

**Bildung und Stoffwechsel von Dehydroepiandrosteron(-Sulfat) (DHEA(S))  
im menschlichen Temporallappen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Vorgelegt von  
Christian Alexander Nassen  
aus Neuwied  
2006

Angefertigt mit Genehmigung der hohen Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dietrich Klingmüller

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Hans Van der Ven

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.10.2006

Aus dem Institut für Klinische Biochemie  
der Universität Bonn

Komm. Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Lothar Siekmann

## **Widmung**

Meinen Eltern Helga und Ildefons Nassen  
und  
Sofia Hildegard und Alexander Stalescu  
für ihre Geduld und Unterstützung



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Liste der im Text verwendeten Abkürzungen</b> .....	9
<b>2. Einleitung</b> .....	12
2.1. Neurosteroide .....	12
2.2. <i>De novo</i> Biosynthese von Steroidhormonen .....	13
2.3. Das Enzym CYP17 .....	16
2.4. Das Enzym 3 $\beta$ -HSD/KSI .....	16
2.5. Steroid-Sulfatase und Steroid-Sulfotransferase .....	17
2.6. Ziele der Arbeit .....	18
<b>3. Methoden</b> .....	20
3.1. Arbeitsgeräte .....	20
3.2. Computersoftware .....	21
3.3. Materialien .....	21
3.3.1. Chemikalien .....	21
3.3.2. Puffer und Gele .....	23
3.4. Aufreinigung radioaktiv markierter Substanzen .....	24
3.5. Gewebe .....	25
3.5.1. Gewebepreparationen .....	26
3.6. Bestimmung der Enzymaktivitäten .....	27
3.6.1. Inkubation des enzymhaltigen Gewebes .....	27

3.6.1.1. Inkubationen zur Bestimmung der CYP17-Enzymaktivität .....	27
3.6.1.2. Inkubationen zur Bestimmung der 3 $\beta$ -HSD/KSI-Enzymaktivität .....	28
3.6.1.3. Inkubationen zur Bestimmung der SULT2-Enzymaktivität .....	28
3.6.1.4. Inkubationen zur Bestimmung der STS-Enzymaktivität .....	29
3.6.2. Auftrennung der Produkte.....	29
3.6.2.1. Eindimensionale Dünnschichtchromatographie-Analyse .....	29
3.6.2.2. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie-Analyse .....	30
3.6.3. Qualitativer Nachweis und quantitative Berechnung der Produkte mittels Radiodistributionsanalyse (RDA) .....	31
3.7. RNA-Extraktion .....	32
3.8. Reverse Transkription (RT).....	32
3.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	33
3.10. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte .....	35
3.11. Statistische Analysen.....	35
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
4.1. Untersuchung der CYP17-Aktivität und Genexpression im menschlichen Gehirn .....	36
4.1.1. Zweidimensionale DC-Methode zur Auftrennung aller potentiellen Pregnenolon Metabolite .....	36
4.1.2. Fehlende CYP17-Aktivität im menschlichen Temporallappen .....	37
4.1.3. Eindimensionale DC-Methode zur Auftrennung der mittels CYP17 entstandenen Pregnenolon Metabolite .....	39

