeben, wodurch man sie mit der regulären Sequenz der 5α-Reduktase vergleichen konnte. Aus der Zusammenschau dieser Ergebnisse konnte man nun die Mutationen detektieren.

3.6 mRNA-Messung

Die Messung der 5α-Reduktase-mRNA-Expression in den einzelnen GF wurde nicht von mir durchgeführt, sondern freundlicherweise von den Mitarbeitern im Labor. Die Quantifizierung erfolgte nach dem in Kapitel 3.2 beschriebenen Prinzip, wobei das 5α-Reduktase-Gen gegen das house-keeping Gen SHDA normalisiert wurde.

3.7 Hormonanalytik

Die Hormonanalytik mittels Massenspektrometrie habe ich durch den beschränkten zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht selbst durchgeführt, sondern wurde mir freundlicherweise von der Medizinisch-technischen Assistentin Frau Tanja Stampe abgenommen und nach in Tabelle 18 Kurzprotokoll Extraktion, SOP des akkreditierten Kinderendokrinologischen Labors des UKSH Kiel, Version 2, 01.11.2017 zusammenTabelle 1gefasstem Protokoll durchgeführt. Die

Messergebnisse wurden mir von ihr in Form einer Exceltabelle zur weiteren Auswertung zur Verfügung gestellt.

Tabelle 18 Kurzprotokoll Extraktion, SOP des akkreditierten Kinderendokrinologischen Labors des UKSH Kiel, Version 2, 01.11.2017 (S. Olin, 2017)

Vorbereiten der Probe:	100 µL Probe/Standard/QC 10 µL interner Mix-Standard Verdünnen mit 100 µl 5 % Phosphorsäure	1. Vortexen 2. Zentrifugieren 3. Dekantieren
Konditionieren der Platte:	200 µL Methanol	
Equilibrieren der Platte:	200 µL Wasser	
Beladen der Platte:	vorbereitete Probe (siehe oben)	langsam
Waschen 1:	200 µL 5 % Ammoniak in Wasser	langsam
Waschen 2:	200 µL 10 % Methanol	langsam Elutionsplatte wechseln!
Eluieren:	30 µL Isopropanol 30 µL Isopropanol	langsam in 2 Schritten
	200 µL Wasser	in die Platte, Mischen, Verschweissen

3.8 Statistik

3.8.1 Wilcoxon-Rangsummentest

Zur Berechnung möglicher signifikanter Unterschiede zwischen den Kontrollzelllinien und den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression beim APOD-Assay und bei den Zellüberstand-Messungen wurde der Wilcoxon-Rangsummentest von Frau Dr. Alexandra Kulle durchgeführt und die Ergebnisse mir zur Verfügung gestellt. Dies ist ein nichtparametrischer statistischer Test, bei dem keine Normalverteilung der Daten als Voraussetzung nötig ist. Zur Berechnung der Signifikanzniveaus wurde hierfür die Software R Version 4.0.3 verwendet (R Core Team, 2021). Der Wilcoxon-Rangsummentest ist dabei in dem R-Paket Plyr eingeschlossen (Wickham, 2011). Ein Wert von 0,05 wurde hierbei als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 APOD-Assay und Sanger-Sequenzierung

Im ersten Teil der Doktorarbeit wurde der APOD-Assay sowohl für die Kontrollzelllinien als auch für Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression durchgeführt (Tabelle 10).

4.1.1 APOD-Assay der Kontrollzelllinien

Durch den APOD-Assay mit den verschiedenen Hormonen in unterschiedlichen Konzentrationen sollte überprüft werden, ob auch andere Hormone als das potente Androgen DHT den Androgenrezeptor in den Genitalhautfibroblasten aktivieren können. Dazu wurden die Genitalhautfibroblasten mit den Hormonen Andro in den Konzentrationen 10 und 100 nM und T und DHT jeweils in den Konzentrationen 1 und 10 nM für 48 h inkubiert und anschließend die APOD-Expression gemessen. Zur Kontrolle wurde jeweils zusätzlich ein Versuchsansatz ausschließlich mit der Ausgangslösung (t2-) und ein Ansatz mit Ethanol (EtOH) statt eines Hormons inkubiert.

Abbildung 5 zeigt die APOD-Expression der Kontrollzelllinien nach 48 h. Es wurden die fünf GF-Kontrollzelllinien GF-6, GF-8, GF-9, GF-35 und GF-41 untersucht. Beim APOD-Assay der Kontrollzelllinien wurde der Versuch pro Hormon und Konzentration für die jeweilige Zelllinie immer doppelt angesetzt. Im Graphen stellt somit jedes Symbol den Mittelwert aus diesen jeweils zwei Versuchsansätzen dar. Zusätzlich zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung vom Mittelwert der APOD-Expression aller Kontrollzelllinien beim jeweils vorgelegten Hormon. Bei dem Negativ-Kontrollansatz t2- wurde die APOD-Expression auf 1 gesetzt und die restlichen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. Bei allen Werten über 1 wurde somit die APOD-Expression hochreguliert. Man sieht, dass der zweite Kontrollansatz mit EtOH die APOD-Expression nicht hochregulierte. Alle drei verwendeten Hormone hatten dagegen einen unterschiedlich starken steigernden Effekt auf die APOD-Expression.

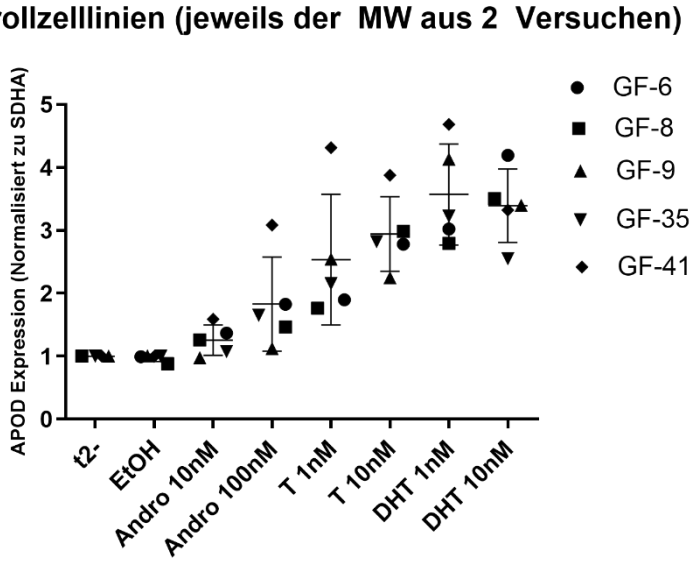


Abbildung 5 APOD Expression der Kontrollzelllinien (jeweils der MW aus zwei Versuchen) Der Graph zeigt die APOD Expression nach Inkubation mit den verschiedenen Hormonen in unterschiedlicher Konzentration für 48 h im APOD-Assay. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus dem Mittelwert aller Versuche der jeweiligen Konzentration an.

4.1.2 Sanger-Sequenzierung der Zellen mit V.a. 5α-Reduktase-Mutation sowie qRT-PCR der 5α-Reduktase-Enzyme in den einzelnen Zellen

In dieser Doktorarbeit wurde der APOD-Assay ebenfalls mit Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation durchgeführt. Dies diente als Modell zur Überprüfung, ob man tatsächlich die Wirkung vom T im APOD-Assay sehen kann. Durch die Mutation konnte man sicher sein, dass T nicht durch das Enzym 5α-Reduktase in DHT umgewandelt wurde und man nicht stattdessen eigentlich die Wirkung des endogen entstandenen DHT sieht. Dafür mussten zunächst die Zelllinien mit V.a. 5α-Reduktase-Mutation sequenziert werden. Anschließend wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, um schon bekannte Informationen zu den einzelnen Mutationen zu finden. Daraus ergaben sich die beiden Spalten „Phänotyp" und „Restaktivität der 5α-RD (laut Literatur)" (Tabelle 19). Beim Phänotyp gingen aber auch die Informationen ein, die wir zu den Patienten haben, von denen die Zelllinien stammen. Diese stimmten größtenteils mit den in der Literatur angegebenen Phänotypen überein. Zur Vereinfachung der Informationen aus unterschiedlichen Quellen zum Phänotyp der verschiedenen Patienten mit der jeweils beschriebenen Mutation wurden die Daten mithilfe des Sinnecker Scores zusammengefasst (Abbildung 3). Bei einigen Zelllinien ließ sich der Phänotyp vorher nicht ermitteln, da die vorhandenen Daten komplett anonymisiert waren.

Zusätzlich gab es in der Literatur zu einigen Mutationen die Angabe, über welchen Mutationen das 5α-Reduktase-Enzym negativ beeinflussen. Diese Angaben wurden in der Spalte „Pathogene Mutation" vermerkt.

Bei der Sequenzierung von insgesamt 10 Zelllinien mit Verdacht auf eine 5α-Reduktase-Mutation wurden mit den Zelllinien GF-52, GF-53, GF-56, GF-57, GF-145, GF-241 und GF-242 sieben homozygote pathogene Mutationen und mit der Zelllinie GF-55 eine heterozygote Mutation gefunden, während sich bei den zwei Zelllinien GF-240 und GF-54 keine Mutation der 5α-Reduktase zeigte. Die einzelnen Mutationen wurden in Tabelle 19 in der Spalte „Pathogene Mutation" aufgeführt. Zusätzlich wurden mehrere Mutationen gefunden, die laut Literaturrecherche nicht pathogen sind, weswegen sie in der Tabelle nicht genannt werden. Die Zelllinie GF-242 stammt im Gegensatz zu den anderen Zelllinien aus Hodengewebe. Für dieses Gewebe gibt es im APOD-Assay keine Normalkontrollen, deshalb können die APOD-Werte dieser Zelllinie nicht sicher bewertet werden. Aus diesem Grund wurden diese Zelllinie und die Zelllinie GF-55 mit einer heterozygoten Mutation am Ende nicht zu der Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression gezählt.

Ein weiterer Faktor, der die Umwandlung von T zu DHT in den einzelnen Zelllinien zusätzlich zu einer Mutation beeinflussen kann, ist die 5α-Reduktase-Expression. Um zu untersuchen, wieviel des 5α-Reduktase-Enzyms in den einzelnen Zelllinien vorhanden ist, wurde die relative Expression der mRNA der 5α-Reduktase in den Zelllinien mit Verdacht auf Mutation gemessen und in der fünften Spalte in Tabelle 19 angegeben. Zusätzlich wurde die mRNA-Expression auch in den Kontrollzelllinien gemessen und in Tabelle 20 zusammengefasst.

Die Tabelle 21 gibt zudem die 5α-Reduktase-Aktivität in den GFs an, die wir den vorliegenden Daten zu den Zelllinien entnehmen konnten (s.2.7.2). Die in der Tabelle angegebenen Werte lagen teilweise mit einer gemessenen 5αRD-Aktivität von > 1 pmol/h/mg Protein im Normbereich, waren insgesamt aber trotzdem in einem sehr niedrigen Bereich.

Es wurde beschlossen, dass die Zelllinien GF-240 und GF-54, bei denen keine Mutation gefunden wurde, trotzdem in eine Gruppe mit den Zelllinien mit Mutation gefasst werden, da diese beiden Zelllinien im 5α-Reduktase-Funktionsassay eine stark verringerte Enzymaktivität aufwiesen und zudem eine niedrige 5α-Reduktase-Expression zeigten. So entstanden schließlich zwei Gruppen. Zum einen die Gruppe 1 mit den Kontrollzelllinien und zum anderen die Gruppe 2 mit den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression.

Tabelle 19 Ergebnisse der Sequenzierung der Zelllinien mit V.a. 5α-Reduktase-Mutation

Zelllinie	**Pathogene Mutation**	**Phänotyp (Sinnecker Score)**	**Restaktivität der 5αRD (laut Literatur)**	**mRNA der 5αRD (relative Expression normalisiert gegen SDHA)**	**5αRD-Aktivität (pmol/h/mg Protein) in GF (Schweikert)**
GF-52	p.Arg227Gln **homozygot**	3 (Gernot H G Sinnecker *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2009; Marzuki *et al.*, 2010; Kon *et al.*, 2015)	3,2% (Marzuki *et al.*, 2010)	0,00054555	Keine Angaben
GF-53	p.Tyr91His **homozygot**	4 (Thigpen *et al.*, 1992; Wigley *et al.*, 1994; Akcay *et al.*, 2014)	<0,2% (Wigley *et al.*, 1994)	0,00968522	In Masterliste Fibroblasten im Labor vermerkt: reduzierte Enzymaktivität in Fibroblasten
GF-56	p.Leu55Gln **homozygot**	4 (Thigpen *et al.*, 1992; Hochberg *et al.*, 1996)	<0,2% (Thigpen *et al.*, 1992; Wigley *et al.*, 1994)	0,00342424	1,1 (sehr niedrig)
GF-57	p.His231Arg **homozygot** (5α-RD kann kein T binden (Nordenskjöld and Ivarsson, 1998))	4 (Thigpen *et al.*, 1992; Boudon *et al.*, 1995; Forti *et al.*, 1996; Gernot H G Sinnecker *et al.*, 1996)(Thigpen *et al.*, 1992; Boudon *et al.*, 1995; Forti *et al.*, 1996; Gernot H. G. Sinnecker *et al.*, 1996)	15% (Forti *et al.*, 1996; Nordenskjöld and Ivarsson, 1998)	0,00155918	Keine Angaben
GF-145	p.Gly196Ser **homozygot**	2-3 (Carpenter *et al.*, 1990; Thigpen *et al.*, 1992;	10% (Forti *et al.*, 1996) 8%	0,00356965	2,66 (sehr niedrig)

	(Mutation verringert die Affinität des Typ2-Isoenzyms für NADPH; ändert das pH-Optimum des Enzyms (Thigpen *et al.*, 1992))	Gernot H G Sinnecker *et al.*, 1996; Abacı *et al.*, 2019)	(Thigpen *et al.*, 1992)		
GF-241	p.Arg227Gln **homozygot**	2-3 (Gernot H G Sinnecker *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2009; Marzuki *et al.*, 2010; Kon *et al.*, 2015)(Gernot H. G. Sinnecker *et al.*, 1996)	3,2% (Marzuki *et al.*, 2010)	0,00628009	0,4 (unter Normalbereich)
GF-54	Keine Mutation	4		0,00023017	In Masterliste Fibroblasten im Labor vermerkt: massiv verminderte 5α-RD Aktivität (Schweikert-Befund)
GF-240	Keine Mutation			0,00026257	1,3 (sehr niedrig)
GF-55	p.His231Arg **heterozygot** (5α -RD kann kein T binden (Nordenskjöld and Ivarsson, 1998))		15 % (Forti *et al.*, 1996; Nordenskjöld and Ivarsson, 1998)	0,00350000	1,3 (sehr niedrig)
GF-242 (Hodengewebe)	p.Ile199Asn **homozygot**	Erstbeschreibung, bisher nicht publiziert		0,0	Keine Angaben

Tabelle 20 mRNA der 5α-Reduktase von den Kontrollzelllinien

Zelllinie	mRNA der 5αRD (relative Expression normalisiert gegen SDHA)
GF-6	0,0019
GF-8	0,0014
GF-9	0,0008
GF-35	0,0079
GF-41	0,0878

4.1.3 APOD-Assay: Vergleich zwischen Kontrollzelllinien und Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression

Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse des APOD-Assays der Kontrollzelllinien mit denen der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression verglichen. Dies diente der teilweisen Beantwortung der ersten Fragestellung, ob T und Andro auch den Androgenrezeptor endogen im peripheren Zielgewebe aktivieren, weil die Umwandlung in DHT geblockt ist, und welche Hinweise sich aus Funktionsverlust-Mutationen der 5α-Reduktase finden.

Wie schon in Abbildung 5 sieht man im Graphen in Abbildung 6 zusätzlich zu den Versuchsansätzen mit den Hormonen in unterschiedlichen Konzentrationen erneut die zwei Negativ-Kontrollen t2- und EtOH. Die APOD-Expression wurde bei t2- wieder als 1 definiert und die restlichen Werte ins Verhältnis dazu gesetzt. Man erkennt die Kontrollzelllinien im Graphen daran, dass die Symbole schwarz gefärbt wurden. Der Graph zeigt, dass auch die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression die APOD-Expression im APOD-Assay hochregulierten. Zudem scheint die APOD-Expression nicht nur durch DHT, sondern auch durch T und in geringem Maße auch durch Andro hochreguliert zu werden.

