

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Untersuchungen zum Einfluss von Alter und Geschlecht auf die  
Konversion von DHEA in humanen peripheren mononukleären Blutzellen**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Daniel Georg Drescher**

**aus Würzburg**

**Würzburg, Dezember 2008**

**Referentin: Prof. Dr. med. W. Arlt**

**Koreferent: Prof. Dr. med. B. Allolio**

**Dekan: Prof. Dr. M. Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.09**

**Der Promovend ist Arzt**

## **Danksagung**

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinen Mentoren Prof. Dr. med. Wiebke Art, Prof. Dr. med. Bruno Allolio und Dr. med. Fabian Hammer, die mich in meiner wissenschaftlichen und klinischen Ausbildung kontinuierlich gefördert haben. Besonders zu Dank verpflichtet bin ich hierbei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Wiebke Art, die mir während meiner Promotion wertvolle Ratschläge gab und mich dauerhaft unterstützt hat.

Ausdrücklich danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Endokrinologischen Labors unter der Leitung von Prof. Dr. med. Bruno Allolio, die mich bei der Durchführung des Forschungsprojekts unterstützt haben.

Der liebevollen Unterstützung meiner Eltern bin ich besonders dankbar, herzlichen Dank hierfür.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1.	Studiendesign und Probandenauswahl	10
2.1.1.	Junge männliche Probanden	10
2.1.2.	Ältere männliche Probanden	10
2.1.3.	Junge weibliche Probandinnen	10
2.2.	Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen	11
2.3.	Enzymfunktionsassay	12
2.4.	RNA-Extraktion	15
2.5.	RT-PCR	16
2.5.1.	Qualitative RT-PCR	16
2.5.2.	Semiquantitative RT-PCR	19
2.6.	Realtime RT-PCR	21
2.7.	Methoden der Datenanalyse/Statistik	23
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1.	Steroidbiosynthese-Enzymexpression in peripheren humanen mononukleären Blutzellen	24
3.1.1.	Qualitative Enzymexpression	24
3.1.2.	Semiquantitative Enzymexpression	29
3.1.3.	Quantitative Enzymexpression	32
3.2.	Enzymatische Funktionsassays zur Bestimmung des Androgenmetabolismus in humanen peripheren mononukleären Blutzellen	33
3.2.1.	Alterseffekte: Ergebnisse im Vergleich junger und älterer männlicher Probanden	35

3.2.2.	Geschlechtseinfluss: Ergebnisse im Vergleich junger männlicher Probanden zu jungen weiblichen Probandinnen	37
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>53</b>

## 1. Einleitung

Dehydroepiandrosteron (DHEA), erstmals 1934 von A. Butenandt beschrieben, ist das quantitativ bedeutendste C-19-Steroid, das neben seinem Sulfat-Ester (DHEAS) und Androstendion das Hauptprodukt der Steroidbiosynthese in der zona reticularis der menschlichen Nebennierenrinde darstellt. DHEA wirkt hauptsächlich indirekt über nachfolgende Umwandlung in Androgene und Östrogene sowie deren Zwischenprodukte in den peripheren Zielzellen (siehe Abbildung: 1.1).

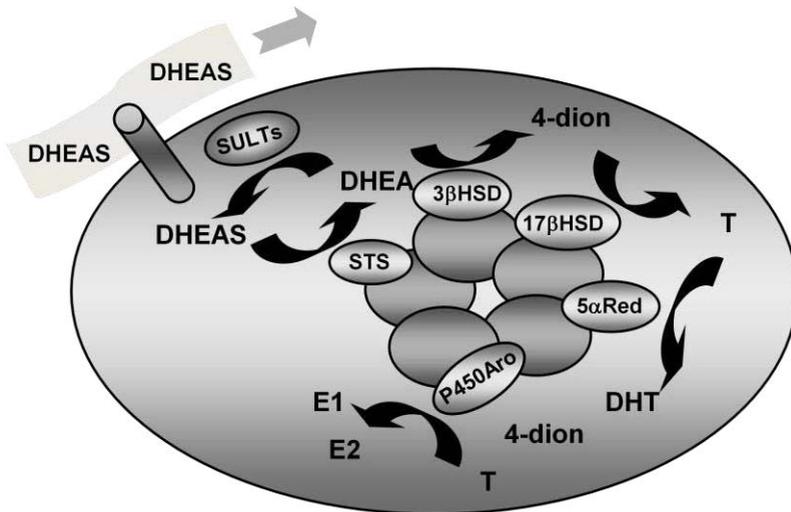


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Steroidmetabolismus in der peripheren Zielzelle. DHEAS tritt über einen aktiven Influx-Transporter in die Zelle ein, während DHEA aufgrund seiner Lipophilie unabhängig in die Zelle diffundiert. DHEAS kann durch die Steroid Sulfatase im Cytosol in DHEA umgewandelt werden, das entweder zurück zu DHEAS sulfoniert wird, via DHEA Sulfotransferase, oder durch mikrosomale Steroidbiosynthese-Enzyme

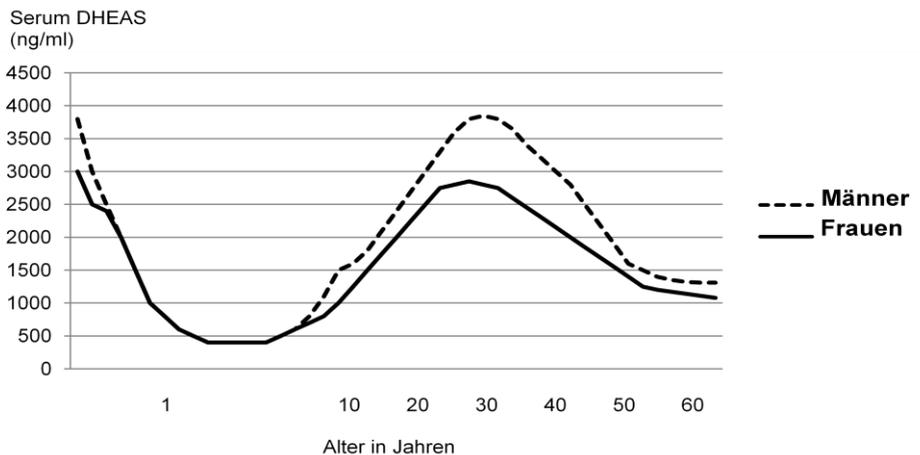
*weiter zu Sexualsteroiden konvertiert wird. DHEA, DHEAS, Androstendion ( $\Delta 4$ dion), Testosteron (T), Dihydrotestosteron (DHT), Östron (E1), Östradiol (E2), Sulfotransferasen (SULTs), Sulfatase (STS), 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ -Reduktase (5 $\alpha$ -Red), Aromatase (P450Aro).*

Zusätzlich hat DHEA im Sinne eines Neurosteroids direkten Effekt auf Neurotransmitterrezeptoren des Gehirns und wirkt nachweislich fördernd auf die Stimmung, Libido und das Wohlbefinden bei Patienten mit Nebenniereninsuffizienz (1). Studien über die Pharmakokinetik und Biokonversion von DHEA zeigten bei Probanden mit niedrigen DHEAS-Serumspiegel nach DHEA-Gabe ein geschlechtsspezifisches Konversionsmuster: signifikanter Anstieg von Androgenen bei Frauen und Östrogenen bei Männern (1). Ebenso kommt es bei Männern zu einem Anstieg von Androstanediol-Glucuronid (ADG), ein Metabolit, der durch Reduktion und anschließende Glucuronidierung von Testosteron und Dihydrotestosteron entsteht (2). Ein Anstieg von ADG reflektiert die vermehrte intrazelluläre Konversion von DHEA zu aktiven Androgenen und potentielle androgene Wirkung von DHEA in der peripheren Zielzelle.

Geschlechtsspezifische Unterschiede bei kardiovaskulären Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen (Adipositas, Diabetes mellitus) oder Autoimmunerkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematodes) werden eng mit dem unterschiedlichen, geschlechtsabhängigen Konversionsmuster aktiver Geschlechtshormone in Verbindung gebracht (3) (4) (5) (6).

Die DHEA-Sekretion unterliegt einem charakteristischen und altersspezifischen Muster (siehe Abbildung 1.2). Unmittelbar nach der Geburt ist das zirkulierende DHEAS aufgrund der Bildung durch die fetale Nebenniere hoch und fällt rasch wieder ab, bis es zu einem Anstieg zwischen dem sechsten und zehnten Lebensjahr kommt („Adrenarche“). Nach dem Erreichen

eines individuellen Maximum während des dritten Lebensjahrzehntes, kommt es physiologischerweise zu einem stetigen Abfall der Sekretion von DHEA und verminderten Bildung aktiver Geschlechtshormone (7) (8) im Laufe des Alterungsprozesses, was zum Teil spekulativ in Zusammenhang mit altersassoziierten Erkrankungen wie z.B. Insulinresistenz, Osteoporose, kardiovaskuläre Erkrankungen und Muskelabbau gebracht wird (9). Das altersassoziierte schrittweise Abfallen des DHEAS-Spiegels ist individuell sehr unterschiedlich und wird bei Frauen und Männern in ähnlicher Weise beobachtet (2).



*Abbildung 1.2: Schematische graphische Darstellung des Dehydroepiandrosteron-Sulfat-Spiegels (DHEAS) im Serum während des menschlichen Lebens (2).*

Ebenso wird mit zunehmenden Alter eine verminderte Interleukin-2-(IL-2) Immunantwort nach Antigenpräsentation bei Lymphozyten beobachtet (10), wohingegen erhöhte Serumspiegel des proinflammatorisch wirkenden Zytokins Interleukin 6 (IL-6) mehrfach beschrieben wurden (11) (12). In diesem Zusammenhang konnte eine negative Korrelation zwischen Serumspiegel von

DHEA/DHEAS und Il-6 in einer weiteren Studie bei mononukleären Blutzellen nachgewiesen werden (13). Alters- und geschlechtsassoziierte Unterschiede im Sekretionsmuster von Zytokinen werden mit Erkrankungen wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis, Osteoporose, Atherosklerose und M. Alzheimer in Verbindung gebracht (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22). In Tierexperimenten kam es nach Verabreichung von DHEA an Nager zum Anstieg der Il-2 Sekretion (23) und gesteigerter Zelltoxizität durch Makrophagen (24; 25) sowie zum Abfall der Il-6-Serumspiegel (26). In vitro Versuche an humanen Knochenmarkszellen zeigten eine Suppression von Il-6 durch DHEA (27). Über ähnliche Ergebnisse wurde in in vitro Studien, die mit T-Lymphozyten durchgeführt wurden, berichtet. Mit DHEA vorbehandelte T-Lymphozyten produzierten signifikant mehr Il-2 (28) und vermittelten eine höhere Zelltoxizität als in der Vergleichsgruppe (29).

Da die meisten peripheren Gewebe über eine Vielzahl von Steroidenzymen verfügen ist es unklar, zu welchem Ausmaß diese Effekte auf das Immunsystem DHEA bzw. DHEA-Downstream-Metaboliten wie z.B. Androstenediol und Androstenetriol, von denen eine immunmodulatorische Wirkung bereits bekannt ist (30) (31) (32) zuzuschreiben sind. Dies würde bedeuten, dass Downstream-Konversion von DHEA in der Immunzelle selbst die immunmodulatorischen Eigenschaften von DHEA vermitteln könnte. Für einen solchen Downstream-Metabolismus ausgehend von DHEA sind eine Reihe wichtiger Steroidenzyme notwendig, die im Folgenden beschrieben werden und repräsentativ für das spezifische Expressionsmuster in der entsprechenden peripheren Zielzelle sind.

## Steroidenzyme im DHEA-Downstream-Metabolismus

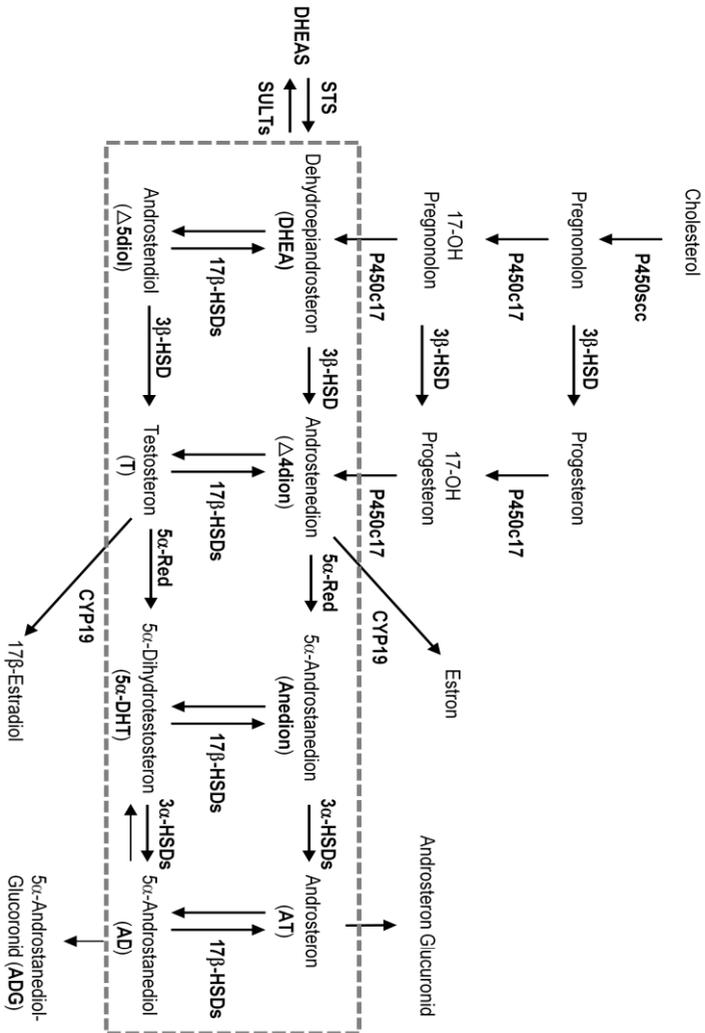


Abbildung: 1.3: Schematische Darstellung der Steroidbiosynthese und des von DHEA ausgehenden Downstreammetabolismus einschließlich der

*entstehenden Metabolite und der beteiligten Steroidenzyme (als Box hervorgehoben).*

### *3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen*

DHEA wird durch zwei Isoenzyme, die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1 und 2 (3 $\beta$ -HSD1 und 2) in Androstendion umgewandelt. Beim klassischen 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4-Isomerase-Mangel, einer autosomal rezessiv vererbten Erkrankung, verursacht durch Mutationen im *HSD3B2*-Gen (Chromosom 1), wird die Steroidsynthese in Nebennieren und Gonaden verhindert und führt zu Salzverlusten bei beiden Geschlechtern und zur unvollständigen Maskulinisierung der äußeren Genitalen bei Männern (33). Bislang sind für das Isoenzym 1, das hauptsächlich in Plazenta und peripheren Geweben exprimiert wird, keine Mutationen bekannt (34).