4.1.4. Untersuchung weiterer Gewebepräparationen und Verlängerung der Inkubationszeit .....	40
4.1.5. Fehlende CYP17-Aktivität im Gehirn der Maus und Ratte .....	43
4.1.6. Fehlende CYP17 mRNA-Expression im menschlichen Temporallappen .....	46
4.2. Untersuchung der 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität und Genexpression im menschlichen Gehirn .....	47
4.2.1. Ausbleibende Metabolisierung von Pregnenolon mittels 3 $\beta$ -HSD/KSI .....	47
4.2.2. Eindimensionale DC-Methode zur Auftrennung der mittels 3 $\beta$ -HSD/KSI entstandenen DHEA Metabolite .....	49
4.2.3. Ausbleibende Metabolisierung von DHEA mittels 3 $\beta$ -HSD/KSI.....	50
4.2.4. Fehlende 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität im Gehirn der Maus und Ratte.....	51
4.2.5. Fehlende 3 $\beta$ -HSD/KSI mRNA-Expression im menschlichen Temporallappen ...	54
4.3. Untersuchung der Steroid-Sulfotransferase (SULT2)-Aktivität und Genexpression im menschlichen Gehirn .....	55
4.3.1. Eindimensionale DC-Methode zur Trennung der Substrate und Metabolite der SULT2 und STS .....	55
4.3.2. Ausbleibende Metabolisierung von Pregnenolon mittels SULT2 .....	57
4.3.3. Ausbleibende Metabolisierung von DHEA mittels SULT2.....	59
4.3.4. Fehlende SULT2A1, SULT2B1a und SULT2B1b mRNA-Expression im menschlichen Temporallappen.....	60
4.4. Untersuchung der Steroid-Sulfatase (STS)-Aktivität und Genexpression im menschlichen Gehirn .....	62
4.4.1. Hohe STS-Aktivität im menschlichem Gehirn .....	62

4.4.2. Charakterisierung der zerebralen STS-Aktivität.....	64
4.4.2.1. pH-Optimum der zerebralen STS-Aktivität.....	64
4.4.2.2. Kinetische Parameter der zerebralen STS.....	65
4.4.2.3. Alters- und geschlechtsspezifische STS-Aktivität in grauer und weißer Substanz des menschlichen Temporallappens .....	66
4.4.3. STS mRNA-Expression im menschlichen Gehirn.....	68
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>69</b>
5.1. Fehlende <i>de novo</i> Biosynthese von DHEA im menschlichen Temporallappen.....	69
5.2. Fehlende <i>de novo</i> Biosynthese von Androgenen, Östrogenen, Mineralo- und Glukokortikoiden im menschlichen Gehirn.....	71
5.3. Fehlende Steroid-Sulfotransferase-Aktivität im menschlichen Temporallappen .....	72
5.4. Die Steroid-Sulfatase weist hohe zerebrale Aktivität auf.....	74
5.5. Der zerebrale Stoffwechsel von DHEA/DHEAS .....	76
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>78</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>88</b>
<b>9. Curriculum vitae .....</b>	<b>89</b>

## 1. Liste der im Text verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
A. dest.	Aqua destilata – destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
<sup>12</sup> C	Kohlenstoffatom
<sup>14</sup> C	Kohlenstoff-Isotop
cDNA	Complementary DNA – Komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CYP17	Cytochrome Peroxidase 450c17; (17-alpha-Hydroxylase/17-20 Lyase)
CYP7B1	Cytochrome Peroxidase 450B1; (Oxysterol-7-alpha-Hydroxylase)
Δ	Delta, hier bezeichnend für Ort der Doppelbindung der Steroide
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonecleinacid - Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxynukleotide
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gravitation/Erdbeschleunigungskraft = 9,81 m/s <sup>2</sup>
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gr	Gramm
<sup>3</sup> H	Tritium
h	Stunde

H <sub>2</sub> O	Wasser
HP	Homogenisationspuffer
17β-HSD	17-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
3β-HSD/KSI	3-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase / Ketosteroid-Isomerase
IKP	Inkubationspuffer
K <sub>m</sub> -Wert	Michaeliskonstante
min	Minute
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
mRNA	messanger Ribonucleinacid – Botschafter Ribonukleinsäuresäure
NAD(H) <sup>+</sup>	Nikotinadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP(H) <sup>+</sup>	Nikotinadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NNR	Nebennierenrinde
NTCP	Na <sup>+</sup> Taurocholate Co-transporting Polypeptide - Natrium-abhängige Taurocholol co-transportierendes Polypeptid
OAT	Organic Anion Transporter - Organischer Anionentransporter
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide – Organische Anionen transportierende Polypeptide
OH	Hydroxy
Oligo(dT)-Primer	Desoxy-Thymin-Primer
P450 <sub>scc</sub>	Cytochrome Peroxidase 450 side chain cleavage; (20-alpha-Hydroxylase / 22-Hydroxylase / 20,22 Desmolase)
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PCR	Polymerase Chain Reaction – Polymerase Kettenreaktion
pmol	Pikomol
RDA	Radiodistributionsanalyse