Zusätzlich wurden mithilfe des Wilcoxon-Rangsummentest statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe 1 mit den Kontrollzelllinien und der Gruppe 2 mit den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression für jedes Hormon mit seiner jeweiligen Konzentration errechnet. Wie in 4.1.2 erläutert, zählen die Zelllinien GF-242 und GF-55 nicht zu der Gruppe 2 und wurden bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Dabei ergab sich für die Hormone Andro und DHT in ihren beiden Konzentrationen und T 10 nM kein statistisch signifikanter Unterschied. Bei T 1 nM haben die Kontrollzelllinien die APOD Expression signifikant stärker hochreguliert im Vergleich zu den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer

5α-Reduktase-Expression, die kaum T in DHT umwandeln können. Der p-Wert lag hier bei p = 0,02953.

Insgesamt gab es jedoch sowohl bei den Kontrollzelllinien als auch bei den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression Ausreißer-Zelllinien. So zeigten z.B. die Kontrollzelllinie GF-41 und die Zelllinie GF-56 mit 5α-Reduktase-Mutation eine besonders starke Hochregulation der APOD-Expression, während die Zelllinie GF-145 mit 5α-Reduktase-Mutation insgesamt eine eher niedrige Hochregulation zeigte.

Die Hodengewebe-Zelllinie GF-242 wurde im APOD-Assay untersucht und in den folgenden Graphen aufgeführt, obwohl sie nicht in die Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression gehört. Hodengewebe enthält keine 5α-Reduktase und dient somit als gute Negativkontrolle. Bei der Zelllinie GF-55 mit der heterozygoten Mutation wurde ebenfalls der APOD-Assay durchgeführt und die Zelllinie wird weiterhin in den Graphen aufgeführt, um zu sehen, ob sich heterozygote Mutationen wie die Kontrollzelllinien oder ähnlich wie homozygote Mutationen verhalten.

Aus dieser Befundkonstellation ergibt sich insbesondere das wichtige Ergebnis, dass Testosteron nachweislich ohne Umwandlung in DHT den AR in genitalem Zielgewebe aktiviert. Der fehlende Unterschied im APOD-Assay bei DHT 1 nM und DHT 10 nM zwischen Kontrollzelllinien und Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression ergibt zudem, dass der AR in seiner Funktion bei 5α-Reduktase-Mutationen nicht beeinträchtigt ist.

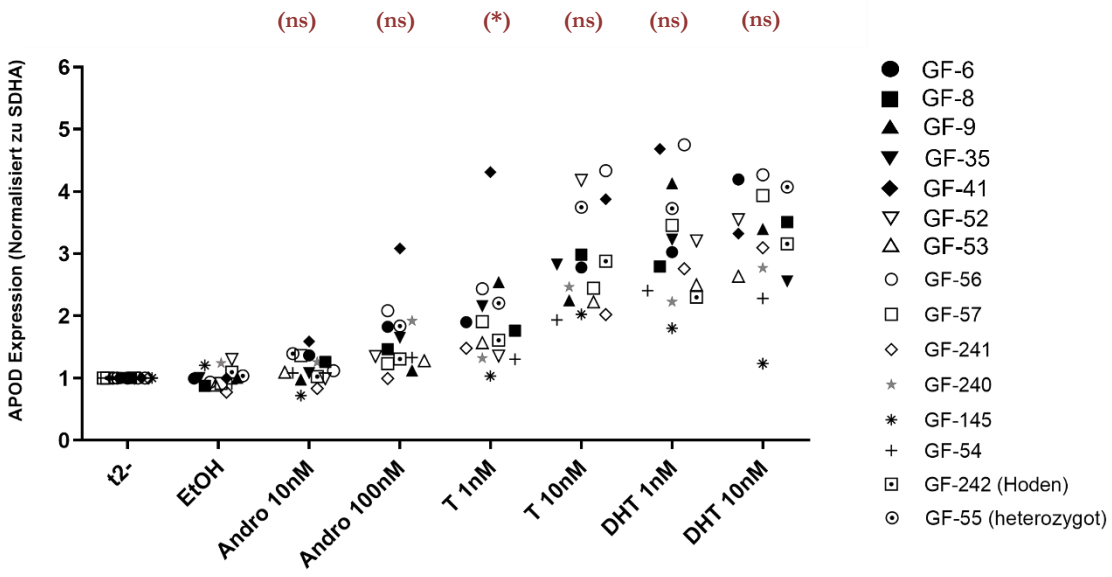


Abbildung 6 Kontrollzelllinien verglichen mit Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (jeweils der Mittelwert aus zwei (Kontrollen) bzw. drei (Mutation/Mangel) Versuchen) Man sieht die APOD Induktion nach Inkubation mit den verschiedenen Hormonen für 48 h im APOD-Assay. Es wurden die Kontrollzelllinien, die in schwarz ausgefüllten Symbolen dargestellt werden, mit Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression verglichen. Dabei gehören GF-55 und GF-242 nicht in die Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression, da es sich um Hodengewebe und eine heterozygote Mutation handelt. Rote Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der Kontrollzelllinien und der Gruppe von Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression. Der p-Wert bei Testosteron 1 nM beträgt p = 0,02953. *($p < 0,05$), ns = nicht signifikant

4.2 Zellüberstand-Messungen

Der zweite Teil der Doktorarbeit bestand aus den Messungen der Zellüberstände des APOD-Assays nach 48 h mit dem Massenspektrometer. Hiermit sollte für die zweite Fragestellung der Doktorarbeit untersucht werden, wie die Hormone innerhalb von 48 h in den GF metabolisiert werden. Es wurden wieder sowohl die Kontrollzelllinien als auch die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression untersucht, sodass man einen möglichen Unterschied in der Metabolisierung der Hormone erkennen würde.

Die Versuche wurden insgesamt über eine Zeitraum vom 1,5 Jahren durchgeführt. Die Ausgangslösungen für die jeweiligen Hormone, bei denen 10 ml Medium mit 1 µl Hormon gemischt wurden, wurden während dieses Zeitraums jedes Mal frisch für den APOD-Assay angesetzt. Um bei teilweise deutlichen Schwankungen der gemessenen Konzentrationen in den Ausgangslösungen eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden bei der Auswertung der quantitativen Zellüberstand-Messungen Quotienten gebildet. Da der APOD-Assay nicht empfindlich auf diese Konzentrationsschwankungen reagiert, konnte man bei der Auswertung der APOD-

Expression auf die Quotientenbildung verzichten. Für den Quotienten wurde die gemessene Hormonkonzentration nach Inkubation für 48 h durch die Konzentration des vorgelegten Hormons in der jeweils angesetzten Ausgangslösung dividiert.

Beispiel

Andro 10 nM vorgelegt -> Andro im Zellüberstand gemessen:

$$\frac{\text{Andro im Zellüberstand nach 48h (z.B. 5 nM)}}{\text{Andro-Konzentration in Ausgangslösung (z.B. 10 nM)}} = 0{,}5$$

4.2.1 Zellüberstand-Messungen: Androstendion vorgelegt

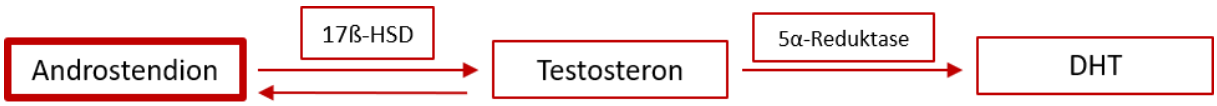


Abbildung 7 Delta-5-Biosynthesepathway von Androstendion Gezeigt wird der Delta-5-Pathway der Metabolisierung von Andro über die 17ß-HSD zu T und dann über die 5α-Reduktase zu DHT.

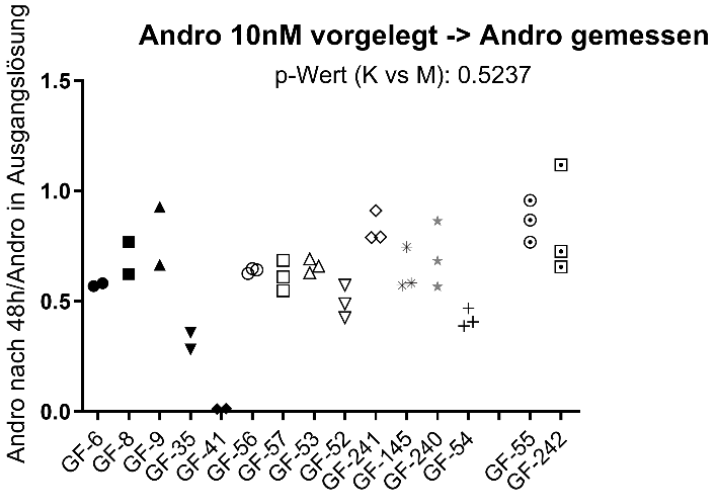
Abbildung 7 stellt den Delta-5-Hormonpathway von Andro über die 17ß-HSD zu T und von dort über die 5α-Reduktase zu DHT dar.

Nun wurden zunächst die Ergebnisse der Zellüberstand-Messungen von „Andro 10 nM vorgelegt" in Abbildung 8 graphisch dargestellt. Dies bedeutet, dass am Anfang Andro mit einer Konzentration von 10 nM auf die GF für den APOD-Assay gegeben wurde und nach 48 h Inkubation mit dem Massenspektrometer im Zellüberstand die Hormonkonzentrationen von Andro, T und DHT gemessen wurden. Es wurde jeweils ein Graph pro nach 48 h gemessenem Hormon angelegt, der jeweils mit a, b oder c beschriftet wurde. Die Ordinate zeigt den in Abschnitt 4.2 erklärten Quotienten. Dies bedeutet, dass bei dem vorgelegten Hormon ein Wert von 1 anzeigt, dass nach 48 h noch in etwa 100% der vorgelegten Konzentration des Hormons vorhanden sind und es somit kaum metabolisiert wurde. In diesem Fall entspricht der Wert 1 einer Andro-Konzentration von 10 nM nach 48 h. Bei den gemessenen Hormonen, die nicht vorgelegt wurden, zeigt ein Wert von 1 an, dass ca. 100% der vorgelegten Ausgangskonzentration nun von dem gemessenen Hormon wie z.B. T entstanden sind. In Abbildung 8b würde der Wert 1 somit z.B. bedeuten, dass in den 48 h 10 nM T entstanden wären, da Andro in einer Konzentration von 10 nM vorgelegt wurde.

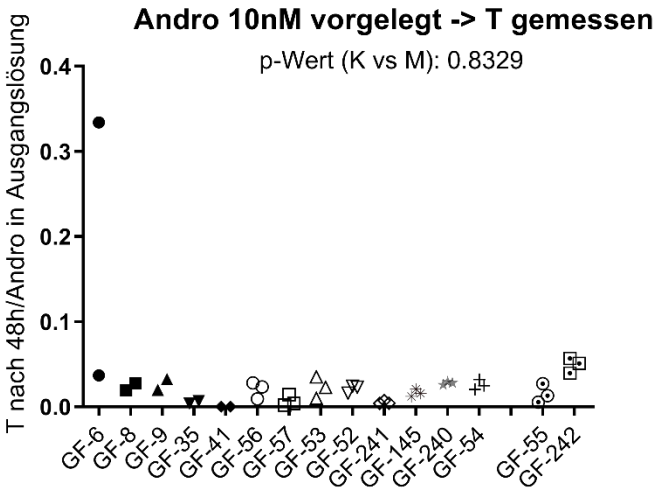
Die Abszisse gibt die Zelllinien an, wobei die am Anfang mit schwarz ausgefüllten Symbole die Kontrollen darstellen. Daneben stehen die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-

Reduktase-Expression. Rechts im Graphen sieht man die GF-55, bei der nur eine heterozygote Mutation gefunden wurde, und die aus Hodengewebe gewonnene GF-242. Diese Zelllinien wurden wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben nach der Sequenzierung nicht zur Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression gezählt.

8a


Andro 10nM vorgelegt -> Andro gemessen
p-Wert (K vs M): 0.5237
Andro nach 48h/Andro in Ausgangslösung
1.5
1.0
0.5
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

8b


Andro 10nM vorgelegt -> T gemessen
p-Wert (K vs M): 0.8329
T nach 48h/Andro in Ausgangslösung
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

8c

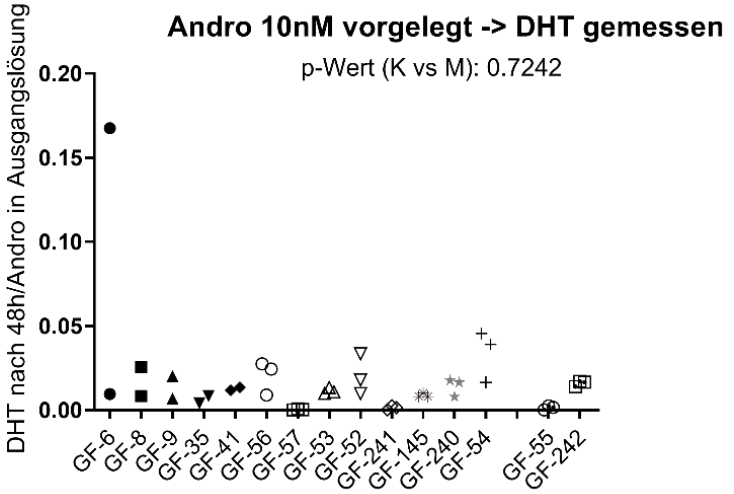
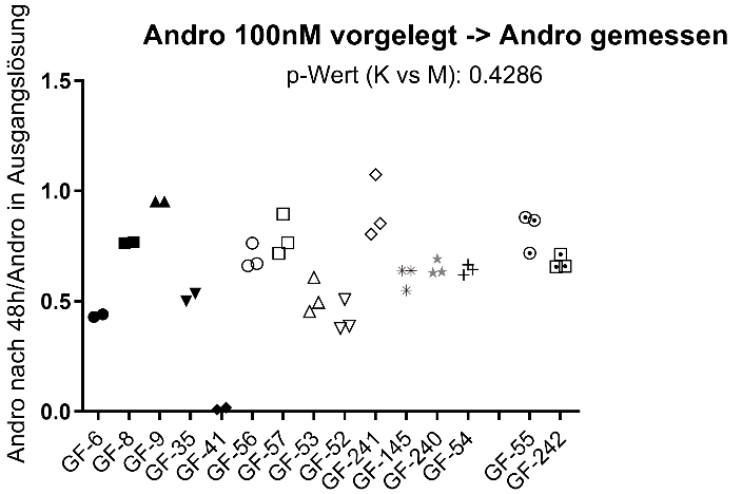

Andro 10nM vorgelegt -> DHT gemessen
p-Wert (K vs M): 0.7242
DHT nach 48h/Andro in Ausgangslösung
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

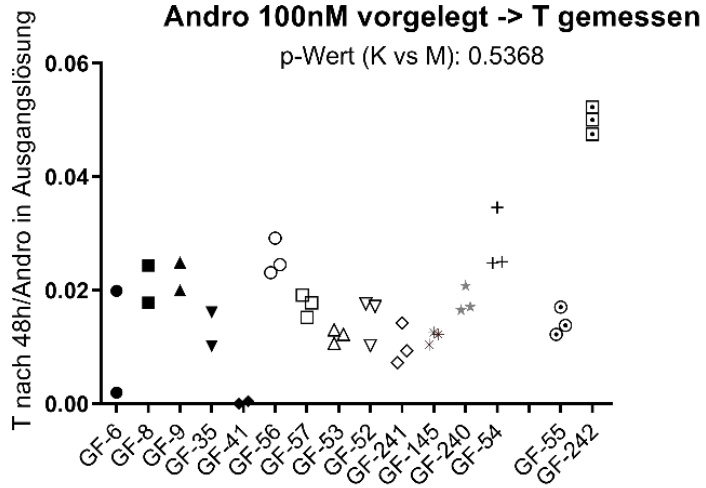
Abbildung 8 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Androstendion 10 nM vorgelegt Es wurde Andro 10 nM im APOD-Assay vorgelegt und anschließend mittels Massenspektrometrie im Zellüberstand nach 48 h die Hormone Andro, T und DHT gemessen. Aus den Messwerten wurde ein Quotient gebildet, indem der Wert des gemessenen Hormons nach 48 h durch den Wert des vorgelegten Andros in der Ausgangslösung dividiert wurde. Somit zeigt der Wert 1 in der Ordinate 100 % an. Man sieht links im Graphen die Kontrollzelllinien, dessen Symbole schwarz ausgefüllt sind. Es wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Kontrollzelllinien (K) und den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) errechnet und mit dem p-Wert angegeben. Der p-Wert gilt bei $p \leq 0{,}05$ als signifikant. GF-55 und GF-242 zählen nicht in die Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) und wurden bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Man beachte die unterschiedlichen Dimensionen der Ordinate in a-c, die an die jeweiligen Werte angepasst wurde.