Ebenso wird durch 3 $\beta$ -HSD-Aktivität Androstenediol durch Ersatz einer Hydroxygruppe an Position 3 durch eine Ketogruppe in Testosteron umgewandelt, sowie Pregnenolon zu Progesteron und 17-OH-Pregnenolon zu 17-OH-Progesteron (siehe Abbildung 1.3).

### *5 $\alpha$ -Reduktasen*

5 $\alpha$ -Reduktasen katalysieren die Umwandlung von Testosteron in das potentere Androgen 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron, das durch Hydroxylierung an Position 5 eine höhere Affinität zum Androgenrezeptor aufweist (35) (36). Somit üben sie durch Beeinflussung der aktiven Steroidkonzentration in Geweben Einfluss auf Zellregulation und –wachstum aus. Beim Menschen existieren zwei Isoformen der 5 $\alpha$ -Reduktase. 5 $\alpha$ -Reduktase 1 wird in zahlreichen Geweben wie Haut, Leber und Gehirn exprimiert (37) (36), 5 $\alpha$ -Reduktase 2 dagegen hauptsächlich in Prostata, Haut, Nebenhoden und Leber (35) (36). 5 $\alpha$ -Reduktase-Typ 2 Mangel, durch Mutationen im

kodierenden Gen bedingt, äußert sich im männlichen Pseudohermaphroditismus bzw. 46, XY disordered sexual differentiation. Betroffene Individuen mit 46, XY Karyotyp haben normale innere männliche Genitalorgane, sehen äußerlich aber weiblich aus (38).

Desweiteren wird Androstendion durch  $5\alpha$ -Reduktase-Aktivität in Androstanedion umgewandelt, ein Schritt in der Androgenmetabolismkaskade (s. Abb. 1.3).

### *17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenasen*

17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenasen (17 $\beta$ -HSDs) haben eine zentrale Schlüsselposition in der Kontrolle der biologischen Aktivität von Steroidhormonen durch ihre Eigenschaft der 17 $\beta$ -Oxidation/Reduktion (39), die sie in unterschiedlicher Ausprägung besitzen. Dadurch werden inaktive 17-Keto-Steroide in ihre aktive 17 $\beta$ -Hydroxy-Form konvertiert und umgekehrt. Sie unterscheiden sich weiter in Gewebeverteilung, Substratspezifität, Zelllokalisierung und Regulationsmechanismen. Aktuell sind neun Typen der humanen 17 $\beta$ -HSD, chronologisch nummeriert als 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10 und 12 identifiziert und ihre Primärstruktur analysiert bei insgesamt 14 identifizierten 17 $\beta$ -HSDs (40) (41) (42) (43). Typ 6 und 11 wurden bislang nur in Ratte bzw. Maus charakterisiert, wobei ein orthologer Typ 6 für den Menschen noch nicht beschrieben ist (43). 17 $\beta$ -HSDs sind an der Pathogenese verschiedener Krankheiten beteiligt wie z.B. dem Pseudohermaphroditismus (17 $\beta$ -HSD 3), dem Zellweger Syndrom (17 $\beta$ -HSD-4) oder der Polyzystischen Nierenerkrankung (17 $\beta$ -HSD-8) (39) (44) (45).

### *Aldo-Keto-Reduktasen*

Aldo-Keto-Reduktasen (AKRs) sind Oxidoreduktasen, die Aldehyde und Ketone in primäre und sekundäre Alkohole umwandeln (46). Die zurzeit zehn

bekannten humanen AKRs können ein breites Spektrum an Substraten, inklusive Medikamente, Karzinogene und reaktive Aldehyde metabolisieren (47). Neben ihrer  $3\alpha$ -Hydroxysteroid-Aktivität besitzen manche AKRs zusätzlich  $20\alpha$ -Hydroxysteroid-Aktivität (AKR1C1, auch  $20\alpha$ -HSD) und  $17\beta$ -Aktivität (AKR1C3, auch  $17\beta$ -HSD Typ 5) (48) (49). Insbesondere die Aldo-Keto-Reduktasen Typ 1 und 7 werden mit der Entstehung von Tumoren, wie z.B. Prostata- oder Mammakarzinomen in Verbindung gebracht (47).

### ***Fragestellung***

In früheren Studien wurde schon mehrfach über die Expression und Aktivität von Steroidenzymen in humanen Lymphoblasten, Lymphozyten und Makrophagen berichtet (50) (51) (52).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, in wieweit humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) über Expression und funktionale Aktivität der im DHEA-Downstream-Metabolismus essentiellen Enzyme verfügen und ob es alters- bzw. geschlechtsspezifische Unterschiede gibt.

## **2. Material und Methoden**

### *2.1. Studiendesign und Probandenauswahl*

Die Studie wurde an 8 gesunden jüngeren Frauen sowie 8 gesunden jüngeren und 8 gesunden älteren Männern durchgeführt, die durch lokalen Aushang rekrutiert wurden. Die Studienteilnahme erfolgte freiwillig. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt und die ProbandInnen wurden nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung über die Studie, Abgabe einer schriftlichen Einverständniserklärung und nach Untersuchung von Ein- und Ausschlusskriterien im Rahmen der Screeningvisite, in die Studie eingeschlossen.

Am Studientag, bei den Probandinnen in der frühen Follikelphase, wurde eine einmalige Blutabnahme (54 ml) zur Gewinnung der peripheren mononukleären Blutzellen durchgeführt. Die Einschlusskriterien für Probandinnen waren weibliches Geschlecht, Alter zwischen 18 und 30 Jahren, normale Serumspiegel für DHEAS, Androstendion und freies Testosteron und Unterzeichnung der Probanden- und Einverständniserklärung. Die Einschlusskriterien für Probanden waren männliches Geschlecht, Alter zwischen 18 und 30 Jahren für die jüngeren Männer und ein Alter zwischen 50 und 70 Jahren für die älteren Männer sowie die Unterzeichnung der Probanden- und Einverständniserklärung. Ausschlusskriterien für Probandinnen waren Schwangerschaft, Oligo- bzw. Amenorrhoe und die Einnahme von hormonellen Präparaten (einschließlich oraler Kontrazeptiva) innerhalb der letzten 6 Monate. Ausschlusskriterien für männliche Probanden waren Hypogonadismus und die Einnahme von hormonellen Präparaten innerhalb der letzten 6 Monate.

Ausschlusskriterien für Probandinnen und Probanden waren akute Erkrankungen jeglicher Art inkl. Infektionen des Respirationstraktes und des Gastrointestinaltraktes, Einnahme von Medikamenten, die zu einer Induktion der hepatischen P450-Enzyme führen, Glukokortikoidmedikation innerhalb der letzten drei Monate vor Einschluss in die Studie, Hypo- oder Hyperthyreose, chronische Erkrankungen, insbesondere Leberparenchymschaden (SGOT, SGPT u./o.  $\gamma$ GT > 2faches der oberen Normgrenze) oder Nierenerkrankungen (Kreatinin > 1.2 mg/dl) sowie die Magen-Darm-Passage beeinträchtigende Erkrankungen, Anämie (Hb < 11 g/dl), ProbandInnen mit arterieller Hypertonie, PatientInnen mit Diabetes mellitus, Teilnahme an einer klinischen Studie innerhalb der letzten 3 Monate oder parallel zur Studie.

#### *2.1.1. Junge männliche Probanden*

Die Altersspanne der acht gesunden jungen Männer betrug 23 bis 29 Jahre (mittleres Alter 25 Jahre) bei einem body mass index (BMI) von 21,6 -24,4 kg/m<sup>2</sup> (mittlerer BMI 22,72 kg/m<sup>2</sup>).

#### *2.1.2. Ältere männliche Probanden*

Die Altersspanne der acht gesunden älteren Männer betrug 52 bis 66 Jahre (mittleres Alter 59 Jahre) bei einem body mass index (BMI) von 21,9 -27,1 kg/m<sup>2</sup> (mittlerer BMI 25,1 kg/m<sup>2</sup>).

#### *2.1.3. Junge weibliche Probandinnen*

Die Altersspanne der acht gesunden jungen Frauen betrug 22 bis 25 Jahre (mittleres Alter 24 Jahre) bei einem body mass index (BMI) von 20 -25,2 kg/m<sup>2</sup> (mittlerer BMI 22,94 kg/m<sup>2</sup>).

## 2.2. Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs)

Die Blutentnahme erfolgte morgens zwischen 8.00 und 9.00 Uhr mittels Venenpunktion einer Kubital- oder Unterarmvene. Bei den weiblichen Probandinnen wurde die Blutentnahme während der frühen Follikelphase durchgeführt. Insgesamt wurden 54 ml Vollbut in 7,5 ml EDTA-Röhrchen entnommen.

Die PBMC-Isolation wurde durch Separation nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation (siehe Abbildung 2.1) durchgeführt. Dazu wurden jeweils 5 ml Blut vorsichtig auf 5 ml Lymphoprep® (Axis-Shield, Oslo, Norwegen) in 10 14 ml Falcon-Röhrchen geschichtet und mit 800g bei 21°C über 30 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die PBMC-reiche Plasmaschicht (ca. 500 µl) mittels Pasteurpipette entfernt und jeweils in ein neues Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS-Puffer auf 5 ml aufgefüllt und durch vorsichtiges Wenden der Röhrchen vermischt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen mit 250g bei 21°C über 10 Minuten gewaschen. Nach Entfernen des Überstandes durch Absaugen wurde das Zellsediment in 500 µl Ham's F 10 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) resuspendiert und in einem 14 ml Falcon-Röhrchen gesammelt.

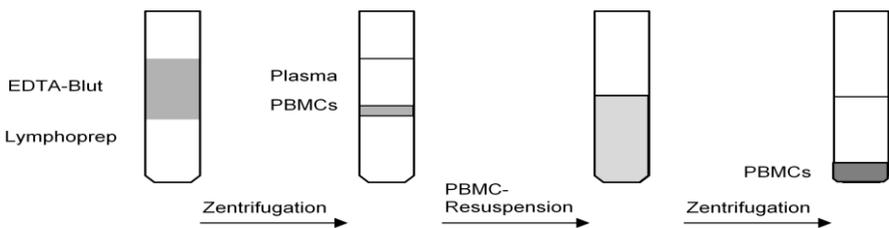


Abbildung 2.1: Schematisierte Darstellung der PBMC-Isolation und Präparation.

Von dieser PBMC-Suspension wurden 10 µl mit 10 µl Trypanblau (Trypan blue solution: 0,4%, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und 80 µl Ham's F 10 versetzt, sodass eine 1:9 Verdünnung entstand. Trypanblau ist ein stark negativ geladener, nichtmembrangängiger Proteinfarbstoff. Defekte Zellen weisen eine verminderte Membranintegrität auf und erscheinen tiefblau gefärbt und vergrößert, bzw. deformiert. Für den Zählvorgang wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet und die vitalen peripheren mononukleären Blutzellen der Verdünnung gezählt, indem 4 Zählkammern ausgezählt wurden und der Mittelwert berechnet wurde. Dieser Wert wurde mit  $10^5$  (Kammerfaktor) multipliziert und ergab die Zellanzahl pro ml Suspension. Die Anzahl der isolierten PBMC der einzelnen ProbandInnen variierte zwischen  $6,5 \times 10^6$  und  $12 \times 10^6$  pro ml Suspension, sodass bei einem Suspensionsgesamtvolumen von 5 ml eine Zellanzahl zwischen  $32,5 \times 10^6$  und  $60 \times 10^6$  resultierte. Für das folgende Enzymfunktionsassay wurden insgesamt  $18 \times 10^6$  Zellen benötigt, mit den restlichen Zellen wurde eine RNA-Isolation durchgeführt.

### *2.3. Enzymfunktionsassay*

Für die Inkubation mit den radioaktiv markierten Steroiden wurde das PBMC-Suspensions-Volumen für  $3 \times 10^6$  Zellen bestimmt, das entsprechende Volumen jeweils in 6 Eppendorf-Röhrchen überführt und auf 500 µl mit Ham's F 10 aufgefüllt. Zu jeder, im doppelten Ansatz durchgeführten Inkubation, wurden 4 µl Dilution (entspricht 20 000 cpm)  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Testosteron (spezifische Aktivität 53,6 mCi/mmol),  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Androstendion (53,6 mCi/mmol) bzw.  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -DHEA (47,8 mCi/mmol) pipettiert. Alle radioaktiv markierten Steroide wurden von NEN Life Science Products (Köln, Deutschland) bezogen. Als Negativkontrollen dienten zellfreie Inkubationen.

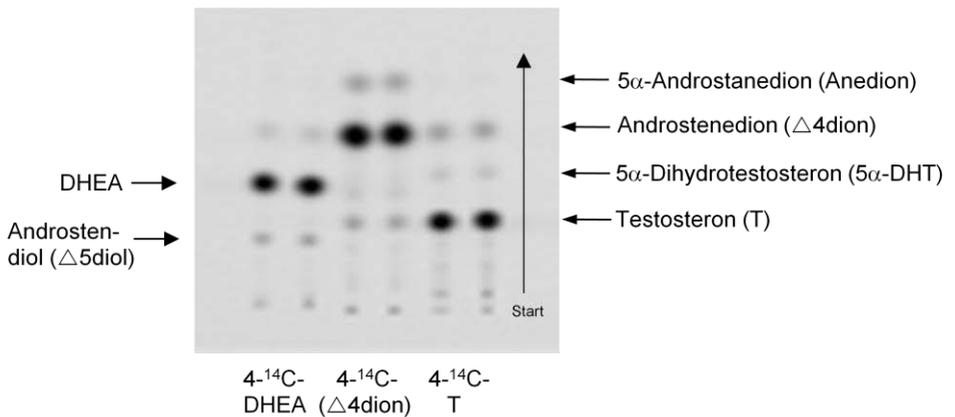
Die Eppendorf-Röhrchen mit den Versuchsansätzen wurden auf einer sich langsam drehenden Halterung, um eine Zelldissoziation zu gewährleisten, in

einem Hybridisierungssofen (Micro Autoblots® Hybridization oven, Bellco Glass Inc., Vineland, USA) bei 37° C über 6 Stunden inkubiert. Dies lag im linearen Bereich des c, was in vorausgegangenen Pilot-Experimenten bestimmt worden war. Die Inkubation wurde durch Zufügen von 1,25 ml eines Azetat/Isooctan-Gemisches (1:1) und anschließendem einminütigen Vortexen beendet. Dabei kam es zur Zerstörung der Zellen.

#### *Steroidextraktion, -separation und identifikation*

Nach Zentrifugation der Inkubationen bei 800g bei 21°C über 10 min bildeten sich zwei Phasen aus. Die untere, hydrophile Phase bestand aus Zelltrümmern und Inkubationsmedium, die obere, lipophile Phase (Volumen 1,25 ml) enthielt die gelösten Steroide. Hiervon wurde jeweils 1 ml abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und unter kontinuierlichem Stickstofffluss evaporiert.

Die evaporierten Steroide wurden nun in 10 µl Ethanol gelöst und mittels Mikropipette auf einer Dünnschichtchromatographieplatte (PE SIL G/UV silica gel plates; Whatman, Maidstone, GB) im Abstand von 1,5 cm aufgetragen. Als Laufmittel wurde ein Methylendichlorid/Aceton-Gemisch (92,5:7,5) verwendet, der Vorgang wurde nach 90 min durch Herausnahme der Dünnschichtchromatographieplatten (TLC-Platte) aus der Laufkammer beendet. Mit den getrockneten TLC-Platten wurde anschließend über 7 Tage eine Image-Platte exponiert, die sensitiv für <sup>14</sup>C-Radioaktivität war. Die Auswertung der Signale erfolgte mittels Phosphorimager (Fuji Film FLA 3000 phosphor imager, Fuji Photo Europe, Düsseldorf, Germany) (siehe Abbildung 2.2).



*Abbildung 2.2: Visualisierung der Konversionsprodukte mittels Phosphorimager nach Inkubation von humanen PBMCs mit radioaktiv markiertem DHEA, Androstendion bzw. Testosteron und Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie.*

Die Substrate und Konversionsprodukte des Enzymfunktionsassays wurden durch Vergleich mit mitlaufenden Referenzsteroiden (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) identifiziert und durch Phosphorimager-Analyse quantifiziert. In Vorexperimenten wurden die Konversionsprodukte zusätzlich durch Vergleich mit mitlaufenden nicht radioaktiv markierten Referenzsteroiden in zweidimensionalen TLC-Läufen (Laufmittel 1: Methylazetat/Ethylendichlorid (35:65), Laufmittel 2: Hexanol/Hexan (25:75)) identifiziert. Hierzu wurden die nicht radioaktiv markierten Steroide nach Exposition der Dünnschichtchromatographieplatten mit Liebermann-Burchard-Reagens (Ethanol-Essigsäure-Anhydrid-Schwefelsäure) und anschließender Inkubation bei 115°C über 15 min visualisiert (53) (siehe Abbildung 2.3).

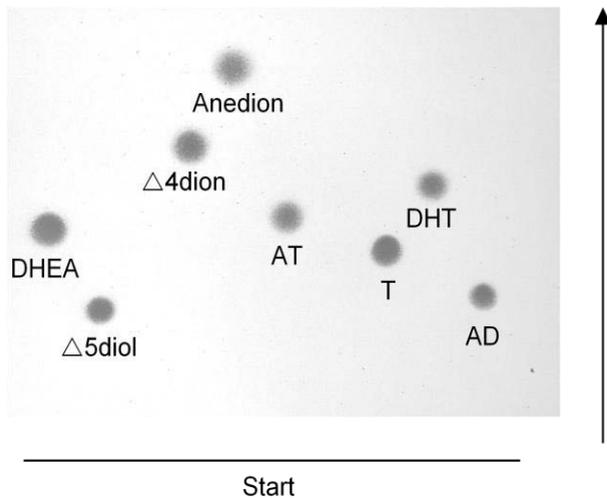


Abbildung 2.3: Auftrennung von nicht-radioaktiv markierten Steroiden in einem eindimensionalen Dünnschichtchromatographielauf (Laufmittel: Methylendichlorid/Aceton-Gemisch (92,5:7,5)) und Visualisierung mittels Liebermann-Burchard-Reagens. DHEA, Androstendion ( $\Delta 4$ dion), Testosteron (T), Androstenedion (Anedion), Dihydrotestosteron (DHT), Androsteron (AT), Androstenediol ( $\Delta 5$ diol),  $5\alpha$ -Androstenediol (AD)

#### 2.4. RNA-Extraktion

Die Isolation von Gesamt-RNA aus PBMC wurde mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Deutschland), einer Einschnitt-Extraktionsmethode entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierzu wurde PBMC-Suspension zu  $8 \times 10^6$  Zellen aliquotiert. Die RNA-Integrität wurde durch Elektrophorese auf 2%igem Agarosegel überprüft, indem eine Kontamination mit genomischer DNA durch optische Kontrolle, bei Ausbleiben von Banden mit höheren Basenpaarspektrum, ausgeschlossen werden konnte. Die RNA-Konzentration wurde durch Spektrophotometrie bestimmt und anschließend die RNA bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Quantität und Qualität der RNA-Proben wurden diese 1:50 mit aqua dest verdünnt und die Absorption bei 260 ( $E_{260} = 40,0 \mu\text{g/ml}$ ) und 280 nm spektrophotometrisch (BioPhotometer Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen. Der Reinheitskoeffizient errechnet sich aus dem Quotienten der Absorption ( $OD_{260} : OD_{280}$ ) und ist ein Indikator für eventuelle Verunreinigungen mit Proteinen, Salzen oder Phenol, die im Vergleich zu RNA (Absorption bei 260 nm) ein Absorptionsspektrum von 230 – 280 nm aufweisen. Er lag bei den gemessenen Proben zwischen 1,7 und 2,1 in einem guten qualitativen Bereich.

## 2.5. RT-PCR

### 2.5.1. Qualitative RT-PCR

Zur Analyse der Expression von Steroidbiosynthese-Enzymen in humanen PBMC wurde das OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, das die reverse Transkription von RNA zu cDNA und die Amplifikation von cDNA mit enzymespezifischen Primern kombiniert. Dabei wird in vitro RNA in cDNA umgeschrieben, indem eine RNA abhängige DNA-Polymerase sowohl RNA- als auch DNA-Sequenzen als Matrix verwenden kann. In einem ersten Schritt heftet sich an einen RNA-Einzelstrang ein komplementärer DNA-Strang und wird in einem zweiten Schritt durch die Exoribonukleaseaktivität der Reversen Transcriptase hydrolysiert, wobei wieder ein erneuter komplementärer DNA-Strang synthetisiert werden kann.

Jede Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  enthielt 5  $\mu\text{l}$  (5x) buffer, 5  $\mu\text{l}$  Q-Solution, 1  $\mu\text{l}$  (10mM) dNTP-mix, 1  $\mu\text{l}$  enzyme-mix (Omniscript/Sensiscript Reverse Transscriptase, HotStarTaq DNA Polymerase) 1,5  $\mu\text{l}$  (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) Forward- und Reverse-Primer und 200 ng Total RNA. Nach einer initialen reversen Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) durch die Omniscript/Sensiscript Reverse Transscriptase bei 50°C über 30 min, folgte der Aktivierungsschritt der HotStarTaq DNA Polymerase bei 94°C über 15

min. Die PCR-Bedingungen über 30 bis 40 Zyklen waren wie folgt: Denaturierung bei 94°C über 30 Sekunden, gefolgt von Annealing bei den entsprechenden Annealing-Temperaturen über 40 Sekunden, Extension bei 74°C über 60 Sekunden und einem finalen Extensionsschritt bei 74°C über 4 min. Für alle PCRs wurden die Geräte Mastercycler Gradient bzw. Personal (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Die verwendeten Primer, synthetisiert von Thermo Hyaid (Thermo BioSciences GmbH Ulm, Deutschland), sind in Tabelle 1 aufgeführt.

*Tabelle 1 mit Übersicht über die verwendeten Primer: S (sense), AS (antisense), bp (base pair), Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T).*

Enzym Produkt (Gen)	Primersequenz (5' nach 3')	(bp)
3 $\beta$ -HSD 1 (HSD3B1)	S GGAATCTGAAAAACGGCGGC AS CTGAGATAAGTAGAACTGCCTCGGATG	257
3 $\beta$ -HSD 2 (HSD3B2)	S GGGTGAATCTAAAAATGGTGAT AS AGATGTAATAGAATTGACCTCGGACA	258
17 $\beta$ -HSD 1 (HSD17B1)	S TTTCAATGACGTTTATTGCGCCAGCA AS TTGCTGTGGCGGAGGTATTGGTAGAA	219
17 $\beta$ -HSD 2 (HSD17B2)	S GTGCTCCAAATGGACATCACGAAG AS ATTGCCTAGGTGGCCTTTTTCTTGTA	771
17 $\beta$ -HSD 3 (HSD17B3)	S TCCTGAACGCACCGGATGAAAT AS TACCTGACCTTGGTGTGAGCTTCAG	505
17 $\beta$ -HSD 4 (HSD17B4)	S AGTTCTCTCTTTTCTTGTTGGCTCTGGA AS GCGTCCTATTTCTCAAATACAAAGGTACTCT	527
17 $\beta$ -HSD 5 (HSD17B5 = AKR1C3)	S GTAAAGCTTTGGAGGTCACAAAATTAGCAAT AS TTTGTCTCGTTGAGATCCCAGAGCACTATA	581
5 $\alpha$ -reductase 1 (SRD5A1)	S GGCTTGTGGTTAACAGGCAT AS CAAATTTCCGGAGGTACCAC	265
5 $\alpha$ -reductase 2	S CTGGAGAAATCAGCTACAGG	226

(SRD5A2)	AS GCTTTCCGAGATTTGGGGTA	
5 $\beta$ -reductase (AKR1D1)	S GTTCTCCACAATGGATCTCAGTGTG AS CTTTTCCCAATGAGTTTAGAAGTGCAT	758
3 $\alpha$ -HSD 1 (AKR1C1)	S GTAAAGCTTTAGAGGCCAC AS GGTTGAAGTAAGGATGACA	501
3 $\alpha$ -HSD 2 (AKR1C2)	S GTAAAGCTCTAGAGGCCGT AS CACCCATGGTTCTTCTCGA	590
3 $\alpha$ -HSD 3 (AKR1C3 =HSD17B5)	S GTAAAGCTTTGGAGGTCACAAAATTAGCAAT AS TTTGTCTCGTTGAGATCCCAGAGCACTATA	581
Steroidsulfatase (STS)	S AGGACTTCCCACCGATGAGATTACCTTTG AS AAAAGGGTCAGGATTAGGGCTGCTAGGAA	363
Sulfotransferase 2A (SULT2A)	S TGAAGTTTATTAAGAAACCAAAGTCATGGGAAGAAT AS TGCTTTGTCCACTACATAATCAACACTCAGGA	320
Sulfotransferase 2B1a (SULT2B1a)	S GACTGAGGCTCTGAGGAGGA AS ATCTCGATCATCCAGGTCGT	278
Sulfotransferase 2B1b (SULT2B1b)	S GGCTTGTGGGACACCTATGA AS ATCTCGATCATCCAGGTCGT	206
Aromatase (CYP19)	S TGCTCCTCACTGGCCTTTTTCTCTT AS GCCGAATCGAGAGCTGTAATGATTGT	266

### *Reverse Transskription*

Bei der Reversen Transskription wurde mittels Reverser Transscriptase RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, verwendet wurde das RETROscript kit (Ambion®, Texas, USA). Hierzu wurden in jeder Reaktion mit einem Volumen von 12  $\mu$ l 1,5  $\mu$ g Total RNA mit 2  $\mu$ l Random Decamer Primer bei 80°C über 3 min zum Auflösen von Sekundärstrukturen der RNA inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Folgender Mix aus 2  $\mu$ l (10x) RT-Buffer, 4  $\mu$ l dNTP-mix, 1  $\mu$ l RNase Inhibitor, 1  $\mu$ l Reverse Transcriptase wurde zugegeben und die Reaktion (Gesamtvolumen: 20  $\mu$ l) für 60 min bei 44°C inkubiert. Anschließend folgte ein Inaktivierungsschritt der Reversen Transcriptase bei 92°C über 10 min. Die Proben mit cDNA wurden bei -20°C gelagert.

### 2.5.2. *Semiquantitative RT-PCR*

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können geringe Mengen an DNA amplifiziert und die mRNA, selbst gering exponierter Gene quantifiziert werden. Bei der semiquantitativen PCR werden zur Quantifizierung der mRNA bestimmter Zielgene interne Standards herangezogen. Hierfür wurden 18s Primer zum Nachweis ribosomaler RNA (housekeeping gene) verwendet. Gute interne Standards zeichnen sich durch einen konstanten Expressionsgrad in den unterschiedlichen verwendeten Proben aus. Dies ist bei Verwendung ribosomaler RNA aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens und raschen Amplifikation während der RT-PCR gewährleistet.