Vergleicht man die Ergebnisse von „Andro 10 nM vorgelegt“ mit denen von „Andro 100 nM vorgelegt“ (Abbildung 9), zeigte sich ein ähnliches Bild. Nach 48 h waren mit ca. 50 bis 100 % ein Großteil des vorgelegten Andros weiterhin vorhanden, während sich nur ein geringer Anteil in T umgewandelt hat. Es zeigte sich lediglich bei „Andro 100 nM vorgelegt → DHT gemessen“ (Abbildung 9c) ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,01732. Hier haben die Kontrollzelllinien somit in den 48 h signifikant mehr Andro in DHT umgewandelt als die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression.

9a


Andro 100nM vorgelegt -> Andro gemessen
p-Wert (K vs M): 0.4286
Andro nach 48h/Andro in Ausgangslösung
1.5
1.0
0.5
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

9b


Andro 100nM vorgelegt -> T gemessen
p-Wert (K vs M): 0.5368
T nach 48h/Andro in Ausgangslösung
0.06
0.04
0.02
0.00
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

9c

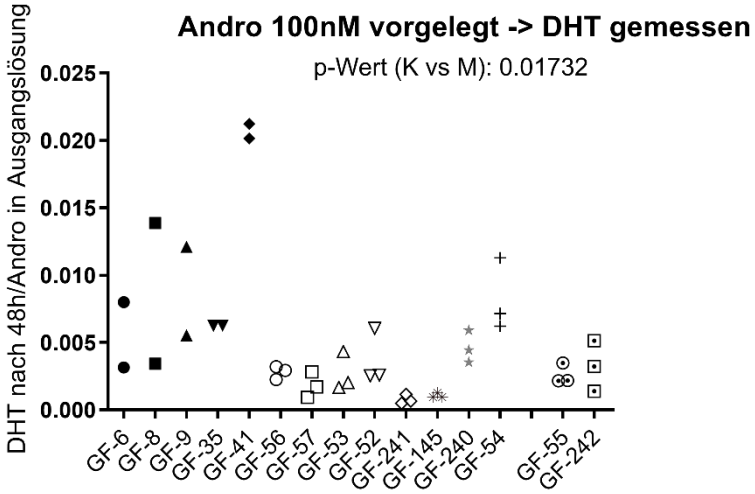

Andro 100nM vorgelegt -> DHT gemessen
p-Wert (K vs M): 0.01732
DHT nach 48h/Andro in Ausgangslösung
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

Abbildung 9 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Androstendion 100 nM vorgelegt Es wurde Andro 100 nM im APOD-Assay vorgelegt und anschließend mittels Massenspektrometrie im Zellüberstand nach 48 h die Hormone Andro, T und DHT gemessen. Aus den Messwerten wurde ein Quotient gebildet, indem der Wert des gemessenen Hormons nach 48 h durch den Wert des vorgelegten Andros in der Ausgangslösung dividiert wurde. Somit zeigt der Wert 1 in der Ordinate 100 % an. Man sieht links im Graphen die Kontrollzelllinien, dessen Symbole schwarz ausgefüllt sind. Es wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Kontrollzelllinien (K) und den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) errechnet und mit dem p-Wert angegeben. Der p-Wert gilt bei $p \leq 0{,}05$ als signifikant. GF-55 und GF-242 zählen nicht in die Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) und wurden bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Man beachte die unterschiedlichen Dimensionen der Ordinate in a-c, die an die jeweiligen Werte angepasst wurde.

4.2.2 Zellüberstand-Messungen: Testosteron vorgelegt

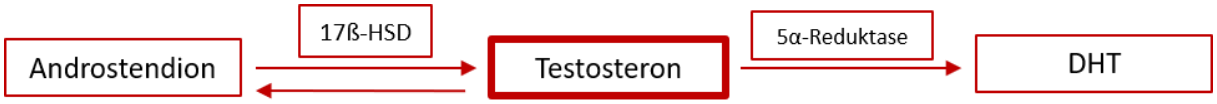


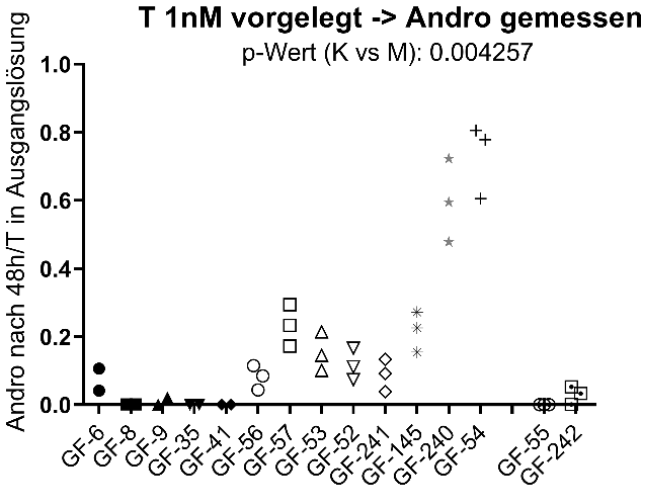
Abbildung 10 Delta-5-Biosynthesepathway von Testosteron Gezeigt wird der Delta-5-Pathway der Metabolisierung von T, das über die 5α-Reduktase zu dem potenteren DHT umgewandelt wird. Außerdem kann T über die 17ß-HSD in Andro umgewandelt werden.

Beim Delta-5-Hormonpathway der Androgene wird T über die 5α-Reduktase in DHT umgewandelt, kann aber auch über die 17ß-HSD zu Andro metabolisiert werden. Des Weiteren kann T ebenfalls über die 17ß-HSD aus Andro entstehen (Abbildung 10).

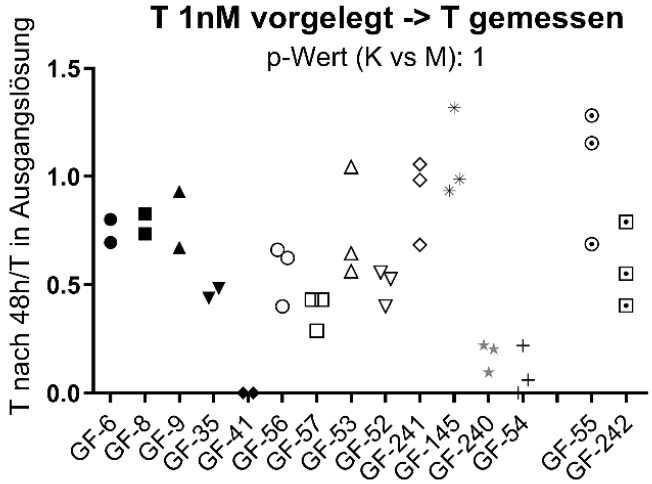
Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Zellüberstand-Messungen mit „T 1 nM vorgelegt“. Bei der Messung von T nach 48 h (Abbildung 11b) sah man, dass in den einzelnen Zelllinien noch sehr unterschiedlich viel T vorhanden war. Bei einigen Zelllinien schien sich fast nichts von dem vorgelegten T metabolisiert zu haben, bei anderen dagegen fast das gesamte T. Bei den Kontrollzelllinien scheint sich variabel ein erheblicher Teil des metabolisierten T in DHT umgewandelt zu haben (Abbildung 11c). Dass die Kontrollzelllinien signifikant mehr DHT gebildet haben als die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression, zeigt der p-Wert von 0,01031.

Die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression haben dagegen signifikant mehr T zu Andro metabolisiert, was der p-Wert von 0,004257 beweist.

11a


T 1nM vorgelegt -> Andro gemessen
p-Wert (K vs M): 0.004257
Andro nach 48h/T in Ausgangslösung
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

11b


T 1nM vorgelegt -> T gemessen
p-Wert (K vs M): 1
T nach 48h/T in Ausgangslösung
1.5
1.0
0.5
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

11c

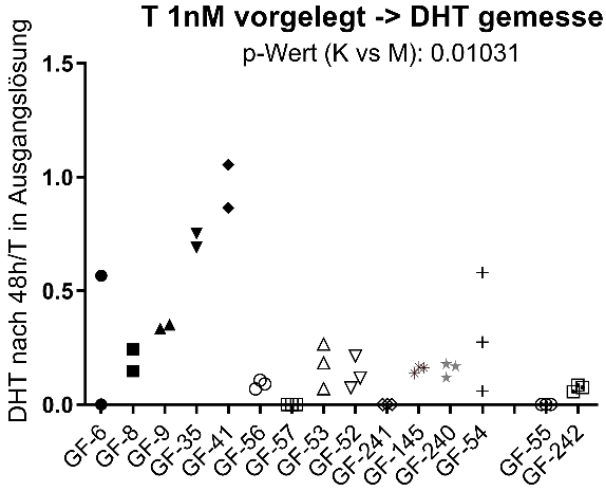
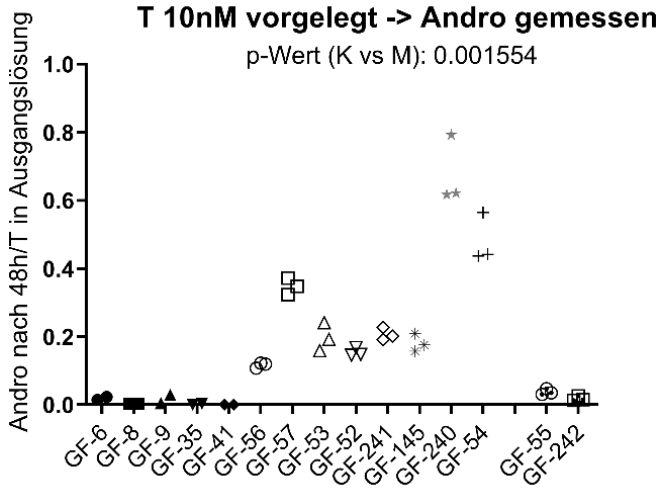

T 1nM vorgelegt -> DHT gemessen
p-Wert (K vs M): 0.01031
DHT nach 48h/T in Ausgangslösung
1.5
1.0
0.5
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

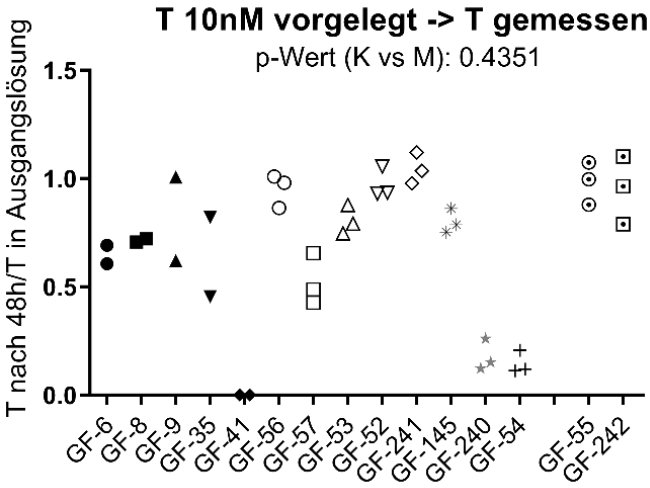
Abbildung 11 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Testosteron 1 nM vorgelegt Es wurde T 1 nM im APOD-Assay vorgelegt und anschließend mittels Massenspektrometrie im Zellüberstand nach 48 h die Hormone Andro, T und DHT gemessen. Aus den Messwerten wurde ein Quotient gebildet, indem der Wert des gemessenen Hormons nach 48 h durch den Wert des vorgelegten T in der Ausgangslösung dividiert wurde. Somit zeigt der Wert 1 in der Ordinate 100 % an. Man sieht links im Graphen die Kontrollzelllinien, dessen Symbole schwarz ausgefüllt sind. Es wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Kontrollzelllinien (K) und den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) errechnet und mit dem p-Wert angegeben. Der p-Wert gilt bei $p \leq 0{,}05$ als signifikant. GF-55 und GF-242 zählen nicht in die Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) und wurden bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Man beachte die unterschiedlichen Dimensionen der Ordinate in a-c, die an die jeweiligen Werte angepasst wurde.

Die Ergebnisse von „T 1 nM vorgelegt“ (Abbildung 11) und die von „T 10 nM vorgelegt“ (Abbildung 12) ähneln sich stark. Auch hier zeigen sich signifikante Unterschiede bei „T 10 nM vorgelegt → Andro gemessen“, wo in den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression mit einem p-Wert von 0,001554 signifikant mehr Andro enstanden ist als in den Kontrollzelllinien. Zudem zeigen sich bei „T 10 nM vorgelegt → DHT gemessen“ mit einem p-Wert von 0,01865, dass sich in den Kontrollzelllinien deutlich mehr DHT gebildet hat als in den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression.

12a


T 10nM vorgelegt -> Andro gemessen
p-Wert (K vs M): 0.001554
Andro nach 48h/T in Ausgangslösung
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

12b


T 10nM vorgelegt -> T gemessen
p-Wert (K vs M): 0.4351
T nach 48h/T in Ausgangslösung
1.5
1.0
0.5
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

12c

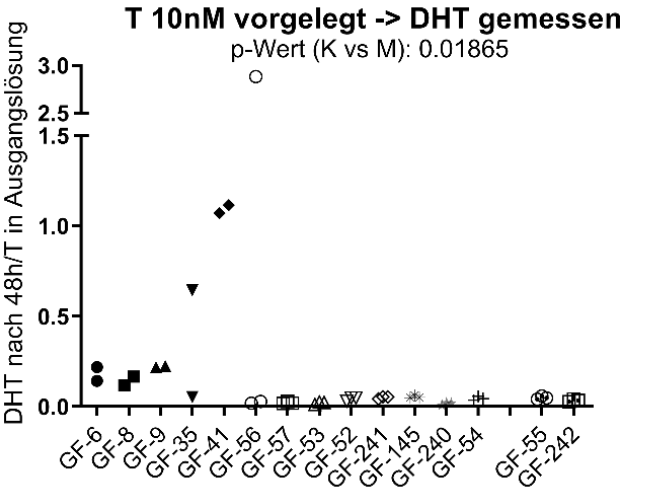

T 10nM vorgelegt -> DHT gemessen
p-Wert (K vs M): 0.01865
DHT nach 48h/T in Ausgangslösung
3.0
2.5
1.5
1.0
0.5
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

Abbildung 12 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Testosteron 10 nM vorgelegt Es wurde T 10 nM im APOD-Assay vorgelegt und anschließend mittels Massenspektrometrie im Zellüberstand nach 48 h die Hormone Andro, T und DHT gemessen. Aus den Messwerten wurde ein Quotient gebildet, indem der Wert des gemessenen Hormons nach 48 h durch den Wert des vorgelegten T in der Ausgangslösung dividiert wurde. Somit zeigt der Wert 1 in der Ordinate 100 % an. Man sieht links im Graphen die Kontrollzelllinien, dessen Symbole schwarz ausgefüllt sind. Es wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Kontrollzelllinien (K) und den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) errechnet und mit dem p-Wert angegeben. Der p-Wert gilt bei $p \leq 0{,}05$ als signifikant. GF-55 und GF-242 zählen nicht in die Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) und wurden bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Man beachte die unterschiedlichen Dimensionen der Ordinate in a-c, die an die jeweiligen Werte angepasst wurde.