Die optimale Zyklenanzahl, die sich in der Mitte des exponentiellen Bereiches der Amplifikation befindet, wurde für die spezifischen Primerpaare (siehe Tabelle 2) in Vorexperimenten bestimmt.

*Tabelle 2 mit Übersicht über die verwendeten Primer für die semiquantitative RT-PCR, S (sense), AS (antisense), bp (base pair), Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T).*

Enzym (Gen)	Primersequenz (5' nach 3')	Produkt (bp)	Zyklusanzahl
17 $\beta$ -HSD 5 (HSD17B5 = AKR1C3)	S GTAAAGCTTTGGAGGTCACAAAATTAGCAAT AS TTTGTCTCGTTGAGATCCCAGAGCACTATA	581	28
5 $\alpha$ -reductase 1 (SRD5A1)	S GGCTTGTGGTTAACAGGCAT AS CAAATTTCCGGAGGTACCAC	265	28

Hierzu wurden aliquotierte Reaktionen bei Amplifikationszyklus 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 und 38 entnommen und die amplifizierte DNA in 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden unter UV-Licht (360 nm) digital fotografiert (Canon PowerShot G1) und densitometrisch analysiert (Adobe®Photoshop® 6.0, ImageGauge V. 3.4). Da bei gleichzeitiger Amplifikation des Zielgens und 18s RNA (interner Standard)

spezifische Primer und 18s Primer um Reaktionssubstrate konkurrieren, wurde ebenso das optimale Primer/Competimer-Verhältnis zum jeweiligen spezifischen Primer bei optimierter Zyklenanzahl bestimmt. Dies war bei densitometrisch bestimmter, annähernd gleicher Bandendichte von Zielgen und internem Standard gegeben.

Der Standardreaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt 4 µl QuantumRNA™ Classic I (bzw. Classic II) 18s Internal Standards (Ambion®, Austin, Texas) (Verhältnis 18s Primer:Competimer = 1:9), 5 µl (10x) PCR-buffer, jeweils 2 µl (10pM) Forward und Reverse Primer, 4 µl (2,5 mM) dNTP, 0,4 µl HotStarTaq Polymerase und 500 ng cDNA.

Nukleinsäuren werden entsprechend ihrer Länge in Agarosegelen im elektrischen Feld aufgetrennt, indem die negativ geladenen Nukleinsäuren zur positiv geladenen Kathode wandern. Durch UV-Licht werden die in den Nukleinsäuren interkalierten Ethidiumbromidmoleküle zur Fluoreszenz angeregt und visualisiert.

Es wurden 2%ige Agarosegele verwendet, die eine gute Separation für Fragmente zwischen 0,2 und 1Kb gewährleisten. Hierzu wurde durch Erhitzen Agarose in Joule-Box-Puffer (24 g Tris, 3,7 g EDTA, 5,7 ml Essigsäure auf 5 l mit aqua dest aufgefüllt) gelöst, nach Abkühlen der Lösung Ethidiumbromid (1%, 10 mg/ml) zugefügt und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Zu den DNA Proben wurde Orange loading dye (6x) (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) pipettiert und die aufgetragenen Proben bei 100V/cm (Stratagene Joule-Box-System) aufgetrennt. Die Länge der DNA-Fragmente wurde mittels parallel aufgetragener Größenreferenzmarker (100bp DNA Ladder, Fermentas Generuler™) verifiziert.

## 2.6. Realtime RT-PCR

Zur Analyse der Expression von mRNA bei AKR1C3 (=HSD17B5) und SRD5A1 wurde ein ABI Prism 7700 Sequenz Detektions-System (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, UK) verwendet, das der präzisen Quantifizierung von mRNA Expression dient.

Beim Einsatz der TaqMan Technik wird die Amplifikation des Zielgens, durch fluoreszenzmarkierte Sonden, die für diese Zielsequenz spezifisch sind, bestimmt. An die Sonde sind ein Reporterfarbstoff und ein Quencherfarbstoff, der die Fluoreszenz des räumlich benachbarten Reporterfarbstoffs unterdrückt, angebunden. Während des PCR-Extensionsschritts trifft die Taq-Polymerase auf das 5'-Ende der Sonde und hydrolysiert diese durch ihre Exonukleaseaktivität. Dadurch werden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt und das emittierte Reporter-Signal kann nicht länger unterdrückt werden. Die Fluoreszenz steigt proportional zur Anzahl synthetisierter PCR-Produkte an. Diese Veränderung der Fluoreszenz kann mit Hilfe des ABI Prism 7700 Zyklus für Zyklus in Echt-Zeit erfasst werden.

Die Real-time RT-PCR wurde mit Reaktionsvolumen von 25 µl auf 96-well-plates durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt TaqMan Universal PCR Master Mix, 3 mM Mn(Oac)<sub>2</sub>, 200 µM deoxy-NTPs, 1,25 U AmpliTaq Gold Polymerase, 1,25 U AmpErase UNG, 100 – 200 nmol TaqManprobe, 900 nmol Primer und 25 – 50 ng cDNA als template. Die Olinukleotidprimer und TaqMan Probe für AKR1C3 und SRD5A1 waren wie folgt:

*Tabelle 3 mit Übersicht über die verwendeten Primer für realtime RT-PCR, S (sense), AS (antisense), bp (base pair), Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T).*

17 $\beta$ -HSD 5 (HSD17B5 = AKR1C3)	S	GGGATCTCAACGAGACAAACG
	AS	AAAGGACTGGGTCTCCAAGA
	Probe	TGGACCCGAACCTCCCCGGTG
5 $\alpha$ -reductase 1 (SRD5A1)	S	GCGCCCAATGCATCCT
	AS	TCGCATCAGAAACGGGTAAT
	Probe	CGTCCACTACGGGCATCGGTGCT

Jede Reaktion wurde 18s (housekeeping gene) kontrolliert durchgeführt, das als voroptimierte Kontrollprobe von Perkin-Elmer bezogen wurde. Dies ermöglichte bei unterschiedlicher Effizienz der Reversen Transkription, die gewonnenen Daten in Bezug auf einen internen Referenzwert darzustellen. Die Berechnungen erfolgten in dreifacher Bestimmung für jede Probe. Zur Markierung der Ansätze mit den Zielgenen diente der Fluoreszenzreporterfarbstoff FAM sowie VIC zur Markierung der Ansätze mit den internen Standards. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt:

50°C für 2 min, 95°C für 10 min, anschließend 44 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 min.

## 2.7. Methoden der Datenanalyse/Statistik

Die Statistische Auswertung zur Ermittlung von Mittelwerten, Standardabweichungen, Signifikanzniveau  $p$  und Korrelationskoeffizient  $r$  erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms Statview 5.1. Die Ergebnisse zur Signifikanzberechnung wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung mittels t-Test für unverbundene Stichproben berechnet. Dabei wurde ein Wert von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

Die Daten der Realtime RT-PCR wurden entsprechend den Richtlinien des Herstellers als Ct-Werte dargestellt (Zyklusanzahl, bei der logarithmische PCR-plots einen berechneten Schwellenwert überschreiten). Zur Berechnung von  $\Delta$ Ct-Werten wurde vom Ct-Wert des Zielgens der Ct-Wert des internen Standards subtrahiert und in die Gleichung  $n\text{-fache Expression} = 2^{\text{Differenz bei } \Delta\text{Ct}}$  zur Berechnung der n-fachen Expression eingesetzt. Dabei repräsentieren hohe  $\Delta$ Ct-Werte einen niedrigen Expressionsgrad des Zielgens.

Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung bzw. -fehler angegeben. Die statistische Analyse der realtime-PCR Daten wurden aus Mittelwerten der  $\Delta$ Ct-Werte durchgeführt um systematische Potenzierungsfehler, die aus den Mittelwertbildungen der Gleichung  $2^{\text{Differenz bei } \Delta\text{Ct}}$  entstehen können, auszuschließen. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde anhand des Student-t-Tests für unverbundene Stichproben durchgeführt bzw. anhand des Mann-Whitney-U-Tests mit dem Statistikprogramm SPSS (SPSS, Version 12.0, Inc. Chicago, IL.) berechnet. Als signifikant wurde ein Wert von  $p < 0,05$  betrachtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Steroidbiosynthese-Enzymexpression in peripheren humanen mononukleären Blutzellen

##### 3.1.1. Qualitative Enzymexpression

DHEAS wird in einem Desulfatierungsschritt durch die Steroidsulfatase zu DHEA aktiviert und kann in nachfolgende Steroide konvertiert werden. Das intrazelluläre Angebot an DHEA wird somit über die Steroidsulfatase reguliert, zum anderen über Steroidsulfotransferasen (SULTs), die die rückläufige Reaktion katalysieren. In humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) konnte die Expression der Steroidsulfatase (STS) sowie der DHEA-Sulfotransferase 2B1a (SULT2B1A) nachgewiesen werden. Die Expression von DHEA-Sulfotransferase (SULT2A1), die hauptsächlich in Leber und Nebennieren exprimiert ist (54) und Steroidsulfotransferase 2B1b (SULT2B1B), eine Splicevariante der SULT2B1A, konnte in humanen peripheren mononukleären Blutzellen nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.1).

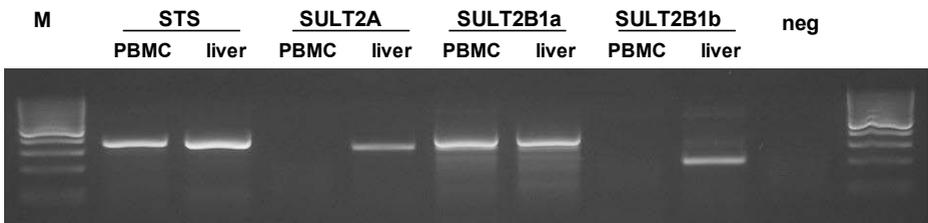


Abbildung 3.1: RT-PCR-Expressionsanalyse von Sulfatase (STS) und Sulfotransferasen (SULT) in peripheren humanen mononukleären Blutzellen (PBMCs), M=100bp ladder, neg=Negativkontrolle, liver=Leber (Positivkontrolle).

DHEA kann über zwei Isoenzyme der 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, 3 $\beta$ -HSD 1 und 2 zu Androstendion und über 17 $\beta$ -HSD Aktivität zu Androstendiol konvertiert werden (48). Die RT-PCR-Expressionsanalyse zeigte, dass beide Isoformen der 3 $\beta$ -HSD in PBMCs exprimiert werden (siehe Abb. 3.2).

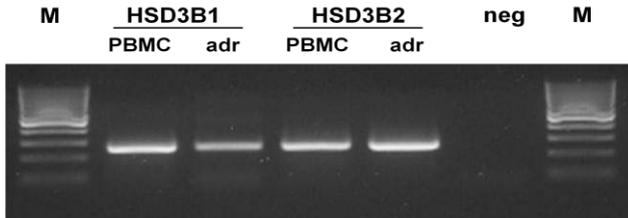
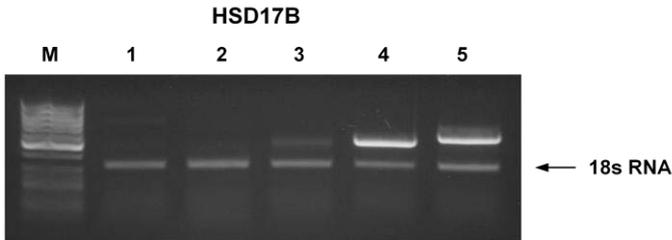


Abbildung 3.2: RT-PCR-Expressionsanalyse der 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1 und 2 (HSD3B1 und 2) in peripheren humanen mononukleären Blutzellen (PBMC), M=100bp ladder, neg=Negativkontrolle, adr=Nebenniere (Positivkontrolle)

In peripheren humanen mononukleären Blutzellen konnte die Expression der 17 $\beta$ -HSD Isoenzyme 1, 3, 4 und 5 bei fehlender Expression von 17 $\beta$ -HSD 2 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.3). 17 $\beta$ -HSD 5 zeigt hauptsächlich Reduktaseaktivität und führt somit zu Androgenaktivierung, wohingegen 17 $\beta$ -HSD 4 die gegenläufige Reaktion (Oxidation) katalysiert und eine Inaktivierung bewirkt (55) (39) (56). Durch 17 $\beta$ -Aktivität kann sowohl DHEA zu Androstendiol konvertiert werden, als auch Androstendion zu Testosteron.



*Abbildung 3.3: RT-PCR-Expressionsanalyse der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenasen (HSD17B1, 2, 3, 4, und 5) in peripheren humanen mononukleären Blutzellen (PBMC), M=100bp ladder, 18s (interner Standard, 324 bp).*

Aromatase (CYP19) konvertiert Androgene zu Östrogenen, Androstenedion zu Östron und Testosteron zu 17 $\beta$ -Östradiol. Eine Expression dieses Enzyms konnte in humanen PBMCs jedoch nicht nachgewiesen werden.

5 $\alpha$ -Hydroxylierung von Steroiden wird durch die 5 $\alpha$ -Reduktase katalysiert. Es existieren zwei Isoformen dieses Enzyms, 5 $\alpha$ -Reduktase 1 (SRD5A1) und 2 (SRD5A2). Durch 5 $\alpha$ -Aktivität wird Testosteron zu dem potenteren Dihydrotestosteron und Androstenedion zu 5 $\alpha$ -Androstenedion metabolisiert (35) (36). Die Expression von 5 $\alpha$ -Reduktase 1 konnte in humanen PBMCs deutlich, die Expression von 5 $\alpha$ -Reduktase 2 nur schwach nachgewiesen werden, wohingegen keine Expression der 5 $\beta$ -Reduktase (AKR1D1) durch RT-PCR nachweisbar war.