4.2.3 Zellüberstand-Messungen: Dihydrotestosteron vorgelegt

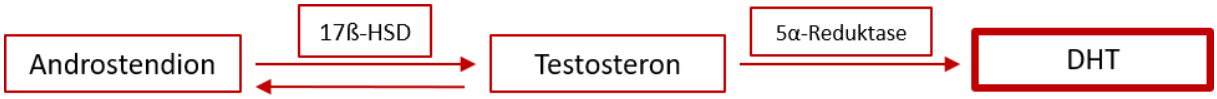
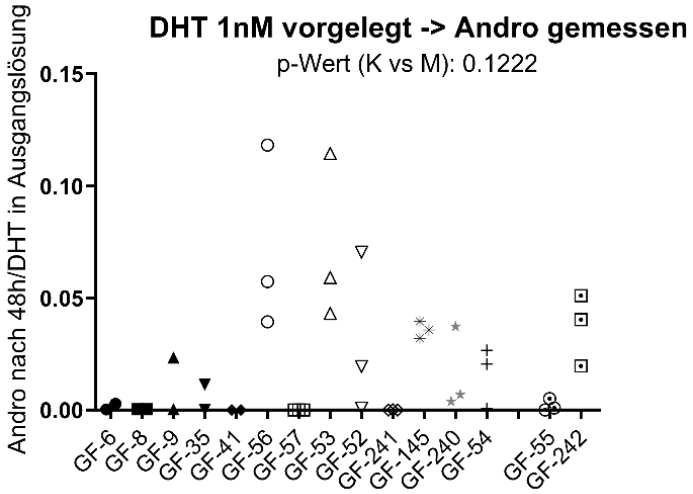


Abbildung 13 Delta-5-Biosynthesepathway von Dihydrotestosteron Aus Andro kann über die 17ß-HSD T entstehen und daraus durch die 5α-Reduktase DHT. DHT wandelt sich nicht über die 5α-Reduktase zurück in T.

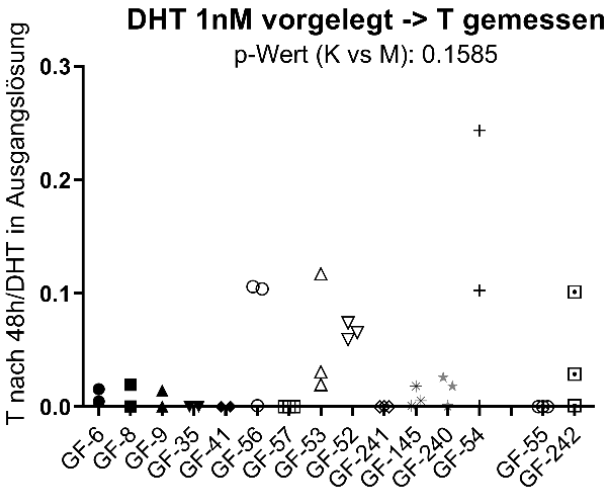
Aus Andro wird im Delta-5-Hormonpathway über die 17ß-HSD T, welches dann durch die 5α-Reduktase in das potentere Androgen DHT umgewandelt wird (Abbildung 13). Die Metabolisierung von T zu DHT über die 5α-Reduktase ist nur in diese Richtung möglich. Aus DHT kann somit nicht über die 5α-Reduktase T entstehen.

Hat man beim APOD-Assay nun DHT 1 nM vorgelegt und DHT im Zellüberstand nach 48 h gemessen (Abbildung 14c), so konnte man sehen, dass bei den meisten Zelllinien noch viel DHT vorhanden war. Es ergab sich mit dem p-Wert von 0,09324 kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Es wurde insgesamt also wenig DHT in T oder Andro metabolisiert. Hier ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Bei Abbildung 14 muss man insbesondere bei Abbildung 14a die im Vergleich zu den übrigen Abbildungen deutlich niedrigeren Konzentrationen in der Y-Achse beachten.

14a


DHT 1nM vorgelegt -> Andro gemessen
p-Wert (K vs M): 0.1222
Andro nach 48h/DHT in Ausgangslösung
0.15
0.10
0.05
0.00
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

14b


DHT 1nM vorgelegt -> T gemessen
p-Wert (K vs M): 0.1585
T nach 48h/DHT in Ausgangslösung
0.3
0.2
0.1
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

14c

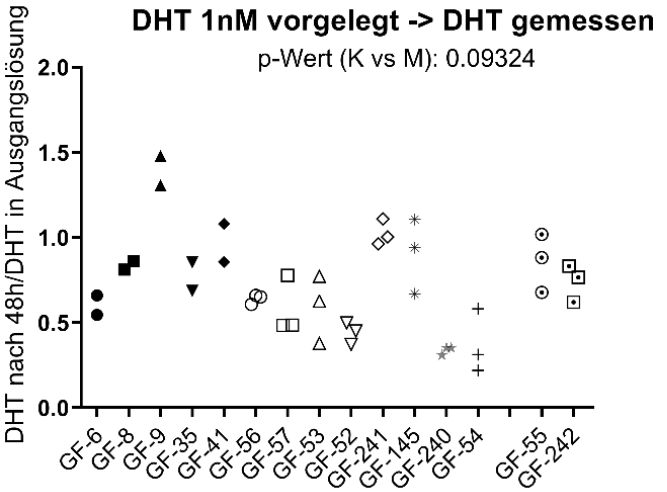
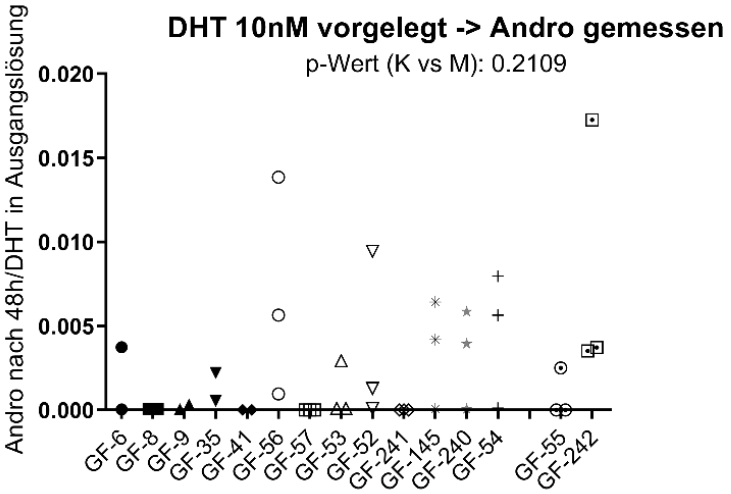

DHT 1nM vorgelegt -> DHT gemessen
p-Wert (K vs M): 0.09324
DHT nach 48h/DHT in Ausgangslösung
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

Abbildung 14 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Dihydrotestosteron 1 nM vorgelegt Es wurde DHT 1 nM im APOD-Assay vorgelegt und anschließend mittels Massenspektrometrie im Zellüberstand nach 48 h die Hormone Andro, T und DHT gemessen. Aus den Messwerten wurde ein Quotient gebildet, indem der Wert des gemessenen Hormons nach 48 h durch den Wert des vorgelegten DHT in der Ausgangslösung dividiert wurde. Somit zeigt der Wert 1 in der Ordinate 100 % an. Man sieht links im Graphen die Kontrollzelllinien, dessen Symbole schwarz ausgefüllt sind. Es wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Kontrollzelllinien (K) und den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) errechnet und mit dem p-Wert angegeben. Der p-Wert gilt bei $p \leq 0{,}05$ als signifikant. GF-55 und GF-242 zählen nicht in die Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) und wurden bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Man beachte die unterschiedlichen Dimensionen der Ordinate in a-c, die an die jeweiligen Werte angepasst wurde.

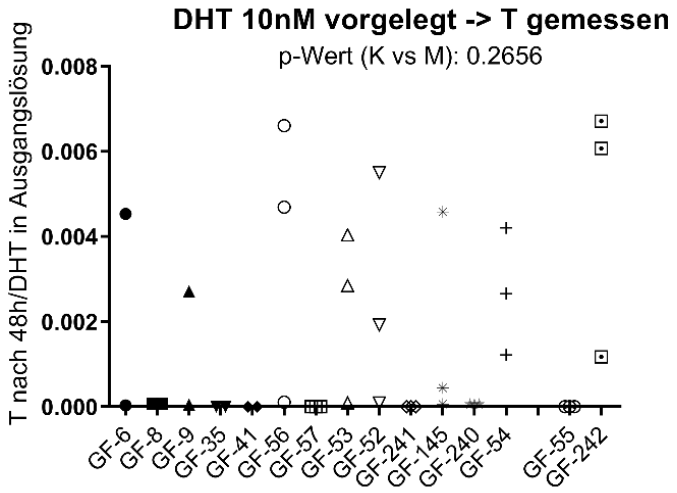
In Abbildung 15 wurden die Ergebnisse der Zellüberstand-Messungen mit „DHT 10 nM vorgelegt" graphisch dargestellt. In dieser höheren Konzentration konnte man bei „DHT 10 nM vorgelegt → DHT gemessen" (Abbildung 15c) nun mit einem p-Wert von 0,04507 einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollzelllinien und den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression beobachten. Bei den Kontrollzelllinien war nach 48 h insgesamt mehr DHT vorhanden als bei den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression.

Wurden dann Andro und T gemessen, so ergab sich ein ähnliches Bild wie bei „DHT 1 nM vorgelegt". Es entstand auch hier kaum etwas von diesen Hormonen und man konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen (Abbildung 15a und b).

15a


DHT 10nM vorgelegt -> Andro gemessen
p-Wert (K vs M): 0.2109
Andro nach 48h/DHT in Ausgangslösung
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

15b


DHT 10nM vorgelegt -> T gemessen
p-Wert (K vs M): 0.2656
T nach 48h/DHT in Ausgangslösung
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

15c

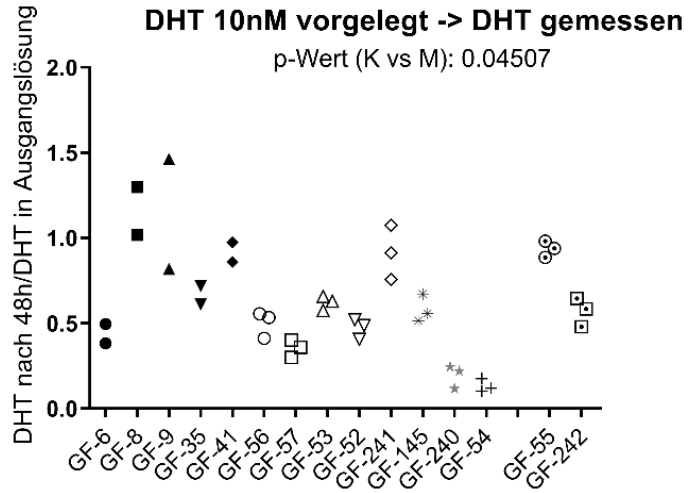

DHT 10nM vorgelegt -> DHT gemessen
p-Wert (K vs M): 0.04507
DHT nach 48h/DHT in Ausgangslösung
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

Abbildung 15 a-c Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Dihydrotestosteron 10 nM vorgelegt Es wurde DHT 10 nM im APOD-Assay vorgelegt und anschließend mittels Massenspektrometrie im Zellüberstand nach 48 h die Hormone Andro, T und DHT gemessen. Aus den Messwerten wurde ein Quotient gebildet, indem der Wert des gemessenen Hormons nach 48 h durch den Wert des vorgelegten DHT in der Ausgangslösung dividiert wurde. Somit zeigt der Wert 1 in der Ordinate 100 % an. Man sieht links im Graphen die Kontrollzelllinien, dessen Symbole schwarz ausgefüllt sind. Es wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Kontrollzelllinien (K) und den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) errechnet und mit dem p-Wert angegeben. Der p-Wert gilt bei $p \leq 0{,}05$ als signifikant. GF-55 und GF-242 zählen nicht in die Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) und wurden bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Man beachte die unterschiedlichen Dimensionen der Ordinate in a-c, die an die jeweiligen Werte angepasst wurde.

4.2.4 Zellüberstand-Messungen: Dihydrotestosteron vorgelegt → Androstandiol und Androsteron gemessen

Bei „DHT 1 und 10 nM vorgelegt" konnte man sehen, dass ein Teil des DHT metabolisiert wurde, allerdings kaum in Androstendion und Testosteron (Abbildung 14, Abbildung 15). DHT kann durch die 3α-HSD zu Androstandiol umgewandelt werden und aus Androstandiol kann durch die 17ß-HSD Androsteron entstehen. Androstandiol und Androsteron werden als die am meisten im männlichen fetalen Kreislauf zirkulierenden Androgene aus dem Backdoor-Pathway beschrieben (O'Shaughnessy *et al.*, 2019). Deshalb wurden zusätzlich die beiden Androgene Androstandiol und Androsteron aus dem Zellüberstand von „DHT vorgelegt" gemessen.

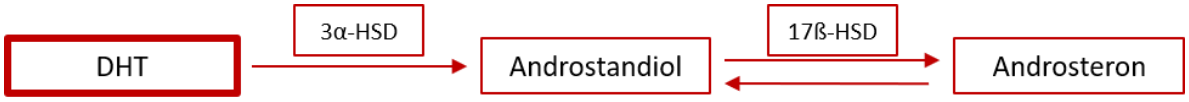


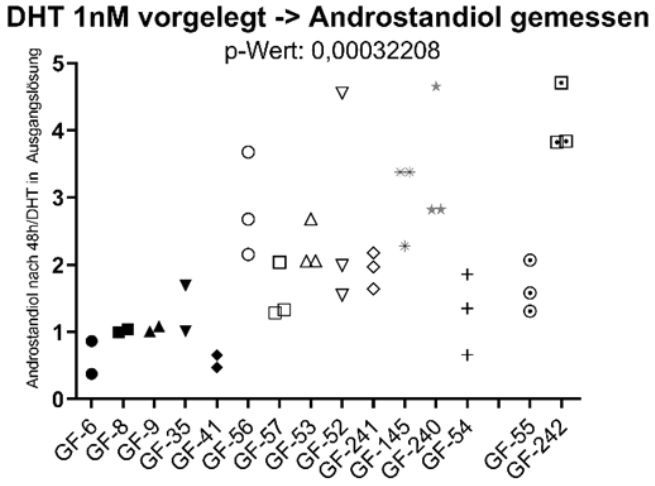
Abbildung 16 Backdoor-Pathway von Dihydrotestosteron zu Androstandiol und Androsteron

Durch diese zusätzlichen Messungen konnte man bei DHT 1 nM sehen, dass in den 48 h viel Androstandiol und Androsteron aus DHT entsteht (Abbildung 17). Hier zeigte sich, dass bei „DHT 1 nM vorgelegt → Androstandiol gemessen" die Kontrollzelllinien mit einem P-Wert von 0,00032208 signifikant weniger DHT in Androstandiol metabolisierten als die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression.

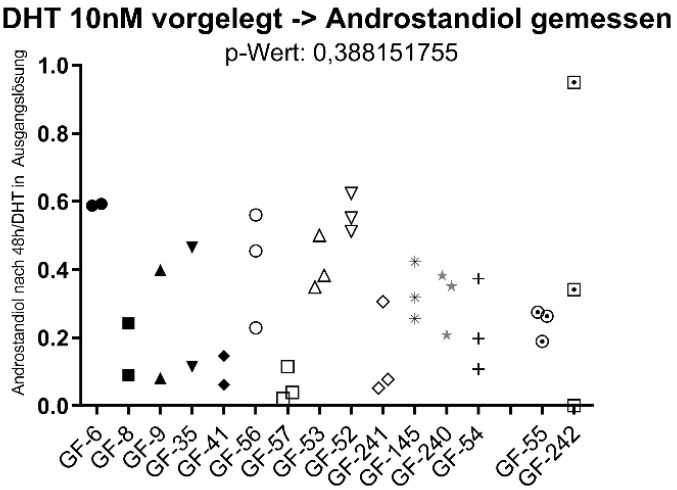
Bei Inkubation mit DHT 10 nM kommt es rechnerisch zu einem deutlich geringeren Quotienten, sodass hiernach keine Steigerung der Aktivität des Backdoor-Pathways möglich war.

Eine vermehrte Bildung von Androsteron wurde nicht beobachtet.