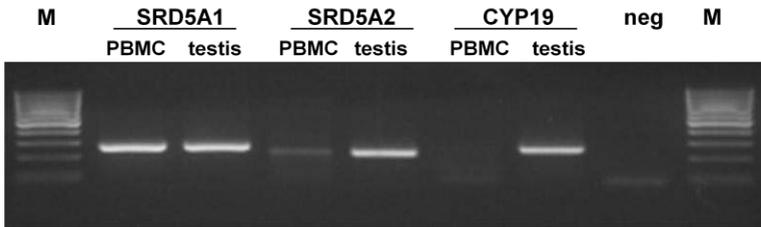


Abbildung 3.4: RT-PCR-Expressionsanalyse der  $5\alpha$ -Reduktase 1 und 2 (SRD5A1 und 2) und der Aromatase (CYP19) in humanen PBMCs, M=100bp ladder, neg=Negativkontrolle, testis=Hoden (Positivkontrolle).

Die Bildung von Androsteron wird durch Aldoketoreduktasen, die  $3\alpha$ -HSD-Aktivität besitzen, katalysiert. In humanen PBMCs konnte die Expression der Isoformen 1 (AKR1C1) und 3 (AKR1C3) nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.5). AKR1C3 (=HSD17B5) kodiert für  $17\beta$ -HSD 5, die ebenso  $3\alpha$ -HSD-Aktivität besitzt und deshalb auch als  $3\alpha$ -HSD 3 bezeichnet wird (48) (57).

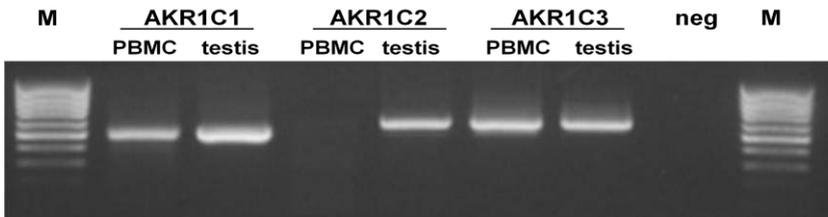


Abbildung 3.5: RT-PCR-Expressionsanalyse der Aldoketoreduktasen (AKR1C1, 2 und 3) in humanen PBMCs, M=100bp ladder, neg=Negativkontrolle, testis=Hoden (Positivkontrolle).

*Tabelle 3.1: tabellarische Übersicht über die Expression von Steroidbiosynthese-Enzymen in humanen peripheren mononukleären Blutzellen.*

<b>Enzym</b>	<b>(Gen)</b>	<b>Expression in PBMC</b>	<b>Positivkontrolle</b>
3 $\beta$ -HSD 1	(HSD3B1)	++	Nebenniere
3 $\beta$ -HSD 2	(HSD3B2)	++	Nebenniere
17 $\beta$ -HSD 1	(HSD17B1)	+	Hoden
17 $\beta$ -HSD 2	(HSD17B2)	-	Niere
17 $\beta$ -HSD 3	(HSD17B3)	+	Hoden
17 $\beta$ -HSD 4	(HSD17B4)	++	Hoden
17 $\beta$ -HSD 5	(HSD17B5)	++	Hoden
5 $\alpha$ -reductase 1	(SRD5A1)	++	Hoden
5 $\alpha$ -reductase 2	(SRD5A2)	+	Hoden
5 $\beta$ -reductase	(AKR1D1)	-	Leber
3 $\alpha$ -HSD 1	(AKR1C1)	+	Leber
3 $\alpha$ -HSD 2	(AKR1C2)	-	Leber
3 $\alpha$ -HSD 3	(AKR1C3) =HSD17B5)	++	Hoden
Steroidsulfatase	(STS)	++	Leber
Sulfotransferase 2A	(SULT2A)	-	Leber
Sulfotransferase 2B1a	(SULT2B1a)	+	Kolon
Sulfotransferase 2B1b	(SULT2B1b)	-	Leber
Aromatase	(CYP19)	-	Hoden

- keine Expression, + schwache Expression, ++ starke Expression

### 3.1.2. *Semiquantitative Enzymexpression*

Die optimale Zyklusanzahl (Mitte des densitometrisch bestimmten exponentiellen Bereiches der Amplifikation) für die semiquantitative Analyse der Enzymexpression von 17 $\beta$ -HSD 5 und 5 $\alpha$ -Reduktase 1 betrug unter Standardbedingungen für beide PCR-Ansätze 28 bei einem Primer/Competimerverhältnis von 1:9 (siehe Abbildung 3.6 und 3.7). In Abbildung 3.8 wird exemplarisch die semiquantitative Expressionsanalyse für SRD5A1 bei älteren männlichen Probanden nach den erfolgten Vorversuchen dargestellt.

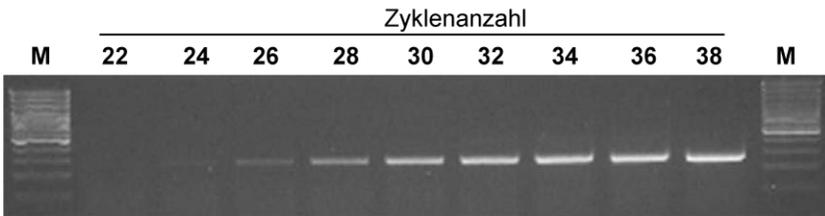


Abbildung 3.6: PCR zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz für 5 $\alpha$ -Reduktase 1, M =100 bp ladder.

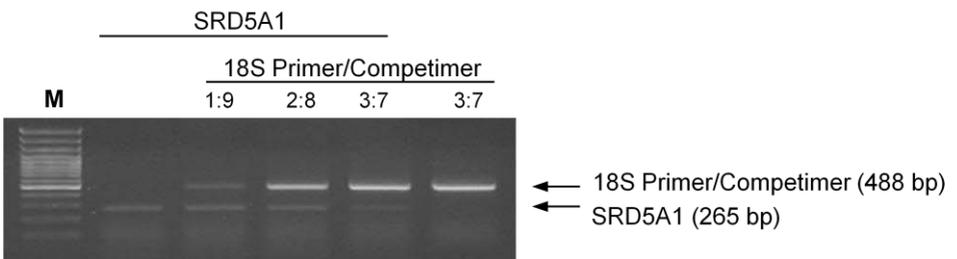


Abbildung 3.7: PCR bei optimierter Zyklusanzahl (28) zur Ermittlung des optimalen Primer/Competimer Verhältnisses für 5 $\alpha$ -Reduktase 1 (SRD5A1).

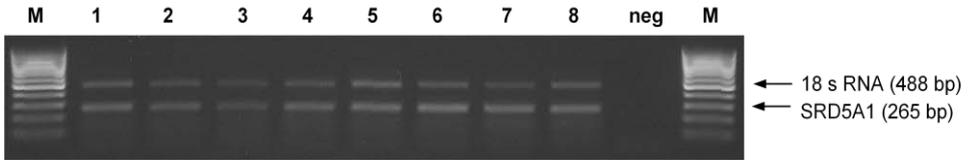


Abbildung 3.8: PCR zur semiquantitativen Expressionsanalyse für SRD5A1 bei älteren männlichen Probanden, M=100bp ladder, neg=Negativkontrolle, Probanden (1-8).

Die densitometrische Analyse der Enzymexpression von 17 $\beta$ -HSD 5 und 5 $\alpha$ -Reduktase 1 bei den verschiedenen Probandengruppen ist in Tabelle 3.2 und Abbildung 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.2: Übersicht über die semiquantitative densitometrische Enzymexpressionsanalyse von 17 $\beta$ -HSD 5 und 5 $\alpha$ -Reduktase 1 mRNA normiert auf 18s RNA.

Enzym	Junge männliche Probanden	Ältere männliche Probanden	Junge weibliche Probandinnen
17 $\beta$ -HSD 5	0,35	0,59	0,79
5 $\alpha$ -Reduktase 1	1,65	1,61	1,76

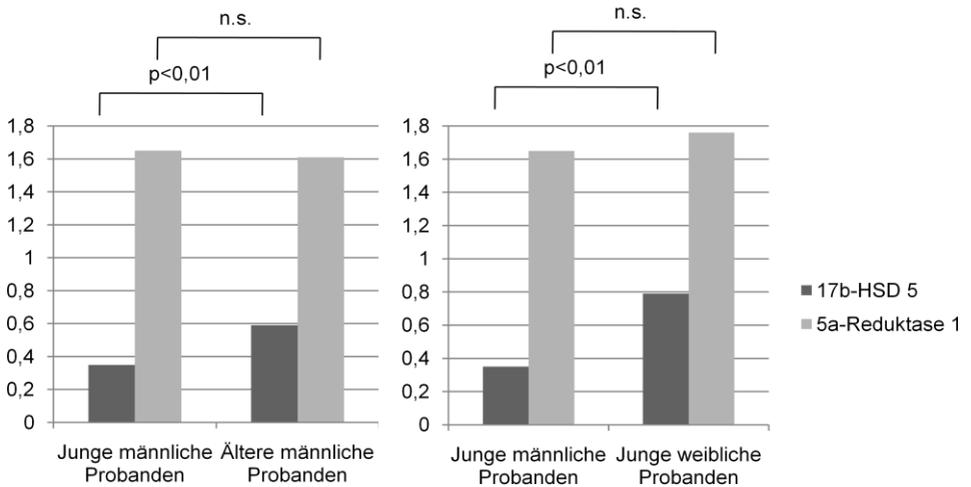


Abbildung 3.9: graphische Darstellung der Ergebnisse der semiquantitativen densitometrischen Enzymexpressionsanalyse von 17β-HSD 5 und 5α-Reduktase 1 mRNA normiert auf 18s RNA.

Aus den in Tabelle 3.2 und Abbildung 3.9 dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, dass es bei den Älteren männlichen Probanden und Jungen weiblichen Probandinnen im Vergleich zu den Jungen männlichen Probanden zu einer signifikant höheren Expression der 17β-HSD 5 kommt ( $p < 0,01$ ), aber keine signifikanten Unterschiede zwischen Älteren männlichen Probanden und Jungen weiblichen Probandinnen bestehen.

Hinsichtlich der Expression der 5α-Reduktase 1 bestehen zwischen den Probandengruppen keine signifikanten Unterschiede, wobei dieses Enzym stärker exprimiert ist als die 17β-HSD5 (siehe Tabelle 3.2).

Bei semiquantitativer Analyse der Expression der 17β-HSD Isoenzyme, konnte für die Isoformen 4 und 5 (28 Zyklen, linearer Amplifikationsbereich der PCR) eine starke Expression (18s kontrolliert) festgestellt werden (siehe

Abbildung 3.3). Die Isoformen 1 und 3 dagegen waren in humanen PBMCs nur schwach exprimiert, bei fehlender Expression von 17 $\beta$ -HSD 2.

### 3.1.3. *Quantitative Enzymexpression*

In Übereinstimmung der semiquantitativen RT-PCR Ergebnisse zur Expression der 17 $\beta$ -HSD5 zeigte sich in der quantitativen Bestimmung mittels real-time PCR ebenso ein altersabhängiger Anstieg der Expressionsrate (1,5-fach höhere Expression bei den älteren männlichen Probanden), wobei statistische Signifikanz knapp verfehlt wurde ( $\Delta$ ct junge vs. ältere männliche Probanden,  $11,6 \pm 0,4$  vs.  $10,8 \pm 0,2$ .  $p = 0,06$ ).

Im Vergleich dazu ergaben real-time-PCR-Ergebnisse keinen signifikanten altersabhängigen Unterschied in der mRNA-Expression der 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 1 ( $\Delta$ ct junge vs. ältere männliche Probanden,  $20,5 \pm 1,1$  vs.  $19,1 \pm 1,0$ ; nicht signifikant), ähnlich den Ergebnissen der semiquantitativen Analyse.

Auf einen quantitativen Vergleich mittels real-time-PCR zwischen jungen männlichen Probanden und jungen weiblichen Probandinnen musste aufgrund unzureichender cDNA Menge aus der jungen männlichen Probanden Gruppe verzichtet werden.

### 3.2. Enzymatische Funktionsassays zur Bestimmung des Androgenmetabolismus in peripheren humanen mononuklearen Blutzellen (PBMCs)

Inkubation von PBMCs mit DHEA führt zur Bildung von Androstenedion durch 3 $\beta$ -HSD Aktivität und zur Bildung von Androstenediol durch Reduktion via 17 $\beta$ -HSD Aktivität. Ausgehend von den unter 3.1.2. dargestellten semiquantitativen mRNA-Expressionsergebnissen kann angenommen werden, dass die Schlüsselreaktion hauptsächlich durch die 17 $\beta$ -HSD Typ 5 katalysiert wird (siehe Abb. 3.10).

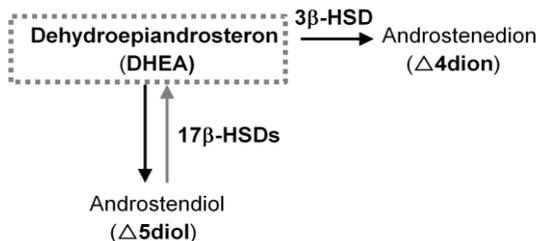


Abbildung 3.10: schematische Darstellung der Konversionsprodukte und beteiligten Enzymen der enzymatischen Funktionsassays ausgehend von DHEA.

Bei Betrachtung der Inkubationen von PBMCs mit Androstenedion konnten als Konversionsprodukte Testosteron, 5 $\alpha$ -Androstenedion und Androsteron nachgewiesen werden. Die Bildung von Testosteron wird durch 17 $\beta$ -HSD Aktivität, insbesondere wie schon erwähnt durch die 17 $\beta$ -HSD Typ 5, katalysiert. Die Konversion von Androstenedion zu 5 $\alpha$ -Androstenedion erfolgt durch 5 $\alpha$ -Reduktaseaktivität und in einem weiteren Schritt zu Androsteron durch 3 $\alpha$ -Hydroxysteroidaktivität (siehe Abb. 3.11).

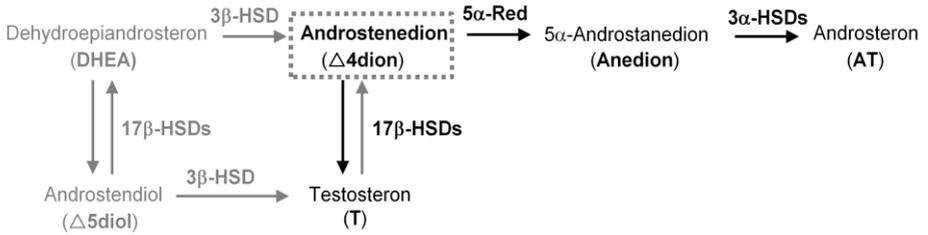


Abbildung 3.11: schematische Darstellung der Konversionsprodukte und beteiligten Enzymen der enzymatischen Funktionsassays ausgehend von Androstenedion.

Ausgehend von Testosteron als Inkubationssubstrat wurde die Konversion durch 17 $\beta$ -HSD Aktivität zu Androstenedion und durch 5 $\alpha$ -Reduktaseaktivität (SRD5A1) zu 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron beobachtet. Unter Berücksichtigung der in 3.1.2. dargestellten semiquantitativen mRNA-Expressionsergebnissen ist anzunehmen, dass der Oxidationsschritt von Testosteron zu Androstenedion hauptsächlich durch die 17 $\beta$ -HSD Typ 4 vermittelt wird.

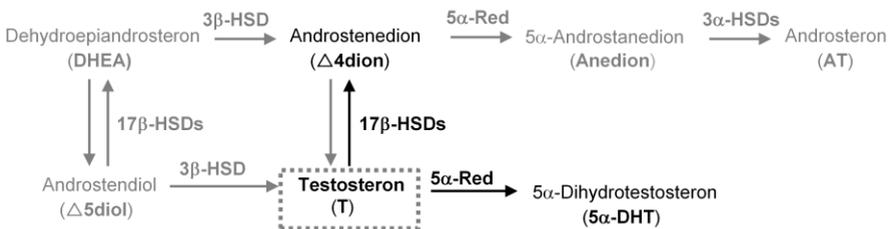


Abbildung 3.12: schematische Darstellung der Konversionsprodukte und beteiligten Enzymen der enzymatischen Funktionsassays ausgehend von Testosteron

### 3.2.1. *Alterseffekte: Ergebnisse im Vergleich junger und älterer männlicher Probanden*

Für  $3\beta$ -HSD Aktivität, bestimmt durch die Konversion von DHEA zu Androstenedion, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war die Konversion von DHEA zu Androstendiol durch die  $17\beta$ -HSD5 in der älteren Probandengruppe signifikant erhöht (siehe Abbildung 3.13, Grafik A).

Ebenso zeigte sich vermehrte  $17\beta$ -HSD5 Aktivität in der älteren Probandengruppe für die Konversion von Androstendion zu Testosteron ( $P < 0,05$ ) sowie vermehrte Konversion von Androstendion zu  $5\alpha$ -Androstenedion, im Sinne einer erhöhten  $5\alpha$ -Reduktase Aktivität ( $P < 0,05$ ) (siehe Abbildung 3.13, Grafik B). Diese zeigte sich auch in der signifikant höheren Aktivierung von Testosteron zu  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron in der älteren Probandengruppe ( $P < 0,05$ ). Die Inaktivierung von Testosteron zu Androsteron via oxidativer  $17\beta$ -HSD Aktivität war in der älteren Probandengruppe im Vergleich zur jüngeren ebenso signifikant erhöht ( $P < 0,05$ ) (siehe Abbildung 3.13, Grafik C).

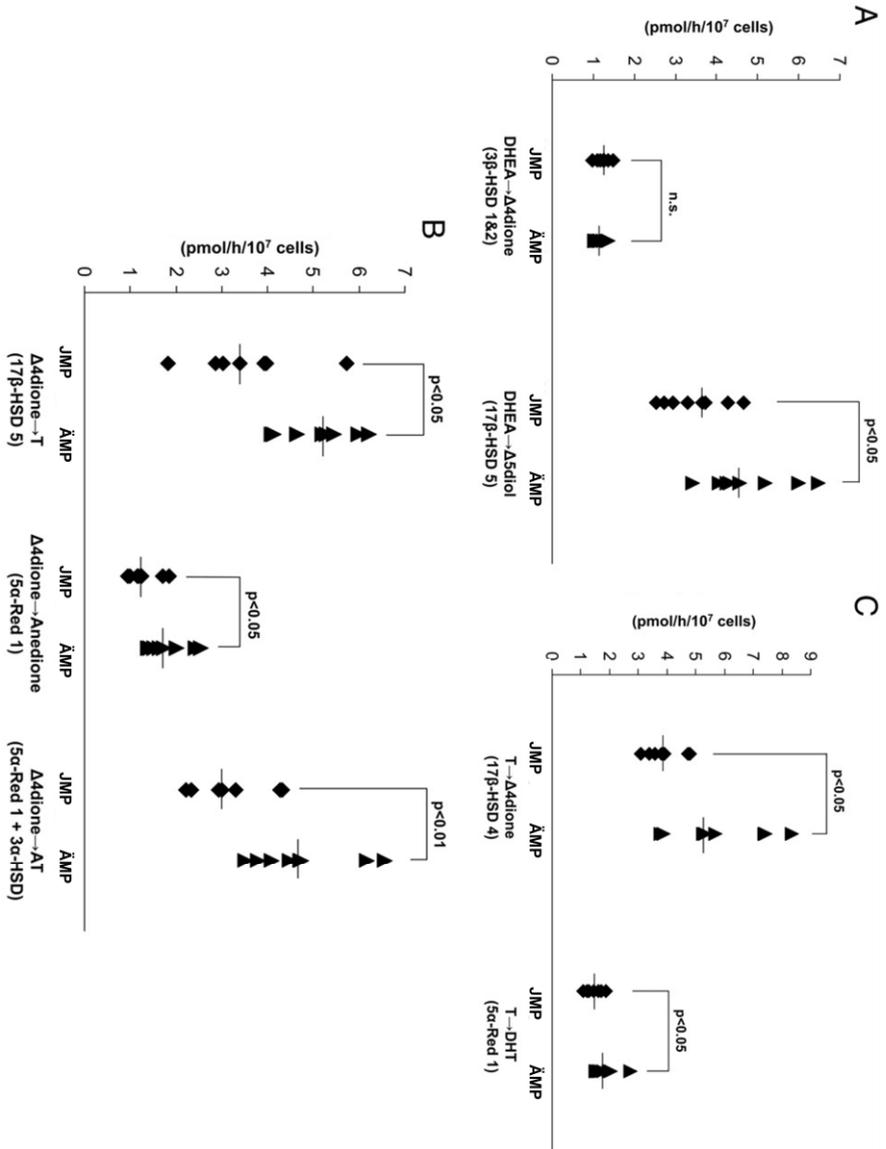


Abbildung 3.13: Konversion (pmol/h/10<sup>7</sup> Zellen) von DHEA, dargestellt in Graphik A, Androstenedion (Graphik B) und Testosteron (Graphik C) in humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), isoliert von jungen

männlichen (JMP) und älteren männlichen Probanden (ÄMP). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte, bei denen jeder Punkt aus einer dreifachen Messung resultiert. Die statistische Auswertung wurde durch einen Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Androstenedion ( $\Delta 4$ dione), Androstenediol ( $\Delta 5$ diol),  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT),  $5\alpha$ -Androstenedion (Anedione), Androsteron (AT),  $5\alpha$ -Reduktase ( $5\alpha$ -Red).

### 3.2.2. Geschlechtseinfluss: Ergebnisse im Vergleich junger männlicher Probanden zu jungen weiblichen Probandinnen

Signifikante Unterschiede zwischen der jungen weiblichen und männlichen Probandengruppe konnten hinsichtlich der  $3\beta$ -HSD-Aktivität im Sinne einer Konversion von DHEA zu Androstenedion nicht nachgewiesen werden.

Ebenso ergab die Analyse der  $17\beta$ -HSD5-Aktivität, bestimmt durch die Konversion von DHEA zu Androstendiol bzw. Androstendion zu Testosteron, keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Probandengruppen (siehe Abbildung 3.14, Grafik A und B).

Bezüglich der  $5\alpha$ -Reduktase-Aktivität, die eine Konversion von Androstendion zu  $5\alpha$ -Androstenedion bzw. Testosteron zu  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron katalysiert, konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in den beiden Probandengruppen gefunden werden. Die Inaktivierung von Testosteron zu Androstendion und Androsteron via oxidativer  $17\beta$ -HSD Aktivität war in der jungen weiblichen Probandengruppe im Vergleich zur jungen männlichen signifikant erhöht ( $P < 0,05$ ) (siehe Abbildung 3.14, Grafik C).

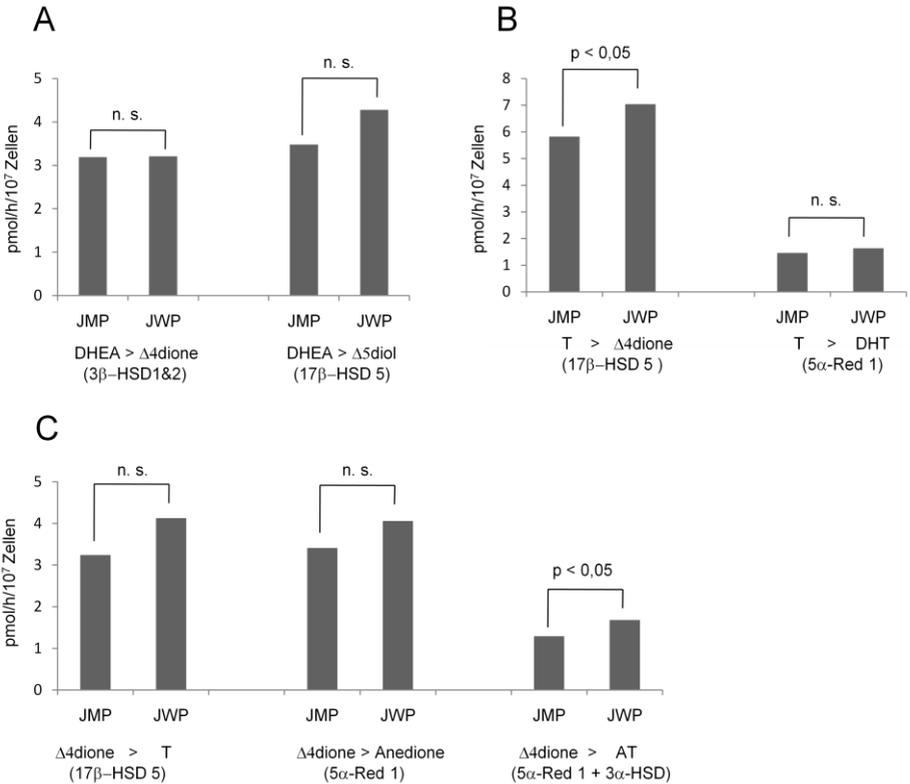


Abbildung 3.14: Konversion (pmol/h/10<sup>7</sup> Zellen) von DHEA, dargestellt in Graphik A, Testosteron (Graphik B) und Androstenedion (Graphik C) in humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), isoliert von jungen männlichen (JMP) und älteren männlichen Probanden (JWP). Die statistische Auswertung wurde durch einen Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Androstenedion (Δ4dione), Androstenediol (Δ5diol), 5α-Dihydrotestosteron (DHT), 5α-Androstenedion (Anedione), Androsteron (AT), 5α-Reduktase (5α-Red).

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass es bei humanen PBMCs vornehmlich zu Aktivierungsprozessen (kumulative Konversion durch  $5\alpha$ -Reduktase und  $17\beta$ -HSD-Reduktase Aktivitäten) im Vergleich zu Deaktivierungsprozessen (z.B. durch oxidative  $17\beta$ -HSD Aktivität) in beiden männlichen Probandengruppen kommt.

Dahingegen kam es in der jungen weiblichen Probandengruppe im Vergleich zur jungen männlichen zu verstärkten Inaktivierungsprozessen, was sich in der vermehrten Konversion von Testosteron zu Androstendion und Androsteron via oxidativer  $17\beta$ -HSD Aktivität widerspiegelte.

Bildung von Östrogenen aus Androstenedion oder Testosteron konnte mittels Funktionsassays nicht nachgewiesen werden, was in Übereinstimmung mit dem fehlenden Nachweis von mRNA Expression der P450 Aromatase in humanen PBMCs zu sehen ist.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) über alle notwendigen Steroidenzyme für einen effizienten Downstreammetabolismus ausgehend von DHEA zu Androstendiol und aktiven Androgenen wie z.B. Testosteron oder Dihydrotestosteron verfügen. Dies konnte sowohl durch den qualitativen und quantitativen Nachweis von mRNA der betreffenden Enzyme als auch durch die nachgewiesene Aktivität in PBMC-Enzymfunktionsassays bestätigt werden. Dabei ist es von nicht geringer Bedeutung, dass PBMCs ein unterschiedliches alters- und geschlechtsspezifisches Potential hinsichtlich der Konversion von Steroiden haben. Dies führt mit zunehmendem Alter zu einem Anstieg von Androstendiol und aktiven Androgenen.