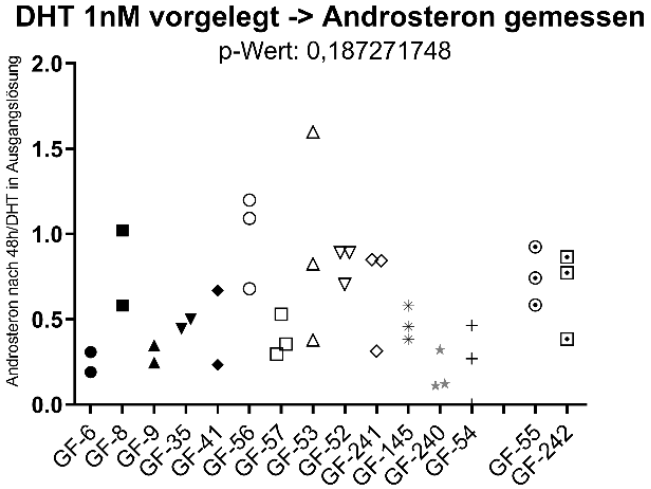
17a


DHT 1nM vorgelegt -> Androstandiol gemessen
p-Wert: 0,00032208
Androstandiol nach 48h/DHT in Ausgangslösung
0
1
2
3
4
5
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

17b


DHT 10nM vorgelegt -> Androstandiol gemessen
p-Wert: 0,388151755
Androstandiol nach 48h/DHT in Ausgangslösung
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

17c


DHT 1nM vorgelegt -> Androsteron gemessen
p-Wert: 0,187271748
Androsteron nach 48h/DHT in Ausgangslösung
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
GF-6
GF-8
GF-9
GF-35
GF-41
GF-56
GF-57
GF-53
GF-52
GF-241
GF-145
GF-240
GF-54
GF-55
GF-242

17d

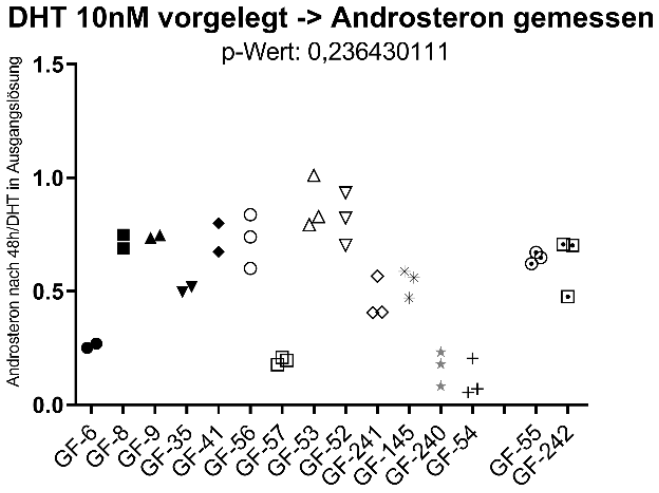


Abbildung 17 a-d Zellüberstand-Messung mit dem Massenspektrometer nach 48 h mit Dihydrotestosteron 1 bzw. 10 nM vorgelegt Es wurde DHT 1 bzw. 10 nM im APOD-Assay vorgelegt und anschließend mittels Massenspektrometrie im Zellüberstand nach 48 h die Hormone Androstandiol und Androsteron gemessen. Aus den Messwerten wurde ein Quotient gebildet, indem der Wert des gemessenen Hormons nach 48 h durch den Wert des vorgelegten DHT in der Ausgangslösung dividiert wurde. Somit zeigt der Wert 1 in der Ordinate 100 % an. Man sieht links im Graphen die Kontrollzelllinien, dessen Symbole schwarz ausgefüllt sind. Es wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Kontrollzelllinien (K) und den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) errechnet und mit dem p-Wert angegeben. Der p-Wert gilt bei $p \leq 0{,}05$ als signifikant. GF-55 und GF-242 zählen nicht in die Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression (M) und wurden bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Man beachte die unterschiedlichen Dimensionen der Ordinate in a-d, die an die jeweiligen Werte angepasst wurde.

5 Diskussion

5.1 APOD-Assay der Kontrollzelllinien und der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression

Der APOD-Assay ermöglichte es, die Aktivierung des ARs endogen in den GF, dem peripheren Zielgewebe für die Entwicklung der äußeren Genitale, zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde er durchgeführt, um die Fragestellung zu beantworten, ob auch die Androgene T und Andro den AR in den GF aktivieren können.

In den Versuchen zeigte sich, dass bei den gesunden Kontrollzelllinien das potente DHT die APOD-Expression am stärksten stimulierte, wobei bei den meisten Zellen bei DHT in einer Konzentration von 1 nM eine maximale Aktivierung erreicht wurde. Des Weiteren sah man beim T in beiden Konzentrationen eine deutliche Hochregulation im APOD-Assay, die insgesamt allerdings etwas schwächer war als die vom DHT. Hier konnte man zudem sehen, dass T mit steigender Konzentration auch eine stärkere Wirkung zeigte. Das Andro steigerte die APOD-Expression selbst in einer Konzentration von 100 nM mit Abstand am wenigsten. Des Weiteren konnte man erkennen, dass einige Kontrollzelllinien wie die GF-41 eine deutlich stärkere Induktion der APOD-Expression bei allen Hormonen erzeugten als andere, was die individuelle AR-Aktivität in den unterschiedlichen Kontrollfibroblasten widerspiegelt (Hornig *et al.*, 2016).

Bei der Untersuchung der Kontrollzelllinien konnte man allerdings nicht ausschließen, dass in den 48 h das T bereits über die 5α-Reduktase in DHT und das Andro über die 17ß-HSD in T umgewandelt wurde und man stattdessen deren Wirkung misst. Deshalb wurden außerdem Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mangel im APOD-Assay untersucht, die das T nicht bzw. kaum in DHT umwandeln können. Damit wurde der zweite Teil der ersten Fragestellung untersucht, bei dem nach Hinweisen gesucht wurde, die sich aus Funktionsverlust-Mutationen der 5α-Reduktase finden lassen. Hierbei zeigte sich, dass das DHT ähnlich wie bei den Kontrollzelllinien am besten im APOD-Assay funktionierte. In den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression steigerte das T ebenfalls sowohl bei einer Konzentration von 1 nM als auch von 10 nM die APOD-Expression. Bei T 1 nM haben die Kontrollzelllinien die APOD Expression mit einem p-Wert von 0,02951 signifikant stärker hochreguliert im Vergleich zu den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression, die kaum T in DHT umwandeln können. Hierbei lag der Mittelwert der Kontollzelllinien bei 2,53479 während der Mittelwert der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression bei 1,55017 lag. Bei den

Kontrollzelllinien könnte ein kleiner Anteil des T bereits in DHT metabolisiert worden sein, sodass man eine gemischte Wirkung aus beiden Hormonen sieht.

In dem Fall der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression konnte man jedoch sicher sein, dass aufgrund der fehlenden Aktivität der 5α-Reduktase kaum bis gar kein T in DHT umgewandelt werden konnte. Somit sah man dort die direkte Wirkung vom T. Zusammenfassend kann man deshalb erstmals sagen, dass T den AR in den humanen GF ebenfalls aktivieren kann.

Diese Ergebnisse könnten als Erklärungsmodell der äußeren Virilisierung von Patienten mit einem 5α-Reduktase-Mangel bei hoher T-Produktion während der Pubertät dienen.

Da Andro über die 17ß-HSD zu T metabolisiert wird und nicht über die 5α-Reduktase, könnte der Anstieg in der APOD-Expression bei Andro 100 nM stattdessen immer noch die Wirkung vom T sein. Aus diesem Grund konnte man durch diesen Versuch keine sichere Aussage zu der oben genannten Fragestellung treffen, sondern müsste den Versuchsaufbau mit Zelllinien mit einer 17ß-HSD-Mutation wiederholen.

Auch bei den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression zeigte sich eine Variabilität der APOD-Induktion zwischen den einzelnen Zelllinien. Im Gegensatz zu den Kontrollzelllinien lag hier z.B. die Zelllinie GF-145 deutlich unter dem Cut-off von 2,29 bei der APOD-Induktion bei Vorlage von DHT, welcher Kontrollzelllinien von Zelllinien mit AR-Funktionsverlustmutationen unterschied (Hornig *et al.*, 2016). Diese Zelllinie zeigte neben dem 5α-Reduktase-Mangel somit auch eine Androgenresistenz, da die APOD-Induktion trotz vorgelegtem DHT sehr gering ist. Oligogene Ursachen einer Veränderung der Geschlechtsentwicklung wurden bereits beschrieben (Camats, Flück und Audí, 2020) und könnten in dieser Zelllinie vorliegen.

5.1.1 Sequenzierung der Zellen mit V.a. 5α-Reduktase-Mutation

Die Durchführung des APOD-Assays an Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation diente als Modell zur Überprüfung, ob man die Wirkung vom T im APOD-Assay sehen kann. Für diese Untersuchung mussten zunächst die Zelllinien mit V.a. eine 5α-Reduktase-Mutation sequenziert werden. Dabei wurden sieben Zelllinien mit einer homozygoten Mutation gefunden, eine mit einer heterozygoten Mutation und bei zwei Zelllinien wurde keine Mutation gefunden. Bei der Zelllinie GF-242 wurde zwar eine homozygote Mutation gefunden, aber da es sich um Hodengewebe handelt, das kein 5α-Reduktase-Enzym besitzt, wurde diese Zelllinie genauso wie die GF-55 mit heterozygoter Mutation aus der Gruppe der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression ausgeschlossen. GF-242 konnte aufgrund der fehlenden Expression der 5α-

Reduktase als Kontrollzelllinie verwendet werden, mit der die anderen 5α-Reduktase-Mutationszelllinien verglichen werden konnten. Interessanterweise zeigte die Hodenzelllinie im Vergleich eine deutlich stärkere Umwandlung von Andro zu T. GF-55 wies trotz heterozygoter Mutation eine fehlende Umwandlung von T zu DHT auf, ähnlich wie die homozygoten Mutationszelllinien. Die Studie von Hackel *et al.*, 2005 zeigt, dass möglicherweise auch Fälle mit heterozygoten 5α-Reduktase-Mutationen zu einer 5α-Reduktase-Defizienz führen können. Es ist also nicht auszuschließen, dass auch heterozygote Mutationen einen Einfluss auf die endogene DHT-Produktion haben. Allerdings könnte es auch sein, dass die Zelllinie GF-55 nur das mutierte Allel exprimiert.

Die in der Literatur angegebenen Restaktivitäten der 5α-Reduktase bei der jeweiligen Mutation stimmen nicht komplett mit unseren Ergebnissen im APOD-Assay und den Zellüberstand-Messungen überein. So haben bei „T 1 nM vorgelegt" (Abbildung 11) die Zelllinien mit einer laut Literatur höheren Restaktivität wie z.B. die GF-145 und die GF-57 in den 48 h nicht mehr T in DHT umgewandelt verglichen mit den Zelllinien mit einer eher niedrigen Restaktivität wie die GF-56 oder die GF-53. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die mRNA-Expression der 5α-Reduktase in den Zelllinien untersucht. Hiermit sollte eine weitere Einflussgröße auf die Ergebnisse geprüft werden. Doch auch hier konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der relativen Expression der mRNA und den Ergebnissen im APOD-Assay und den Zellüberstand-Messungen festgestellt werden. Die Zelllinien GF-52 und GF-241 zeigten die gleiche Mutation, nur dass bei der GF-241 eine höhere mRNA-Expression gemessen wurde. Allerdings hat die Zelllinie GF-241 bei den Zellüberstand-Messungen auch nicht mehr T in DHT umgewandelt (Abbildung 11). Hieran kann man sehen, dass noch weitere Einflussgrößen eine Rolle spielen für die Wirkung der 5α-Reduktase. Es könnte zudem sein, dass zellspezifische Unterschiede nach 48h nicht mehr so stark sichtbar sind. Weiterführende Experimente mit geringeren Inkubationszeiten könnten weitere Aufschlüsse geben.

Man konnte aber sehen, dass z.B. die beiden Zelllinien GF-54 und GF-240, bei denen keine Mutation gefunden wurde, vergleichsweise wenig 5α-Reduktase-mRNA exprimierten. Dies könnte die geringere Metabolisierung von T zu DHT in diesen beiden mutationsnegativen Zelllinien erklären. Da sowohl eine verminderte 5α-Reduktase-Expression als auch eine 5α-Reduktase-Mutation zu einer verminderten Gesamtwirkung der 5α-Reduktase in einer Zelllinie führen kann, wurden die Zelllinien mit homozygoter Mutation und die beiden Zelllinien GF-54 und GF-240 mit geringer 5α-Reduktase-Expression zusammengefasst zu einer Gruppe mit Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression.

5.2 Zellüberstand-Messungen

Der Versuch war so angelegt, dass der Zellüberstand im APOD-Assay nach 48 h Hormoninkubation eingefroren wurde, um im Massenspektrometer die Hormonkonzentrationen nach dieser Zeitspanne untersuchen zu können. Mit den Zellüberstand-Messungen im Massenspektrometer sollte beantwortet werden, wie die Steroidhormone in den GF metabolisiert werden. Zusätzlich wurde untersucht, welche Unterschiede sich ergeben, wenn die 5α-Reduktase mutiert ist.

5.2.1 Zellüberstand-Messungen: Androstendion vorgelegt

Bei „Andro 10 nM vorgelegt → Andro gemessen“ (Abbildung 8a) und „Andro 100 nM vorgelegt → Andro gemessen“ (Abbildung 9a) sah man, dass nach 48 h bei den meisten Zelllinien noch zwischen 50 und 100 % der vorgelegten Andro-Konzentration von 10 nM bzw. 100 nM vorhanden war. Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollzelllinien und den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression, wie die p-Werte von 0,5237 bei „Andro 10 nM vorgelegt“ und von 0,4286 bei „Andro 100 nM vorgelegt“ zeigten.

In Abbildung 8b sowie Abbildung 9b wurde „Andro 10 nM/100 nM vorgelegt → T gemessen“ graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass bei beiden Gruppen nach 48 h nur ein geringer Anteil von etwa 1-3 % in T umgewandelt wurde. Somit ergab sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Dies weist am ehesten auf eine insgesamt geringe Aktivität der 17ß-HSD in diesen Zellen hin.

Ähnlich sah es bei „Andro 10 nM vorgelegt → DHT gemessen“ (Abbildung 8c) und „Andro 100 nM vorgelegt → DHT gemessen“ (Abbildung 9c) aus, wo ebenfalls bei beiden Gruppen kaum DHT entstanden ist. Während sich jedoch in der niedrigeren Konzentration von „Andro 10 nM vorgelegt“ kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen darstellte, zeigte sich in der höheren Konzentration von „Andro 100 nM vorgelegt“ mit einem p-Wert von 0,01732, dass die Kontrollzelllinien in dieser hohen Konzentration signifikant mehr Andro in DHT umgewandelt haben als die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression. Trotzdem blieb es mit einem Mittelwert der Quotienten bei den Kontrollzelllinien von 0,00999 und bei den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression von 0,00320 ein insgesamt geringer Effekt.

Als Ausreißer sieht man die aus Hodengewebe gewonnene GF-242, bei der mit ca. 5 % auffällig mehr Andro in T umgewandelt wurde, was darauf hinweisen könnte, dass die T-Produktion im Hodengewebe höher ist als im peripheren Zielgewebe.

Insgesamt fällt in diesen Messungen auf, dass die Kontrollzelllinie GF-41 nach 48 h das gesamte vorgelegte Andro metabolisiert hat. Dabei ist nach 48 h kein T messbar, aber mit ca. 2 % auffallend mehr DHT als bei den anderen Zelllinien. Dies deutet auf eine individuelle variable Enzym-Aktivität oder -Menge in den unterschiedlichen GF hin.