In einer früheren Studie wurde über die Konversion von  $16\alpha$ -Hydroxy-DHEA und in geringerem Maße  $16\alpha$ -Hydroxy-Testosteron nach Inkubation isolierter mononukleärer Zellen und Makrophagen mit radioaktiv markiertem DHEA berichtet (51). In meinen durchgeführten Enzymfunktionsassays mit frisch isolierten PBMCs, die hauptsächlich periphere T- und B-Lymphozyten (80-90%) und zum kleineren Anteil Monozyten oder Makrophagen (5-15%) enthielten, konnte ich hingegen keine messbaren  $16\alpha$ -Metabolite nachweisen. Davon ausgehend, scheint die Konversion von DHEA zu Androstendiol und Androgenen bevorzugt in Lymphozyten stattzufinden, wobei Monozyten oder Makrophagen ein davon wohl unterschiedliches Konversionsmuster aufzeigen. Dies veranschaulicht die große Bedeutung einer Aufteilung der Immunzellen in unterschiedliche Subtypen. Die Analyse des Steroidmetabolismus in der Gesamtheit der PBMCs, wie ich es in meiner Arbeit durchgeführt habe, liefert dagegen einen geeigneten Gesamtüberblick. Obwohl sich im Differentialblutbild der unterschiedlichen Probandengruppen keine maßgeblichen Unterschiede aufzeigten, hätten sich in der

Fluoreszenzzytometrie kleinere Unterschiede aufdecken lassen können. Veränderungen in Lymphzytensubpopulationen wie sie im Alterungsprozess beobachtet werden, beinhalten eine Verschiebung von naiven zu CD45+ T-Zellen, einen Anstieg der Natürlichen Killerzellen und eine Verschiebung von naiven zu aktivierten Monozyten (58). Die Analyse des Steroidmetabolismus in den verschiedenen Subpopulationen von Zellen des Immunsystems bietet einen interessanten Ansatz für weiterführende zukünftige Studien. Dabei ist es wichtig, Aktivitäten im Steroidmetabolismus in Zusammenhang mit dem Aktivierungs-, bzw. Differenzierungsgrades der spezifischen Immunzelle zu sehen, wie es für die Hochregulierung von 11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 im Reifungsprozess von Monozyten zu Makrophagen (59) ebenso wie für die Hochregulierung von 1 $\alpha$ -Hydroxylaseaktivität in der Ausreifung von Monozyten zu Dendritischen Zellen (60) beschrieben wurde.

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen konnte keine Expression der P450 Aromatase bei humanen peripheren mononukleären Blutzellen mittels PCR nachgewiesen werden (50) (52). Dementsprechend war keine Konversion von radioaktivmarkiertem Androstendion und Testosteron zu Östron bzw. 17 $\beta$ -Östradiol in den entsprechenden Enzymfunktionsassays zu finden. Dies lässt schlussfolgern, dass die von DHEA induzierten immunmodulatorischen Effekte nicht durch Östrogene, sondern vielmehr aus den von DHEA entstandenen Androgenen und anderen Steroiden wie z.B. Androstendiol, im Sinne einer vermehrten Androgenaktivierung, respektive der Konversion von Androstenedion zu Testosteron, vermittelt werden. Diese vermehrte Androgenaktivierung könnte einen kompensatorischen Prozess der peripheren Zielzelle darstellen, um einen Abfall der DHEA-Serumspiegel, wie sie im Alterungsprozess physiologischerweise vorkommen, entgegenzuwirken.

Wie schon in früheren Arbeiten gezeigt, führt die exogene Zufuhr von DHEA zu geschlechtsspezifischen Unterschieden im Downstreammetabolismus (61)

(62), was durch Serumhormonspiegel der zirkulierenden Steroide erfasst werden kann.

Steroidmetabolismus und Zytokinproduktion sind ein eng ineinandergreifender Prozess (63). In Arbeiten von Straub et al. (13) wurde über eine inverse Korrelation von DHEA/DHEAS und Interleukin-6 (IL-6) in humanem Serum, sowie über eine signifikante DHEA-abhängige Inhibition der IL-6 Produktion bei humanen PBMCs berichtet. In weiteren Studien konnten Daynes et al. eine gesteigerte Produktion von IL-2 durch Lymphozyten von DHEA vorbehandelten Mäusen nachweisen (23) sowie Yang et al. eine verzögerte Expression von IL-6 Transkripten nach Applikation von DHEA an Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe (41). Ebenso am Tiermodell konnte durch Corsini et al. nach DHEA Applikation ein Anstieg der TNF- $\alpha$  Produktion in Alveolarmakrophagen von Ratten sowohl in vitro als auch in vivo beobachtet werden (24). In gleicher Weise kommt es bei humanen Monozyten nach Stimulation mit DHEA zu einer gesteigerten Zytotoxizität (25).

Zusätzlich zu den zahlreichen Arbeiten, die Effekte von Steroidhormonen auf das Immunsystem beschreiben, liegen verschiedene Studien vor, die Effekte von Zytokinen auf Steroidenzyme beschreiben.

In Arbeiten von Kim et al. (64) wird am Mausmodell eine Herabregulierung der Sulfotransferase (Sult2A1) einhergehend mit einer verminderten Sulfatierung von DHEA und folglich verminderten Serum DHEA-Spiegeln während der akuten Phase Reaktion berichtet. Weitergehende Untersuchungen an humanen Leberkarzinomzelllinien (Hep3B) mittels Northern Blot Analyse zeigten signifikant erniedrigte mRNA-Expression der Sult2A1 nach Exposition der Zellen mit dem Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-1 (IL-1) (64). Ebenso im Mausmodell konnten Samy et al. über eine geschlechtsspezifisch unterschiedliche Immunantwort, gesteigerte immunsuppressiv wirkende 5 $\alpha$ -Reduktase Aktivität bei den Männchen sowie eine gesteigerte

immunprotektive Aromatase-Aktivität bei den Weibchen, nach hämorrhagischem Trauma berichten (65).

In humanen Osteosarkomzelllinien (MG-63) inhibierten Interleukin-1 $\beta$  (Il-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) effektiv 11 $\beta$ -HSD2-Aktivität und führten infolge zu einer verminderten Glucokortikoidinaktivierung während es gleichzeitig zu einer Induktion der Glucokortikoidaktivierung, vermittelt über Aktivierung der 11 $\beta$ -HSD1 (Konversion von Cortison zu Cortisol), kam (66). In weiteren Studien konnte eine Induktion von 3 $\beta$ -HSD1-Aktivität nach Exposition mit Il-4 anhand eines Anstiegs von mRNA mittels RT-PCR und Northern Blot Analyse in humanen Prostataepithelzellen, immortalisierten Keratinozyten (HaCaT), Kolon- (HT-29) und Cervixkarzinomzelllinien (ME-180) nachgewiesen werden (67).

Der Alterungsprozess ist mit deutlichen Veränderungen in der Zytokinproduktion verbunden, insbesondere mit einem Anstieg von Il-6 und einem Abfall von Il-2. DHEA wirkt diesen Veränderungen entgegen, wie es von Suzuki et al. bei CD4+ T-Zellen und von Gordon et al. bei humanen Knochenmarkszellen in verschiedenen Arbeiten berichtet wurde (27) (28). Daher ist es gut vorstellbar, dass auch Veränderungen im Zytokinhaushalt den gewebspezifischen Steroidmetabolismus beeinflussen können.

## **5. Zusammenfassung**

Dehydroepiandrosteron wirkt hauptsächlich indirekt über nachfolgende Umwandlung in Androgene und Östrogene sowie deren Zwischenprodukte in den peripheren Zielzellen, respektive Immunzellen. In vitro Versuche erbrachten den Nachweis von gesteigerter Interleukin-2 Sekretion durch T-Lymphozyten nach Gabe von DHEA, wohingegen es zu einer Inhibierung der Interleukin-6 Sekretion kam. Dementgegen wird im Altersprozess ein Abfall von DHEA und Interleukin-2 beobachtet bei gleichzeitigem Anstieg von Interleukin-6.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, in wieweit humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) über Expression und funktionale Aktivität der im DHEA-Downstream-Metabolismus essentiellen Enzyme verfügen und ob es alters- bzw. geschlechtsspezifische Unterschiede gibt.

Die Studie wurde an 8 gesunden jüngeren Frauen sowie 8 gesunden jüngeren und 8 gesunden älteren Männern durchgeführt. Zur Bestimmung der mRNA-Expression der im DHEA-Downstreammetabolismus notwendigen Steroidenzyme in humanen PBMCs wurden qualitative, semiquantitative und quantitative RT-PCR Analysen sowie PBMC-Enzymfunktionsassays durchgeführt. Hierbei wurden PBMCs mit radioaktiv markiertem  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Testosteron,  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Androstendion bzw.  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -DHEA inkubiert, extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie separiert. Die anschließende quantitative Auswertung der Konversionsprodukte erfolgte durch Phosphorimager-Analyse.

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) ausgehend von DHEA über alle notwendigen Steroidenzyme für einen effizienten Downstreammetabolismus zu aktiven Androgenen verfügen.

Dies konnte sowohl durch den qualitativen und quantitativen Nachweis von mRNA der betreffenden Enzyme als auch durch die nachgewiesene Aktivität in PBMC-Enzymfunktionsassays bestätigt werden. Dabei zeigten sich signifikante alters- und geschlechtsspezifische Veränderungen im Androgenmetabolismus.

Insbesondere konnte eine erhöhte 17 $\beta$ -HSD5-Aktivität und -Expression in der älteren männlichen und weiblichen Probandengruppe im Vergleich zur jüngeren männlichen nachgewiesen werden, was sich in signifikant höheren Konversionsraten von DHEA zu Androstenediol und Androstenedion zu Testosteron widerspiegelte. Ebenso konnte eine signifikant erhöhte 5 $\alpha$ -Reduktase-Aktivität in der älteren männlichen Probandengruppe im Vergleich zur jüngeren männlichen aufgezeigt werden. Dementgegen waren die Konversionsraten von DHEA zu Androstenedion via 3 $\beta$ -Aktivität unter den einzelnen Probandengruppen ähnlich.

Die vermehrte Konversion von DHEA zum immunmodulatorisch wirksamen Metabolit Androstendiol sowie von Androstendion zu Testosteron entspricht einer vermehrten Androgenaktivierung. Dieses Hochregulieren könnte einen kompensatorischen Mechanismus der peripheren Zielzelle darstellen, dem sinkenden DHEA-Serumspiegel während des Alterungsprozesses entgegenzuwirken und kann einen endokrinen Hinweis auf eine „Immunseneszenz“ geben (68).

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Allolio B, Arlt W.** DHEA treatment: myth or reality? *Trends Endocrinol Metab.* 13:288–294, 2002.
2. **Arlt W.** Dehydroepiandrosterone and ageing. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 18(3): 363-80, 2004.
3. **Athreya BH, Pletcher J, Zulian F, Weiner DB, Williams WV.** Subset-specific effects of sex hormones and pituitary gonadotropins on human lymphocyte proliferation in vitro. *Clin Immunol Immunopathol.* 66(3): 201-11, 1993.
4. **Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S.** Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 295(11): 1288-99, 2006.
5. **Liu PY, Death AK, Handelsman DJ.** Androgens and cardiovascular disease. *Endocr Rev.* 24(3):313-40, 2003.
6. **Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Weickert MO.** Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. *Clin Res Cardiol.* 95(3): 147, 2006.
7. **Orentreich N, Brind JL, Vogelmann JH, Andres R, Baldwin H.** Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 75:1002–1004, 1992.
8. **Sulcova J, Hill M, Hampf R, Starka L.** Age and sex related differences in serum levels of unconjugated dehydroepiandrosterone and its sulphate in normal subjects. *J Endocrinol.* 154:57– 62, 1997.
9. **Labrie F, Belanger A, Luu-The, Labrie C, Simard J, Cusan L, Gomez JL, Candas B.** DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. *Steroids.* 63(5-6): 322-8, 1998.
10. **Gillis S, Kozak R, Durante M, Weksler ME.** Immunological studies of aging. Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans. *J Clin Invest.* 67:937–942, 1981.

11. **Mysliwska J, Bryl E, Foerster J, Mysliwski A.** Increase of interleukin 6 and decrease of interleukin 2 production during the ageing process are influenced by the health status. *Mech Ageing Dev.* 100:313–328, 1998.
12. **Offner H, Zamora A, Drought H, Matejuk A, Auci DL, Morgan EE, Vandenberg AA, Reading CL.** Asynthetic androstene derivative and a natural androstene metabolite inhibit relapsing-remitting EAE. . *J Neuroimmunol.* 130: 128–139, 2002.
13. **Straub RH, Konecna L, Hrach S, Rothe G, Kreutz M, Scholmerich J, Falk W, Lang B.** Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cell. *J Clin Endo Metab.* 1998.
14. **Dasgupta B, Corkill M, Kirkham B, Gibson T, Panayi G.** Serial estimation of interleukin 6 as a measure of systemic disease in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 19:22–25, 1992.
15. **Czlonkowska A, Ciesielska A, Gromadzka G, Kurkowska-Jastrebska I.** Estrogen and cytokines production – the possible cause of gender differences in neurological diseases. *Curr Pharm Des.* 11(8): 1017-30, 2005.
16. **De Benedetti F, Massa M, Pignatti P, Albani S, Novick D, Martini A.** Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 93:2114 – 2119, 1994.
17. **Fernandez-Real JM, Vayreda M, Casamitjana R, Gonzalez-Huix F, Ricart W.** Circulating granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and serum fatty acid composition in men and women. *Metabolism.* 50(12):1479-83, 2001.
18. **Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W.** Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(3):1154-9, 2001.
19. **Hewison M, Kantorovich V, Liker HR, Van Herle AJ, Cohan P, Zehnder D, Adams JS.** Vitamin D-mediated hypercalcemia in lymphoma: evidence for hormone production by tumor-adjacent macrophages. *J Bone Miner Res.* 18: 579–582, 2003.

20. **Manolagas SC, Jilka RL.** Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 332:305–311, 1995.
21. **Pfeiffer A, Janott J, Mohlig M, Ristow M, Rochlitz H, Busch K, Schatz H, Schifferdecker E.** Circulating tumor necrosis factor alpha is elevated in male but not in female patients with type II diabetes mellitus. *Horm Metab Res.* 29(3):111-4, 1997.
22. **Wood JA, Wood PL, Ryan R, Graff-Radford NR, Pilapil C, Robitaille Y, Quirion R.** Cytokine indices in Alzheimer's temporal cortex: no changes in mature IL-1 or IL-1RA but increases in the associated acute phase proteins IL-6, 2-macroglobulin and C-reactive protein. *Brain Res.* 629:245–252, 1993.
23. **Daynes RA, Dudley DJ, Araneo BA.** Regulation of murine lymphokine production in vivo. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells. *Eur J Immunol.* 20:793– 802, 1990.
24. **Corsini E, Lucchi L, Meroni M, Racchi M, Solerte B, Fioravanti M, Viviani B, Marinovich M, Govoni S, Galli CL.** In vivo dehydroepiandrosterone restores age-associated defects in the protein kinase C signal transduction pathway and related functional responses. *J Immunol.* 168:1753–1758, 2002.
25. **McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O.** Dehydroepiandrosterone modulation of lipopolysaccharide-stimulated monocyte cytotoxicity. *J Immunol.* 156:328 –335, 1996.
26. **Yang BC, Liu CW, Chen YC, Yu CK.** Exogenous dehydroepiandrosterone modified the expression of T helper-related cytokines in NZB/NZW F1 mice. *Immunol Invest.* 27:291–302, 1998.
27. **Gordon CM, LeBoff MS, Glowacki J.** Adrenal and gonadal steroids inhibit IL-6 secretion by human marrow cells. *Cytokine.* 16:178 –186, 2001.
28. **Suzuki T, Suzuki N, Daynes RA, Engleman EG.** Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin Immunol Immunopathol.* 61:202–211, 1991.
29. **Solerte SB, Fioravanti M, Vignati G, Giustina A, Cravello L, Ferrari E.** Dehydroepiandrosterone sulfate enhances natural killer cell cytotoxicity in

humans via locally generated immunoreactive insulin-like growth factor I. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:3260–3267, 1999.