5.2.2 Zellüberstand-Messungen: Testosteron vorgelegt

Legte man T vor (Abbildung 11b, Abbildung 12b), fielen in beiden Konzentrationen besonders die Kontrollzelllinie GF-41 und die Zelllinien GF-54 und GF-240 mit geringer 5α-Reduktase-Expression auf, da bei ihnen kein bzw. kaum T nach 48 h mehr zu messen war. Sie haben das gesamte T somit metabolisiert. Dabei hat die Zelllinie GF-41 das T v.a. in DHT umgewandelt, während die beiden Zelllinien GF-54 und GF-240 das T hauptsächlich in Andro umgewandelt haben. Somit kann man vermuten, dass die Kontrollzelllinie GF-41 insgesamt eine sehr hohe Enzym-Aktivität hat, da sie bereits das Andro sehr schnell metabolisiert hat (s.5.2.1). Die anderen beiden Zelllinien scheinen bei bekannter 5α-Reduktase-Mutation stattdessen eine vermehrte Aktivität der 17ß-HSD als Alternativweg aufzuweisen. Man sieht an diesem Beispiel damit erneut einen Hinweis auf eine mögliche individuell variable Enzym-Aktivität. Insgesamt sah man keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Schaut man sich nun „T 1 nM bzw. 10 nM vorgelegt → Andro gemessen“ (Abbildung 11a, Abbildung 12a) an, erkennt man, dass die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression mit einem Mittelwert der Quotienten von 0,27730 bei „T 1 nM vorgelegt“ sowie 0,29511 bei „T 10 nM vorgelegt“ signifikant mehr T in Andro umgewandelt haben als die Kontrollzelllinien mit Mittelwerten von 0,01714 bei „T 1 nM vorgelegt“ und 0,00806 bei „T 10 nM vorgelegt“. Dies bestätigten die p-Werte von 0,004257 und 0,001554 bei den jeweiligen Hormonkonzentrationen. Da diese Reaktion reversibel ist und die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression kaum DHT herstellen können, könnte sich das Gleichgewicht zugunsten des Andros in diesen Zelllinien verschieben. Auffällig waren die beiden Zelllinien GF-54 und GF-240 mit der geringen 5α-Reduktase-Expression, die in diesem Fall mit ca. 60-80 % besonders viel Andro gebildet haben. Sowohl die Kontrollzelllinien als auch die GF-55 mit der heterozygoten Mutation und die aus Hodengewebe gewonnene GF-242 metabolisierten kaum T in Andro.

Im Gegensatz dazu metabolisierten bei „T 1 nM bzw. 10 nM vorgelegt → DHT gemessen“ (Abbildung 11c, Abbildung 12c) die Kontrollzelllinien mit MW der Quotienten von 0,50056 und

0,39677 in der jeweiligen Hormonkonzentration signifikant mehr T in DHT als die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression mit MW von 0,12630 und 0,15312. Die p-Werte betrugen hier 0,01031 bei „T 1 nM vorgelegt" und 0,01865 bei „T 10 nM vorgelegt". Dies war zu erwarten, da die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression kaum DHT in T umwandeln können. Besonders die Kontrollzelllinien Kis42 und Kis30 haben sehr viel T in DHT umgewandelt. Dies könnte dadurch erklärt sein, dass bei diesen Zelllinien eine besonders große Menge an 5α-Reduktase-mRNA gemessen wurde (Tabelle 20) und sie somit schneller T in DHT umwandeln können. Aber auch die meisten Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression haben einen Teil des vorgelegten T zu DHT metabolisiert und wiesen somit eine geringe Restaktivität auf.

Die Hodenzelllinie GF-242, die als Hodengewebe das 5α-Reduktase-Typ-II-Enzym scheinbar nicht exprimiert (Thigpen *et al.*, 1993), metabolisiert zusammenfassend insgesamt kaum T, weder zu DHT noch zu Andro. Die Zelllinie GF-55 mit heterozygoter Mutation verhält sich in diesem Fall ähnlich. In der Literatur zeigt sich, dass zumindest Patienten mit compound heterozygoter Mutation ebenfalls den Phänotyp einer 5α-Reduktase-II-Defizienz aufweisen können (Thigpen *et al.*, 1992). Zu der in der Zelllinie GF-55 gefundenen Mutation wird beschrieben, dass die 5α-Reduktase durch diese Mutation kaum T mehr binden kann und somit das T auch nicht zu DHT metabolisieren kann (Nordenskjöld and Ivarsson, 1998).

5.2.3 Zellüberstand-Messungen: Dihydrotestosteron vorgelegt

Bei „DHT 1 nM vorgelegt → DHT gemessen" (Abbildung 14c) konnte man sehen, dass bei den meisten Zelllinien nach 48 h noch viel DHT vorhanden war und das DHT somit kaum metabolisiert wurde. Es ergab sich mit dem p-Wert von 0,09324 kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Einige Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression wie z.B. die GF-54 und die GF-240 haben in dieser Zeit allerdings die Mehrheit des vorgelegten DHT metabolisiert, während die Kontrollzelllinien insgesamt eher wenig von dem DHT metabolisiert haben. Es hat sich in dieser Zeit aber weder bei den Kontrollzelllinien noch bei den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression eine größere Menge Andro oder T gebildet. Auch hier ergaben sich jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Gruppen (Abbildung 14a und b).

In der höheren Konzentration von 10 nM (Abbildung 15c) konnte man nun mit einem p-Wert von 0,04507 einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollzelllinien und den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression beobachten. Bei den Kontrollzelllinien war nach 48 h mit einem MW der Quotienten von 0,86387 noch signifikant mehr DHT

messbar als bei den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression mit einem MW von 0,47089. Vor allem die beiden Zelllinien GF-54 und GF-240 mit geringer 5α-Reduktase-Expression haben auch in dieser Konzentration besonders viel von dem vorgelegten DHT in dieser Zeit metabolisiert.

Wurden dann Andro und T gemessen, so ergab sich ein ähnliches Bild wie bei „DHT 1 nM vorgelegt". Es entstand auch hier kaum etwas von diesen Hormonen und man konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen (Abbildung 15a und b). Dies war zu erwarten, da DHT nicht über die 5α-Reduktase zurück zu T umgewandelt werden kann.

Es stellte sich die Frage, in was das DHT v.a. bei den Zelllinien GF-54 und GF-240 metabolisiert wurde.

5.2.4 Zellüberstand-Messungen: Dihydrotestosteron vorgelegt → Androstandiol und Androsteron gemessen

Um zu untersuchen, in was das DHT metabolisiert wurde (Abbildung 17), wenn nicht in Andro oder T, wurden zusätzlich Hormone aus dem Backdoor-Pathway aus den Zellüberständen in der Hormonanalytik gemessen. Über den Backdoor-Pathway kann DHT durch die 3α-HSD zu Androstandiol umgewandelt werden und aus Androstandiol kann durch die 17ß-HSD Androsteron entstehen. Da Androstandiol und Androsteron die am meisten im männlichen fetalen Kreislauf zirkulierenden Androgene aus dem Backdoor-Pathway sind (O'Shaughnessy *et al.*, 2019), wurden bei „DHT vorgelegt" zusätzlich diese beiden Androgene untersucht.

Besonders bei „DHT 1 nM vorgelegt" bildeten die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression mit einem MW der Quotienten von 2,37640 signifikant mehr Androstandiol als die Kontrollzelllinien mit einem MW von 0,91879. Der p-Wert betrug 0,00032208. Während sich bei „DHT 1 nM vorgelegt" scheinbar die drei- bis fünffache Menge an Androstandiol gebildet hat, war der Effekt in höherer Konzentration bei „DHT 10 nM vorgelegt" (Abbildung 17b) insgesamt weniger ausgeprägt, wobei auch hier DHT in Androstandiol metabolisiert wurde. In der Konzentration 10 nM ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Es entstand allerdings nicht nur Androstandiol, sondern auch viel Androsteron (Abbildung 17c und d). Zwischen den beiden Gruppen zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied. Vor allem bei „DHT 10 nM vorgelegt" sah man, dass einige Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression wie die GF-54, GF-57 und GF-240, aber auch die Kontrollzelllinie GF-6 vergleichsweise wenig Androsteron gebildet haben.

Insgesamt zeigt sich somit, dass die Zelllinien beider Gruppen das vorgelegte DHT zum Teil in die beiden Androgene aus dem Backdoor-Pathway metabolisieren, da sie das DHT im Delta-5-Pathway nicht zurück in T und Andro metabolisieren können. Dort katalysiert die 5α-Reduktase lediglich die Metabolisierung von T in DHT und nicht andersherum. Da der Effekt bei höherer Konzentration des vorgelegten DHTs nicht mehr so stark ist, könnten die beiden Enzyme 3α-HSD und 17ß-HSD des Backdoor-Pathways bei hohen Konzentrationen gesättigt sein oder der Backdoor-Pathway weist insgesamt eine limitierte Kapazität auf.

5.2.5 Zellüberstand-Messungen: Zusammenfassung

Nach der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit zeigt sich in Bezug auf die zweite Fragestellung, dass in den Genitalhautfibroblasten vor allem der Delta-5-Steroidbiosyntheseweg aktiv ist, bei dem Andro über die 17ß-HSD zu T umgewandelt wird und T über die 5α-Reduktase zu DHT. Da in den Messungen ein Teil des DHTs metabolisiert wurde, sich das DHT aber nicht in T oder Andro umgewandelt hat, wurde hier zusätzlich mit Androstandiol und Androsteron ein kleiner Abschnitt des Backdoor-Pathways untersucht. Dabei zeigte sich, dass dieser Weg ebenfalls von den GF genutzt wird und dass viel DHT in Androstandiol und Androsteron umgewandelt wird.

Vergleicht man nun den Steroidbiosyntheseweg in den Kontrollzelllinien mit dem in den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression, so zeigen sich einige Unterschiede. Hat man Andro in hoher Konzentration vorgelegt, wurde es bei den Kontrollzelllinien signifikant mehr in DHT metabolisiert. Dies liegt am ehesten an der funktionierenden 5α-Reduktase in den Kontrollzelllinien, da die Metabolisierung im Delta-5-Steroidbiosyntheseweg über T zu DHT stattfindet und die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression kaum T zu DHT umwandeln können. Dies ist ebenfalls der Grund, warum die Kontrollzelllinien bei „T vorgelegt“ signifikant mehr T in DHT umgewandelt haben. Interessanterweise wurde von den GF mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression stattdessen der Weg zurück von T über die 17ß-HSD zu Andro gewählt. Bei „DHT vorgelegt“ war bei den Kontrollzelllinien noch signifikant mehr DHT messbar, während die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression v.a. in kleiner Konzentration mehr von dem DHT in Androstandiol umgewandelt haben.

Man kann aus den in dieser Arbeit erhobenen Daten also vermuten, dass bei Patienten mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression einerseits ein gewisser „Rückfluss“ in die Bildung von Androstendion durch Substratstau stattfindet und andererseits eine gewisse Aktivierung des Backdoor-Pathways ausgelöst wird.

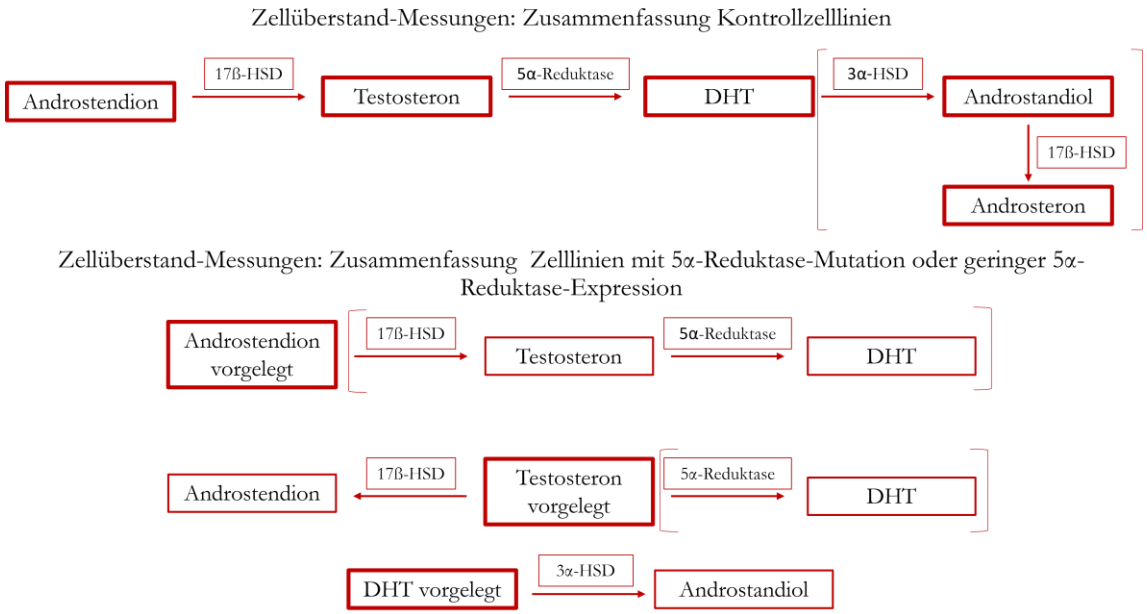


Abbildung 18 Vereinfachte graphische Zusammenfassung der Zellüberstand-Messungen der Kontrollzelllinien und der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression Die Kontrollzelllinien metabolisieren die untersuchten Androgene am ehesten über den Delta-5-Steroidbiosyntheseweg, wobei DHT teilweise weiter zu Androstandiol und Androsteron metabolisiert wird. Ein Teil der vorgelegten Androgene wurden sowohl bei den Kontrollzelllinien als auch bei den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression nach den untersuchten 48 h noch nicht metabolisiert. Wird bei den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression Androstendion vorgelegt, wird es kaum in die weiteren untersuchten Androgene metabolisiert, während das vorgelegte Testosteron hauptsächlich zurück in Androstendion metabolisiert wird. Wenn DHT v.a. in niedriger Konzentration vorgelegt wird, wird es signifikant mehr in Androstandiol metabolisiert als bei den Kontrollzelllinien.

5.3 Methoden-Kritik und Ausblick

In dem jetzigen Versuchsaufbau konnte man nicht sicher sagen, ob bei „Andro vorgelegt“ nicht das in den 48 h bereits über die 17ß-HSD aus Andro metabolisierte T für die APOD-Induktion verantwortlich ist, auch wenn Andro vorgelegt wurde. Um sicher sagen zu können, dass Andro zu einer Induktion des APOD-Assays führt, müsste man in Zukunft denselben Versuchsaufbau mit Zelllinien mit 17ß-HSD-Mutation durchführen, was aufgrund der zeitlichen Beschränkungen dieser Arbeit nicht mehr möglich war. Des Weiteren wurde nur eine kleine Anzahl an Kontrollzelllinien und Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation untersucht, da es nur eine begrenzte Zahl an Patientenproben gab. Aus diesem Grund haben die signifikanten Unterschiede in dieser Arbeit keine große Power und müssen als Trend gesehen werden. Zudem erfolgten die Experimente jeweils nur in doppeltem bzw. dreifachem Ansatz und es wurden zuerst alle Kontrollzelllinien untersucht und im Anschluss alle Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation hintereinander, statt die Untersuchungen

zeitlich zu mischen. Um eine stärkere Gemeingültigkeit der Daten zu erlangen, müsste der Versuch deshalb bei einer größeren Gruppe von Zelllinien durchgeführt werden. Ergänzt werden muss jedoch, dass es sich bei 5α-Reduktase-Mutation oder -Mangel um eine sehr seltene Erkrankung handelt und die bestehende Anzahl definierter Zelllinien bereits außergewöhnlich hoch ist.

Sowohl die Vorexperimente dieser Doktorarbeit als auch die Erfahrungen der Labormitarbeiter nach der Arbeit von Hornig *et al.*, 2016 deuten darauf hin, dass die transkriptionelle Aktivierung von APOD relativ langsam ist während die Metabolisierung der Hormone schneller verläuft. Aus diesem Grund wurde nach kleineren Vorexperimenten für diese Doktorarbeit eine Inkubationszeit von 48 h festgelegt. Die bisher publizierte APOD-Induktionszeit lag jedoch bei 72 h und somit wurde der Cut-off zur Unterscheidung zwischen gesunden männlichen Patienten, Patienten mit anderer DSD als AIS und Patienten mit AIS dort bei 72 h berechnet. Ein Cut-off für 48 h müsste erst berechnet werden.