30. **Offner H, Zamora A, Drought H, Matejuk A, Auci DL, Morgan EE, Vandenbark AA, Reading CL.** Asynthetic androstene derivative and a natural androstene metabolite inhibit relapsing-remitting EAE. *J Neuroimmunol.* 130: 128–139, 2002.

31. **Padgett DA, Loria RM.** In vitro potentiation of lymphocyte activation by dehydroepiandrosterone, androstenediol, and androstenetriol. *J Immunol.* 153: 1544–1552, 1994.

32. **Whitnall MH, Elliott TB, Harding RA, Inal CE, Landauer MR, Wilhelmson CL, McKinney L, Miner VL, Jackson 3rd WE, Loria RM, Ledney GD, Seed TM.** Androstenediol stimulates myelopoiesis and enhances resistance to infection in irradiated mice. *Int J Immunopharmacol.* 22:1–14, 2000.

33. **Simard J, Ricketts ML, Moisan AM, Tardy V, Peter M, Van Vliet D, Morel Y.** A new insight into the molecular basis of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Endocr Res.* 26(4): 761-40, 2000.

34. **Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH.** Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev.* 26(4): 525-82, 2005.

35. **Mowszowicz I, Berthaut I, Mestayer C, Wright F, Kutenn F, Mauvais-Jarvis P.** 5-alpha-reductases: physiology and pathology. *Ann Endocrinol.* 56(6): 555-9, 1995.

36. **Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnel JD, Russell DW.** Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *J Clin Invest.* 92(2):903-10, 1993.

37. **Stoffel-Wagner B, Watzka M, Steckelbroeck S, Wickert L, Schramm J, Romalo G, Klingmuller D, Schweikert HU.** Expression of 5alpha-reductase in the human temporal lobe of children and adults. *Clin Endocrinol Metab.* 83(10): 3636-42, 1998.

38. **Thigpen AE, Davis DL, Milatovich A, Mendoca BB, Imperato-McGinley J, Griffin JE, Francke U, Wilson JD, Russell DW.** Molecular genetics of steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *J Clin Invest.* 90(3):799-809, 1992.

39. **Adamski J, Jakob FJ.** A guide to 17-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol.* 171:1– 4, 2001.
40. **Blanchard PG, Luu-The V.** Differential androgen and estrogen substrates specificity in the mouse and primates type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Endocrinol.* 194(2): 449-55, 2007.
41. **Yang SY, He XY, Schulz H.** Multiple functions of type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Trends Edndocrinol Metab.* 16(4): 167-75, 2005.
42. **Villar J, Celay J, Alonso MM, de Miguel C, Migliaccio M, Encio I.** Transcriptional regulation of the human type 8 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene by C/ERBPbeta. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 105(1-5): 131-9, 2007.
43. **Yokoi Y, Horiguchi Y, Araki M, Motojima K.** Regulated expression by PPARalpha and unique localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11 protein in mouse intestine and liver. *FEBS J.* 274(18): 4837-47, 2007.
44. **De Launoit Y, Adamski J.** Unique multifunctional HSD17B4 gene product: 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4 and D-3-hydroxyacylcoenzyme A dehydrogenase/hydratase involved in Zellweger syndrome. *J Mol Endocrinol.* 22(3): 227-40, 1999.
45. **Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendoca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW, Andersson S.** Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet.* 7(1):34-9, 1994.
46. **Jin Y, Penning TM.** Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47: 263-92, 2007.
47. **Jin J, Krishack PA, Cao D.** Role of aldo-keto reductases in development of prostate and beast cancer. *Front Biosci.* 11: 2767-73, 2006.
48. **Moeller G, Adamski J.** Multifunctionality of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol.* 248(1-2): 47-55, 2006.
49. **Penning TM, Jin Y, Heredia VV, Lewis M.** Structure-function relationships in 3alpha- ydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 85(2-5): 247-55, 2003.

50. **Milewich L, Whisenant MG, Sawyer MK.** Androstenedione metabolism by human lymphocytes. *J Steroid Biochem.* 16:81– 85, 1982.
51. **Schmidt M, Kreutz M, Loffler G, Scholmerich J, Straub RH.** Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J Endocrinol.* 164:161–169, 2000.
52. **Zhou Z, Shackleton CH, Pahwa S, White PC, Speiser PW.** Prominent sex steroid metabolism in human lymphocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 138:61–69, 1998.
53. **Quinkler M, Johanssen S, Grossmann C, Bahr V, Muller M, Oelkers W, Diederich S.** Progesterone metabolism in the human kidney and inhibition of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by progesterone and its metabolites. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:41, 1999.
54. **Hammer F, Subtil S, Lux P, Maser-Gluth C, Stewart PM, Allolio B, Arlt W.** No evidence for hepatic conversion of dehydroepiandrosterone (DHES) sulphate to DHEA: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(6): 3600-5, 2005.
55. **Adamski J, Normand T, Leenders F, Monte D, Begue A, Stehelin D, Jungblut PW, de Launoit Y.** Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. *Biochem J.* 311:437– 443, 1995.
56. **V, Luu-The.** Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 76:143–151, 2001.
57. **Penning TM, Jin Y, Heredia VV, Lewis M.** Structure-function relationships in 3alpha- ydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 85(2-5): 247-55, 2003.
58. **Globerson A, Effros RB.** Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today.* 21:515–521, 2000.
59. **Thieringer R, Le Grand CB, Carbin L, Cai TQ, Wong B, Wright SD, Hermanowski-Vosatka A.** 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages. *J Immunol.* 167:30 –35, 2001.

60. **Hewison M, Kantorovich V, Liker HR, Van Herle AJ, Cohan P, Zehnder D, Adams JS.** Vitamin D-mediated hypercalcemia in lymphoma: evidence for hormone production by tumor-adjacent macrophages. *J Bone Miner Res.* 18: 579–582, 2003.
61. **Arlt W, Justl HG, Callies F, Reincke M, Hubler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B.** Oral dehydroepiandrosterone for adrenal androgen replacement: pharmacokinetics and peripheral conversion to androgens and estrogens in young healthy females after dexamethasone suppression. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:1928 –1934, 1998.
62. **Arlt W, Haas J, Callies F, Reincke M, Hübler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B.** Biotransformation of oral dehydroepiandrosterone in elderly men: significant increase in circulating estrogens. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:2170 –2176, 1999.
63. **Arlt W, Hewison M.** Hormones and immune function: implications of aging. *Aging Cell.* 3:209 –216, 2004.
64. **Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Grunfeld C, Feingold K.** Suppression of DHEA sulfotransferase (Sult2A1) during the acute-phase response. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287:731–738, 2004.
65. **Samy TS, Knoferl MW, Zheng R, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH.** Divergent immune responses in male and female mice after trauma-hemorrhage: dimorphic alterations in T lymphocyte steroidogenic enzyme activities. *Endocrinology.* 142:3519 –3529, 2001.
66. **Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, Walker EA, Bland R, Sheppard MC, Hewison M, Stewart PM.** Modulation of 11-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J Bone Miner Res.* 16: 1037–104, 2001.
67. **Gingras S, Moriggi R, Groner B, Simard J.** Induction of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/5-4 isomerase type 1 gene transcription in human breast cancer cell lines and in normal mammary epithelial cells by interleukin-4 and interleukin-13. *Mol Endocrinol.* 13:66 –81, 1999.
68. **Hammer F\*, Drescher DG\*, Schneider SB, Quinkler M, Stewart PM, Allolio B, Arlt W.** Sex steroid metabolism in human peripheral blood mononuclear cells changes with aging. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(11): 6283-9, 2005.

## 7. Anhang

### Veröffentlichungen

1. Gockel I, Moehler M, Frerichs K, Drescher D, Trinh TT, Duenschede F, Borschitz T, Schimanski K, Biesterfeld S, Herzer K, Galle PR, Lang H, Junginger T, Schimanski CC. *Co-expression of receptor tyrosine kinases in esophageal adenocarcinoma and squamous cell cancer*. Oncol Rep. 2008 Oct;20(4):845-50.

2. Wehler TC, Frerichs K, Graf C, Drescher D, Schimanski K, Biesterfeld S, Berger MR, Kanzler S, Junginger T, Galle PR, Moehler M, Gockel I, Schimanski CC. *PDGFRalpha/beta expression correlates with the metastatic behavior of human colorectal cancer: a possible rationale for a molecular targeting strategy*. Oncol Rep. 2008 Mar;19(3):697-704.

3. Drescher D, Moehler M, Gockel I, Frerichs K, Müller A, Dünschede F, Borschitz T, Biesterfeld S, Holtmann M, Wehler T, Teufel A, Herzer K, Fischer T, Berger MR, Junginger T, Galle PR, Schimanski CC. *Coexpression of receptor-tyrosine-kinases in gastric adenocarcinoma--a rationale for a molecular targeting strategy?* World J Gastroenterol. 2007 Jul 14;13(26):3605-9.

4. Gockel I, Schimanski CC, Heinrich C, Wehler T, Frerichs K, Drescher D, von Langsdorff C, Domeyer M, Biesterfeld S, Galle PR, Junginger T, Moehler M. *Expression of chemokine receptor CXCR4 in esophageal squamous cell and adenocarcinoma*. BMC Cancer. 2006 Dec 18;6:290.

5. Hammer F\*, Drescher DG\*, Schneider SB, Quinkler M, Stewart PM, Allolio B, Arlt W. *Sex steroid metabolism in human peripheral blood mononuclear cells changes with aging*. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Nov;90(11):6283-9.

\*F.H. and D.G.D. contributed equally to this study.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AD	5 $\alpha$ -Androstanediol
ADG	Androstanediol-Glucuronid
adr	Nebenniere
ÄMP	ältere männliche Probanden
AS	antisense
AT	Androsteron
BMI	body mass index
bp	base pair
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CYP19	Aromatase
DHEA/DHEAS	Dehydroepiandrosteron/sulfat
DHT	Dihydrotestosteron
$\Delta$ 4dion	Androstendion
$\Delta$ 5diol	Androstenediol
E1	Östron
E2	Östradiol
G	Guanin
$\gamma$ GT	gammaGT
Hb	Hämoglobin
Il-1	Interleukin-1
Il-2	Interleukin-2
Il-6	Interleukin 6
JMP	junge männliche Probanden
n	Anzahl
neg	Negativkontrolle

n.s.	nicht signifikant
p	Signifikanzniveau
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
P450Aro	Aromatase
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
S	sense
s.	signifikant
SGOT	Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
SGPT	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase
STS	Steroidsulfatase
SULTs	Sulfotransferasen
T	Testosteron
TNF	Tumornekrosefaktor
vs	versus
3 $\alpha$ -HSD 1 (AKR1C1)	3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1
3 $\alpha$ -HSD 2 (AKR1C2)	3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dyhydrogenase 2
3 $\alpha$ -HSD 3 (AKR1C3)	3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dyhydrogenase 3
3 $\beta$ -HSD 1 (HSD3B1)	3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dyhydrogenase 1
3 $\beta$ -HSD 2 (HSD3B2)	3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dyhydrogenase 2
17 $\beta$ -HSD 1 (HSD17B1)	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dyhydrogenase 1
17 $\beta$ -HSD 2 (HSD17B2)	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dyhydrogenase 2
17 $\beta$ -HSD 3 (HSD17B3)	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dyhydrogenase 3
17 $\beta$ -HSD 4 (HSD17B4)	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dyhydrogenase 4
17 $\beta$ -HSD 5 (HSD17B5)	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dyhydrogenase 5

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Daniel Georg Drescher  
Geburtsdatum: 04.01.1977  
Geburtsort: Würzburg  
Familienstand: ledig  
Konfession: röm./kath.  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

## SCHULAU SBILDUNG

---

1983 – 1987	Grundschule Estenfeld
1987 – 1996	Riemenschneider Gymnasium Würzburg mit Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

## ZIVILD IENST

---

1996 – 1997	Bayer. Rotes Kreuz, KV-Würzburg
-------------	---------------------------------

## HUMANMEDIZINSTUDIUM: Julius-Maximilian-Universität Würzburg

---

03/1998 – 03/2000	Vorklinik
03/2000	Ärztliche Vorprüfung
03/2001	1. Staatsexamen
08/2003	2. Staatsexamen
11/2004	3. Staatsexamen

## PRAKTISCHES JAHR

---

Chirurgie:	Chirurgische Klinik Würzburg
Innere Medizin:	Medizinische Klinik Würzburg
Orthopädie:	König-Ludwig-Haus Würzburg

---

## DISSERTATION

---

„Untersuchungen zum Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Konversion von DHEA in humanen peripheren mononukleären Blutzellen“

experimentelle Studie bei Doktormutter Prof. Wiebke Arlt  
Endokrinologisches Labor Prof. B. Allolio der Uniklinik Würzburg  
06/2001 – 04/2005: experimentelle Arbeit  
05/2005 – 11/2008: schriftliche Ausarbeitung

## WEITERBILDUNG ZUM FACHARZT

---

Seit 05/2005 beschäftigt als Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Universitätsklinik Mainz