Ein weiterer Faktor, der in der jeweiligen APOD-Induktion der einzelnen Zelllinien eine größere Rolle zu spielen scheint, ist, dass die Enzyme in den einzelnen Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert sind, sodass es auch innerhalb der Kontrollzelllinien und der Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation deutliche Unterschiede in der APOD-Induktion und der Hormonanalytik gab. Dies deutet auf interindividuelle multifaktorielle Einflüsse auf diesen Versuchsaufbau hin, da nicht nur die einzelnen Mutationen zu beachten sind.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit nur ausgewählte Hormone des Delta-5- und des Backdoor-Steroidbiosynthesewegs untersucht. Somit kann man nicht ausschließen, dass die untersuchten Hormone nach 48 h noch zusätzlich in weitere Hormone metabolisiert wurden.

Bei der Interpretation der gemessenen Androstandion- und Androsteron-Werten nach Inkubation mit DHT muss man beachten, dass das Kohle-behandelte Medium, dass für die Zellkulturen verwendet wurde, nur auf die Abwesenheit von Testosteron, Dihydrotestosteron und Androstendion getestet wurde. Es ist zwar anzunehmen, dass das Kohle-behandelte Medium auch diesbezüglich steroidfrei ist, Androstandion und Androsteron wurden allerdings nicht explizit getestet, sodass die gemessenen Werte theoretisch auch durch noch vorhandene Androgene in dem Medium verfälscht sein könnten.

Eine Schwäche dieser Arbeit ist die letztlich hohe Variabilität der gemessenen Hormonkonzentrationen in den Ausgangsmedien. Durch die durchgeführte Normalisierung mit der Quotientenbildung ließen sich die Werte letztlich für die Auswertung verwenden, sind aber nicht mehr als Rohdaten zu sehen. Der klare Grund für die Schwankungen konnte im Nachhinein nicht mehr nachvollzogen werden. In den meisten Experimenten anderer Forschung werden die Ausgangslösungen

wahrscheinlich gar nicht auf ihre letztendliche Hormonkonzentration gemessen, sodass bestimmte Abweichungen gegebenenfalls immer mal wieder vorkommen können und unterschiedlichste Ursachen haben können. Es muss zudem beachtet werden, dass es bei der Hormonanalytik sowohl einen Intraassay- als auch einen Interassay-Variationskoeffizienten gibt, der für das Labor bei der Validierung der Methode bestimmt wurde (s. Anhang). Dieser zeigt, dass die Messdaten der Hormonanalytik gewissen Messschwankungen unterliegen. Insgesamt kann man somit sagen, dass die in dieser Arbeit gemessenen Daten eher als Trend gesehen werden müssen, der die Grundlage für weitere Experimente darstellen kann.

Insgesamt zeigt sich, dass man den hier erarbeiteten Versuchsaufbau in der Zukunft für weitere Untersuchungen noch deutlich in verschiedene Richtungen erweitern kann.

6 Zusammenfassung

Testosteron bewirkt durch Aktivierung des Androgenrezeptors die Ausbildung der inneren männlichen Geschlechtsorgane. Für die äußere Virilisierung wird Testosteron über die 5α-Reduktase Typ II in Dihydrotestosteron umgewandelt. Patienten mit 5α-Reduktase-Mangel können bei hohem Testosteron-Anstieg in der Pubertät jedoch auch virilisieren. Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, wie Testosteron und dessen Vorstufe Androstendion in Genitalhautfibroblasten von männlichen Kontrollen sowie Patienten mit geringer 5α-Reduktase-Expression metabolisiert werden und ob sie den Androgenrezeptor direkt aktivieren können.

Der APOD-Assay bietet die Möglichkeit, die Androgenrezeptor-Aktivierung endogen in Genitalhautfibroblasten, dem peripheren Zielgewebe für die Entwicklung des äußeren Genitals, zu untersuchen, indem es die Androgen-abhängige Induktion des Androgenrezeptor-Zielgens Apoliprotein D misst.

Es wurde in 5 Genitalhautfibroblasten-Kontrollzelllinien und in 8 Genitalhautfibroblasten-Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression die Androgenrezeptor-Aktivierung bei Inkubation mit Dihydrotestosteron, Testosteron und Androstendion im APOD-Assay nach 48 h bestimmt. Parallel wurden in den Zellüberständen Hormonkonzentrationen mittels Massenspektrometrie gemessen.

Kontrollzelllinien und Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression wiesen unterschiedliche APOD-Induktionen im Assay auf. Hierbei hatte Dihydrotestosteron den stärksten Effekt, gefolgt von Testosteron. Bei Inkubation mit 1 nM Testosteron war die APOD Expression in den Kontrollzelllinien signifikant höher als in den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression ($p=0,02953$). Zudem zeigte sich, dass die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression signifikant mehr Testosteron in Androstendion umwandelten als die Kontrollzelllinien ($p=0,004257$). Dafür wandelten die Kontrollzelllinien signifikant mehr Testosteron in Dihydrotestosteron um als die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression ($p=0,01031$). Da man bei Inkubation mit Dihydrotestosteron sehen konnte, dass ein Teil des Dihydrotestosterons in den 48 h metabolisiert wurde, sich jedoch nicht mehr Testosteron oder Androstendion gebildet hat, wurden zudem mit Androsteron und Androstandiol zwei Hormone aus dem Backdoor-Pathway untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Teil des Dihydrotestosterons sowohl bei den Kontrollzelllinien als auch bei den Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression in die beiden untersuchten Androgene des Backdoor-Pathways metabolisiert werden.

In dieser Arbeit wurde somit zum ersten Mal experimentell gezeigt, dass im Zellsystem humaner genitaler Hautfibroblasten nicht nur Dihydrotestosteron, sondern auch Testosteron direkt den Androgenrezeptor aktiviert. Bislang ging man davon aus, dass das äußere Genital vermutlich ausschließlich durch Dihydrotestosteron ausdifferenziert. Zudem wurde gezeigt, dass in den Genitalhautfibroblasten v.a. der Delta-5-Steroidbiosyntheseweg aktiv ist, bei dem Androstendion über die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase III zu Testosteron umgewandelt wird und Testosteron über die 5α-Reduktase Typ II zu Dihydrotestosteron. Die Kontrollzelllinien haben somit signifikant mehr Androstendion und Testosteron in Dihydrotestosteron umgewandelt, während die Zelllinien mit 5α-Reduktase-Mutation oder geringer 5α-Reduktase-Expression Testosteron über die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase III zurück zu Androstendion metabolisiert haben, da Testosteron nicht weiter in Dihydrotestosteron umgewandelt werden konnte.

7 Anhang

7.1 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION

A.D. 1665

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

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

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel
Telefon 0431 / 597-1809
Telefax 0431 / 597-5333
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 10. März 2014

AZ.:	**D 421/14** (bitte stets angeben)
In Bezug auf:	**Aktenzeichen D 415/11 und D401/14**
Studienplan:	**Gewebeprobe zur Erforschung der Geschlechtsentwicklung** Antrag vom 04.03.2014, Aufklärungsbogen, Einwilligungserklärung, Fragebogen
Antragsteller:	**Prof. Dr. med. P.-M. Holterhus**
Antrag vom:	**4. März 2014 (Eingang: 7. März 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 Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Wir bitten um Beachtung folgender Hinweise:

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 bei dem Projektleiter und den an der Studie teilnehmenden Ärzten teilnehmenden Ärzten.

3. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass für eventuell in Zukunft weitere teilnehmende Zentren eine berufsrechtliche Beratung bei der jeweils für sie zuständigen Ethik-Kommission erforderlich ist.

4. 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

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION

A.D. 1665

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

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

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

Telefon 0431 / 597-1809
Telefax 0431 / 597-5333
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 10. Juni 2014

AZ.: **D 421/14** (bitte stets angeben)
In Bezug auf: **Aktenzeichen D 415/11 und D401/14**
Studienplan: **Gewebeprobe zur Erforschung der Geschlechtsentwicklung**
Antrag vom 26.052014, Aufklärungsbogen, Einwilligungserklärung, Fragebogen
Antragsteller: **Prof. Dr. med. P.-M. Holterhus**
Antrag vom: **26. Mai 2014 (Eingang: 5. Juni 2014)**
Erweiterung der Kontrollgewebesammlung auf Kinder

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 Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Wir bitten um Beachtung folgender Hinweise:

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 bei dem Projektleiter und den an der Studie teilnehmenden Ärzten.

3. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass für eventuell in Zukunft weitere teilnehmende Zentren eine berufsrechtliche Beratung bei der jeweils für sie zuständigen Ethik-Kommission erforderlich ist.

4. Nach Abschluss der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

5. Im Aufklärungsbogen sollte die Abkürzung „i. R." ausgeschrieben und die Rechtschreibung (z. B. „genial" statt „genital") überprüft werden.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

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

Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION

A.D. 1665

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

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

Telefon 0431 / 597-1809
Telefax 0431 / 597-5333
ethikkomm@email.uni-kiel.de

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

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

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION

A.D. 1665

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

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

Telefon 04 31 / 500-14 191
Telefax 04 31 / 500-14 195
ethikkomm@email.uni-kiel.de

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

Datum:
25. Oktober 2016

AZ.:	**D 552/16** (bitte stets angeben)
In Bezug auf:	Aktenzeichen D 421/14; D401/14; D 410/08
Studienplan:	**Identifikation hoch selektiver Androgenrezeptor Koregulatoren auf Basis eines funktionellen in-vitro Modells der Androgenresistenz** Antrag mit Projektbeschreibung (DFG-Antrag)
Antragsteller und Projektleiter:	**Prof. Dr. med. P.-M. Holterhus, UKSH, Campus Kiel**
Antrag vom:	**19.10.2016 (Eingang: 21.10.2016)**

Sehr geehrter, lieber 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 stellvertretenden Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Wir bitten um Beachtung folgender Hinweise:

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 bei dem Projektleiter.

3. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ingolf Cascorbi
Stv. Vorsitzender der Ethik-Kommission

Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

7.2 Variationskoeffizient der Hormonanalytik

Im Rahmen der Validierung der Hormonanalytik wurden die Intraassay- und Interassay-Variationskoeffizienten für Andro, T und DHT für die Methode in unserem Labor ermittelt. Für die Berechnung wurden Konzentrationen der jeweiligen Hormone von 1,4 - 5800 ng/dl verwendet (Kulle *et al.*, 2010).

Tabelle 21 Variationskoeffizienten der Hormonanalytik

Steroid	Konzentration ng/dl (nmol/l)	n	Intraassay-Variations-koeffizient %	Interassay-Variations-koeffizient %
Andro	28,6 (1)	10	14,2	7,0
	286 (10)	10	8,8	6,1
	1430 (50)	10	4,5	3,1
T	28,8 (1)	10	7,1	4,9
	288 (10)	10	5,9	4,6
	1440 (50)	10	3,7	2,7
DHT	29 (1)	10	14,5	11,0
	290 (10)	10	14,1	9,6
	1450 (50)	10	13,6	9,5

7.3 Mittelwerte der APOD-Werte sowie der Quotienten der Hormonanalytik

Tabelle 22 Mittelwerte der gemessenen APOD-Werte sowie Mittelwerte der gebildeten Quotienten aus der Hormonanalytik der Zellüberstände in den Kontroll-Zelllinien sowie den Zelllinien mit 5α-RD-Mutation oder geringer 5α-RD-Expression

Gruppe	Vorgelegtes Hormon	Vorgelegte Konzentration	MW APOD-Assay	MW Andro	MW T	MW DHT	MW Androstandiol	MW Androsteron
Kontroll-Zelllinien	Andro	10 nM	1,25513	0,48013	0,04803	0,02748		
	Andro	100 nM	1,82981	0,53718	0,01357	0,00999		
	T	1 nM	2,53479	0,01714	0,55864	0,50056		
	T	10 nM	2,94264	0,00806	0,56290	0,39677		
	DHT	1 nM	3,57140	0,00389	0,00549	0,91390	0,9187939	0,45383406
	DHT	10 nM	3,39477	0,00070	0,00075	0,86387	0,27791341	0,59306946
Zelllinien mit 5α-RD-Mutation oder geringer 5α-RD-Expression	Andro	10 nM	1,05782	0,62494	0,01818	0,01372		
	Andro	100 nM	1,45615	0,71799	0,01854	0,00320		
	T	1 nM	1,55017	0,27730	0,55610	0,12630		
	T	10 nM	2,70341	0,29511	0,67813	0,15312		
	DHT	1 nM	2,88811	0,03023	0,04134	0,61162	2,3764063	0,58963971
	DHT	10 nM	2,97131	0,00286	0,00164	0,47089	0,30790184	0,48638582

8 Literaturverzeichnis

Abacı, A. *et al.* (2019) 'Genotype–phenotype correlation, gonadal malignancy risk, gender preference, and testosterone/dihydrotestosterone ratio in steroid 5-alpha-reductase type 2 deficiency: a multicenter study from Turkey', *Journal of Endocrinological Investigation*. Springer International Publishing, 42(4), pp. 453–470. doi: 10.1007/s40618-018-0940-y.

Adachi, M. *et al.* (2000) 'Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease', *The New England journal of medicine*. N Engl J Med, 343(12), pp. 258–265. doi: 10.1056/NEJM200009213431205.

Ahmed, S. F. *et al.* (2013) 'Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD', *British Medical Bulletin*. Oxford Academic, 106(1), pp. 67–89. doi: 10.1093/BMB/LDT008.

Akcay, T. *et al.* (2014) '*AR* and *SRD5A2* gene mutations in a series of 51 Turkish 46,XY DSD children with a clinical diagnosis of androgen insensitivity', *Andrology*. Blackwell Publishing Ltd, 2(4), pp. 572–578. doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00215.x.

Alhomaidah, D., McGowan, R. and Ahmed, S. F. (2017) 'The current state of diagnostic genetics for conditions affecting sex development', *Clinical Genetics*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 91(2), pp. 157–162. doi: 10.1111/cge.12912.

Andersson, S. and Russell, D. W. (1990) 'Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5α-reductases', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 87(10), pp. 3640–3644. doi: 10.1073/pnas.87.10.3640.

Appari, M. *et al.* (2009) 'Apolipoprotein D (APOD) is a putative biomarker of androgen receptor function in androgen insensitivity syndrome', *Journal of Molecular Medicine*. NIH Public Access, 87(6), pp. 623–632. doi: 10.1007/s00109-009-0462-3.

Auchus, R. J. (2004) 'The backdoor pathway to dihydrotestosterone', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. Trends Endocrinol Metab, 15(9), pp. 432–438. doi: 10.1016/J.TEM.2004.09.004.

Audi, L. *et al.* (2010) 'Novel (60%) and Recurrent (40%) Androgen Receptor Gene Mutations in a Series of 59 Patients with a 46,XY Disorder of Sex Development'. doi: 10.1210/jc.2009-2146.

Ayers, K. *et al.* (2019) 'Functional analysis of novel desert hedgehog gene variants improves the clinical interpretation of genomic data and provides a more accurate diagnosis for patients with 46,XY differences of sex development', *Journal of Medical Genetics*, p. jmedgenet-2018-105893. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105893.

Baskin, L. S., Himes, K. and Colborn, T. (2001) 'Hypospadias and endocrine disruption: is there a connection?', *Environmental Health Perspectives*. National Institute of Environmental Health Sciences, 109(11), p. 1175. doi: 10.1289/EHP.011091175.

Biason-Lauber, A. (2010) 'Control of sex development', *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. Baillière Tindall, 24(2), pp. 163–186. doi: 10.1016/J.BEEM.2009.12.002.

Biason-Lauber, A. *et al.* (2013) 'Of marsupials and men: "Backdoor" dihydrotestosterone synthesis in male sexual differentiation', *Molecular and cellular endocrinology*. Mol Cell Endocrinol, 371(1–2), pp. 124–132. doi: 10.1016/J.MCE.2013.01.017.

Boudon, C. *et al.* (1995) 'Molecular study of the 5 alpha-reductase type 2 gene in three European families with 5 alpha-reductase deficiency.', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford Academic, 80(7), pp. 2149–2153. doi: 10.1210/jcem.80.7.7608269.

Brown, C. J. *et al.* (1989) 'Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism.', *American Journal of Human Genetics*. Elsevier, 44(2), p. 264. Available at: /pmc/articles/PMC1715398/?report=abstract (Accessed: 8 January 2023).

Camats, N., Flück, C. and Audí, L. (2020) 'Oligogenic Origin of Differences of Sex Development in Humans', *International journal of molecular sciences*. Int J Mol Sci, 21(5). doi: 10.3390/IJMS21051809.

Carpenter, T. O. *et al.* (1990) 'Variable Expression of 5 α -Reductase Deficiency: Presentation with Male Phenotype in a Child of Greek Origin*', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford Academic, 71(2), pp. 318–322. doi: 10.1210/jcem-71-2-318.

Carson-Jurica, M. A., Schrader, W. T. and O'Malley, B. W. (1990) 'Steroid receptor family: Structure and functions', *Endocrine Reviews*, 11(2). doi: 10.1210/edrv-11-2-201.

Chan, A. O. K. *et al.* (2009) 'Diagnosis of 5alpha-reductase 2 deficiency: A local experience', *Hong Kong Medical Journal*, 15(2), pp. 130–135.

Cohen-Kettenis, P. (2005) 'Gender change in 46,XY persons with 5alpha-reductase-2 deficiency and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency', *Archives of sexual behavior*. Arch Sex Behav, 34(4), pp. 399–410. doi: 10.1007/S10508-005-4339-4.

Drayna, D. *et al.* (1986) 'Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA', *Journal of Biological Chemistry*. J Biol Chem, 261(35), pp. 16535–16539. doi: 10.1016/S0021-9258(18)66599-8.

Drayna, D. T. *et al.* (1987) 'Human Apolipoprotein D Gene: Gene Sequence, Chromosome Localization, and Homology to the α2u-Globulin Superfamily', *DNA*. DNA, 6(3), pp. 199–204. doi: 10.1089/dna.1987.6.199.

Eggers, S. *et al.* (2016) 'Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort.', *Genome biology*. BioMed Central, 17(1), p. 243. doi: 10.1186/s13059-016-1105-y.

Elshan, N. G. R. D., Rettig, M. B. and Jung, M. E. (2019) 'Molecules targeting the androgen receptor (AR) signaling axis beyond the AR-Ligand binding domain', *Medicinal Research Reviews*. John Wiley and Sons Inc., pp. 910–960. doi: 10.1002/med.21548.

Erdoan, S. *et al.* (2011) 'Etiological classification and clinical assessment of children and adolescents with disorders of sex development', *JCRPE Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. Galenos Yayinevi, 3(2), pp. 77–83. doi: 10.4274/jcrpe.v3i2.16.

Flower, D. R. (2000) 'Beyond the superfamily: The lipocalin receptors', *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. Elsevier, pp. 327–336. doi: 10.1016/S0167-4838(00)00169-2.

Flück, C. E. *et al.* (2011) 'Why Boys Will Be Boys: Two Pathways of Fetal Testicular Androgen Biosynthesis Are Needed for Male Sexual Differentiation', *The American Journal of Human Genetics*. Cell Press, 89(2), pp. 201–218. doi: 10.1016/J.AJHG.2011.06.009.

Forti, G. *et al.* (1996) 'Steroid 5α-reductase 2 deficiency: virilization in early infancy may be due to partial function of mutant enzyme', *Clinical Endocrinology*. Blackwell Publishing Ltd, 44(4), pp. 477–482. doi: 10.1046/j.1365-2265.1996.673496.x.

Hackel, C. *et al.* (2005) 'New mutations, hotspots, and founder effects in Brazilian patients with steroid 5alpha-reductase deficiency type 2', *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. J Mol Med (Berl), 83(7), pp. 569–576. doi: 10.1007/S00109-005-0651-7.

Hiort, O. (2013) 'Clinical and Molecular Aspects of Androgen Insensitivity', *Endocrine Development*. Karger Publishers, 24, pp. 33–40. doi: 10.1159/000342499.

Hiort, O. and Holterhus, P. M. (2000) 'The molecular basis of male sexual differentiation.Hiort,

O., & Holterhus, P. M. (2000). The molecular basis of male sexual differentiation. European Journal of Endocrinology, 142(2), 101–110. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10664515', *European journal of endocrinology*, 142(2), pp. 101–10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10664515 (Accessed: 2 May 2019).

Hochberg, Z. *et al.* (1996) 'Clinical, biochemical, and genetic findings in a large pedigree of male and female patients with 5 alpha-reductase 2 deficiency.', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. The Endocrine Society, 81(8), pp. 2821–2827. doi: 10.1210/jcem.81.8.8768837.

Holterhus, P.-M. (2009) 'Störungen der Geschlechtsentwicklung', *Gynäkologische Endokrinologie*. Springer-Verlag, 7(3), pp. 130–135. doi: 10.1007/s10304-009-0312-y.

Holterhus, P. M., Piefke, S. and Hiort, O. (2002) 'Anabolic steroids, testosterone-precursors and virilizing androgens induce distinct activation profiles of androgen responsive promoter constructs', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Pergamon, 82(4–5), pp. 269–275. doi: 10.1016/S0960-0760(02)00220-0.

Hornig, N. C. *et al.* (2016) 'Identification of an AR mutation-negative class of androgen insensitivity by determining endogenous AR activity', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1210/jc.2016-1990.

Hughes, I. A. *et al.* (1986) 'Complete Androgen Insensitivity Syndrome Characterized by Increased Concentration of a Normal Androgen Receptor in Genital Skin Fibroblasts', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford Academic, 63(2), pp. 309–315. doi: 10.1210/JCEM-63-2-309.

Imperato-McGinley, J. and Zhu, Y. S. (2002) 'Androgens and male physiology the syndrome of 5α-reductase-2 deficiency', in *Molecular and Cellular Endocrinology*. Mol Cell Endocrinol, pp. 51–59. doi: 10.1016/S0303-7207(02)00368-4.

Jääskeläinen, J. (2012) 'Molecular biology of androgen insensitivity', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier, 352(1–2), pp. 4–12. doi: 10.1016/J.MCE.2011.08.006.

Jenster, G. *et al.* (1991) 'Domains of the Human Androgen Receptor Involved in Steroid Binding, Transcriptional Activation, and Subcellular Localization', *Molecular Endocrinology*. Oxford Academic, 5(10), pp. 1396–1404. doi: 10.1210/MEND-5-10-1396.

Knerr, J. *et al.* (2023) 'Formin-mediated nuclear actin at androgen receptors promotes transcription', *Nature 2023 617:7961*. Nature Publishing Group, 617(7961), pp. 616–622. doi: 10.1038/s41586-023-05981-1.

Kon, M. *et al.* (2015) 'Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients', *Human Reproduction*. Oxford University Press, 30(3), pp. 499–506. doi: 10.1093/humrep/deu364.

Koochekpour, S. (2010) 'Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer', *Asian Journal of Andrology*. Asian J Androl, pp. 639–657. doi: 10.1038/aja.2010.89.

Koryakina, Y., Ta, H. Q. and Gioeli, D. (2014) 'Androgen receptor phosphorylation: Biological context and functional consequences', *Endocrine-Related Cancer*. BioScientifica Ltd. doi: 10.1530/ERC-13-0472.

Kulle, A. E. *et al.* (2010) 'A Novel Ultrapressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Androstenedione, Testosterone, and Dihydrotestosterone in Pediatric Blood Samples: Age- and Sex-Specific Reference Data', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Endocrine Society, 95(5), pp. 2399–2409. doi: 10.1210/jc.2009-1670.

Lee, P. A. *et al.* (2006) 'Consensus statement on management of intersex disorders', in *Pediatrics*. American Academy of Pediatrics, pp. e488–e500. doi: 10.1542/peds.2006-0738.

Leshin, M., Griffin, J. E. and Wilson, J. D. (1978) 'Hereditary male pseudohermaphroditism

associated with an unstable form of 5α-reductase', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 62(3), pp. 685–691. doi: 10.1172/JCI109176.

Liu, Z., Chang, G.-Q. and Leibowitz, S. F. (2001) 'Apolipoprotein D interacts with the long form leptin receptor: a hypothalamic function in the control of energy homeostasis', *The FASEB Journal*. Wiley, 15(7), pp. 1329–1331. doi: 10.1096/fj.00-0530fje.

Lubahn, D. B. *et al.* (1988) 'The human androgen receptor: Complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate', *Molecular Endocrinology*. Mol Endocrinol, 2(12), pp. 1265–1275. doi: 10.1210/mend-2-12-1265.

Lubahn, D. B. *et al.* (1989) 'Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 86(23), pp. 9534–9538. doi: 10.1073/pnas.86.23.9534.

Mangelsdorf, D. J. *et al.* (1995) 'The nuclear receptor superfamily: The second decade', *Cell*. Cell, 83(6), pp. 835–839. doi: 10.1016/0092-8674(95)90199-X.

Marzuki, N. S. *et al.* (2010) 'Two novel mutations of SRD5A2 gene in indonesian siblings with clinical 5-alpha-reductase deficiency', *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 23(12), pp. 1329–1333. doi: 10.1515/jpem.2010.207.

Miller, W. L. and Auchus, R. J. (2019) 'The "backdoor pathway" of androgen synthesis in human male sexual development', *PLoS Biology*. Public Library of Science, 17(4). doi: 10.1371/journal.pbio.3000198.

Muffat, J. and Walker, D. W. (2010) 'Apolipoprotein D: An overview of its role in aging and age-related diseases', *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc., pp. 269–273. doi: 10.4161/cc.9.2.10433.

Nordenskjöld, A. and Ivarsson, S.-A. (1998) ' Molecular Characterization of 5α-Reductase Type 2 Deficiency and Fertility in a Swedish Family 1 ', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. The Endocrine Society, 83(9), pp. 3236–3238. doi: 10.1210/jcem.83.9.5125.

O'Shaughnessy, P. J. *et al.* (2019) 'Alternative (backdoor) androgen production and masculinization in the human fetus', *PLOS Biology*. Edited by E. Rawlins. Public Library of Science, 17(2), p. e3000002. doi: 10.1371/journal.pbio.3000002.

Ohnesorg, T., Vilain, E. and Sinclair, A. H. (2014) 'The Genetics of Disorders of Sex Development in Humans', *Sexual Development*, 8(5), pp. 262–272. doi: 10.1159/000357956.

Ono, M. and Harley, V. R. (2013) 'Disorders of sex development: new genes, new concepts', *Nature Reviews Endocrinology*, 9(2), pp. 79–91. doi: 10.1038/nrendo.2012.235.

Paris, F. *et al.* (2012) 'Disorders of Sex Development: Neonatal Diagnosis and Management', in *Endocrine development*. Karger Publishers, pp. 56–71. doi: 10.1159/000326631.

Rassart, E. *et al.* (2000) 'Apolipoprotein D', *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. Biochim Biophys Acta, pp. 185–198. doi: 10.1016/S0167-4838(00)00162-X.

Rassart, E. *et al.* (2020) 'Apolipoprotein D', *Gene*. Elsevier B.V., p. 144874. doi: 10.1016/j.gene.2020.144874.

Sasaki, G. *et al.* (2003) 'Micropenis and the 5α-Reductase-2 (SRD5A2) Gene: Mutation and V89L Polymorphism Analysis in 81 Japanese Patients', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford Academic, 88(7), pp. 3431–3436. doi: 10.1210/jc.2002-021415.

Schünke, M. (2012) *Prometheus Innere Organe*. Thieme.

Schweikert, H. U., Schluter, M. and Romalo, G. (1989) 'Intracellular and nuclear binding of [3H]dihydrotestosterone in cultured genital skin fibroblasts of patients with severe hypospadias', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 83(2), pp. 662–668. doi:

10.1172/JCI113930.

Siiteri, P. K. and Wilson, J. D. (1974) 'Testosterone Formation and Metabolism During Male Sexual Differentiation in the Human Embryo', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Narnia, 38(1), pp. 113–125. doi: 10.1210/jcem-38-1-113.

Simard, J. *et al.* (1990) 'Regulation of progesterone-binding breast cyst protein gcdfp-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: A new marker of steroid action in breast cancer', *Endocrinology*. Endocrinology, 126(6), pp. 3223–3231. doi: 10.1210/endo-126-6-3223.

Simard, J. *et al.* (1991) 'Stimulation of Apolipoprotein D Secretion by Steroids Coincides with Inhibition of Cell Proliferation in Human LNCaP Prostate Cancer Cells', *Cancer Research*, 51(16).

Simard, J. *et al.* (1992) 'Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein-D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells.', *Endocrinology*. Oxford Academic, 130(3), pp. 1115–1121. doi: 10.1210/endo.130.3.1537279.

Sinclair, A. H. *et al.* (1990) 'A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif', *Nature*. Nature Publishing Group, 346(6281), pp. 240–244. doi: 10.1038/346240a0.

Sinnecker, Gernot H G *et al.* (1996) *Phenotypic Classification of Male Pseudohermaphroditism Due to Steroid 5cx-Reductase 2 Deficiency*, *American Journal of Medical Genetics*.

Sinnecker, Gernot H. G. *et al.* (1996) 'Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5α-reductase 2 deficiency', *American Journal of Medical Genetics*. John Wiley & Sons, Ltd, 63(1), pp. 223–230. doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19960503)63:1<223::AID-AJMG39>3.0.CO;2-O.

Sinnecker, G. H. G. *et al.* (1997) 'Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene', *European Journal of Pediatrics*. Eur J Pediatr, 156(1), pp. 7–14. doi: 10.1007/s004310050542.

Tan, M. E. *et al.* (2015) 'Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery', *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group, pp. 3–23. doi: 10.1038/aps.2014.18.

Thigpen, A. E. *et al.* (1992) 'Molecular genetics of steroid 5α-reductase 2 deficiency', *Journal of Clinical Investigation*, 90(3), pp. 799–809. doi: 10.1172/JCI115954.

Thigpen, A. E. *et al.* (1993) 'Tissue distribution and ontogeny of steroid 5α-reductase isozyme expression', *Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation, 92(2), pp. 903–910. doi: 10.1172/JCI116665.

Thomas, L. N. *et al.* (2009) 'Overexpression of 5α-reductase type 1 increases sensitivity of prostate cancer cells to low concentrations of testosterone', *Prostate*. John Wiley & Sons, Ltd, 69(6), pp. 595–602. doi: 10.1002/pros.20911.

Truss, M. and Beato, M. (1993) 'Steroid hormone receptors: Interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors', *Endocrine Reviews*, 14(4). doi: 10.1210/edrv-14-4-459.

Watson, P. A., Arora, V. K. and Sawyers, C. L. (2015) 'Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 701–711. doi: 10.1038/nrc4016.

Wigley, W. C. *et al.* (1994) 'Natural Mutagenesis Study of the Human Steroid 5α-Reductase 2 Isozyme', *Biochemistry*, 33(5), pp. 1265–1270. doi: 10.1021/bi00171a029.

Wilson, J. D., Griffin, J. E. and Russell, D. W. (1993) 'Steroid 5α-reductase 2 deficiency', *Endocrine Reviews*. Endocr Rev, 14(5), pp. 577–593. doi: 10.1210/edrv-14-5-577.

Zeng, C. *et al.* (1996) 'A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D', *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America. National Academy of Sciences, 93(13), pp. 6626–6630. doi: 10.1073/pnas.93.13.6626.

9 Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus danken, der mir diese Arbeit ermöglicht und mit seiner Betreuung maßgeblich zum Gelingen beigetragen hat. Ein großer Dank gilt zudem Frau PD Nadine Hornig, PhD, sowie Frau Dr. Alexandra Kulle für die intensive Betreuung und geduldige Einarbeitung im Labor, sowie für zahlreiche Erklärungen und Diskussionen. Ebenfalls danke ich allen Mitarbeitern des kinderendokrinologischen Labors, insbesondere Tanja Stampe für ihre generelle Unterstützung im Labor und für die Durchführung der Massenspektrometrie aus meinen Proben sowie Brigitte Karwelies, die mich bei Fragen im Labor immer unterstützt hat. Vielen Dank auch an Dr. rer. nat. Ralf Werner aus Lübeck für zusätzliche Ideen und Hinweise.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mit ihrer unermüdlichen Unterstützung das Medizinstudium überhaupt erst ermöglicht haben und dafür selbst häufig kürzer getreten sind.