$R_f$	Ratio front; Quotient aus Laufstrecke einer Substanz zur Laufstrecke der flüssigen Phase (verwendet bei der DC)
RNA	Ribonucleinacid - Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute – Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben
STS	Steroid-Sulfatase
SULT2A1(2B1)	Steroid-Sulfotransferase 2A1 (2B1)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
$v_{max}$	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v:v	Volumen in Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 2. Einleitung

### 2.1. Neurosteroide

In den letzten Jahren sind neuroaktive Steroidhormone vermehrt zum Gegenstand der Gehirnforschung geworden. Neben den klassischen genomischen Wirkungen hat man neue, nicht-genomische Wirkungsweisen der Steroidhormone gefunden, die die Hirnaktivität modulieren [Majewska et al. 1986]. Unter anderem spielen Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) dabei eine große Rolle. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass nach Entfernung aller Steroidhormon bildenden Drüsen, die zerebrale Konzentration von DHEA konstant blieb [Baulieu und Robel 1990]. Dies führte zu der Vermutung, dass das Gehirn selbst zur *de novo* Biosynthese von Steroidhormonen (so genannte Neurosteroide) befähigt ist. Da Steroidhormone wichtige neuroprotektive, neuroregenerative und neuromodulatorische Funktionen ausüben, sind Kenntnisse über den zerebralen Stoffwechsel von Steroidhormonen und ihre zerebralen Biosynthese für das Verständnis dieser Wirkung von großer Bedeutung. [Birge 1997; Herbert 1998; Wise 2000; Polleri et al. 2002]. Erste Arbeiten zeigten bereits vor 30 Jahren, dass Androgene und Progestagene in fötalem menschlichen Gehirn verstoffwechselt werden [Naftolin et al. 1971; Schindler 1976]. Seitdem wurde insbesondere der Androgen-Stoffwechsel in adultem menschlichen Gehirn genauer charakterisiert [Steckelbroeck et al. 1999b; Steckelbroeck et al. 2001; Steckelbroeck et al. 2002]. Bisher fehlen aber fundamentale Kenntnisse über die Expression der Schlüsselenzyme der *de novo* Steroidhormonbiosynthese aus Cholesterin im menschlichen Gehirn.

Die Nebennierenrinde des Menschen und einiger höherer Primaten sezerniert große Mengen DHEAS, weswegen im Blut des Menschen eine ungewöhnlich hohe Konzentration von DHEAS vorkommt [Cutler et al. 1978, Guazzo et al. 1996]. Dies ist ein unter den Säugetieren einzigartiges Phänomen. Es stellt sich daher die Frage, ob das Gehirn die Steroidhormone *de novo* produziert und/oder ob es diese vom aufgenommenen DHEAS metabolisiert.

Man nimmt an, dass Steroide aufgrund ihrer Größe und Lipophilie frei durch Zellmembranen diffundieren können. Bei DHEAS handelt es sich jedoch um einen Steroid-Sulfatester, der ähnlich den Membranbausteinen durch die (negativ geladene) Sulfatgruppe einen hydrophilen Anteil besitzt und somit also amphiphilen Charakter aufweist und nicht einfach durch die Doppel-Phospholipidschicht diffundieren kann. Um ins Gehirn aufgenommen zu

werden, muss DHEAS die aus Membranen aufgebaute Blut-Hirn-Schranke (BHS), überwinden. Für den Transport von organischen Anionen gibt es spezielle, in die Membranen integrierte Carrier-Proteine [Hagenbuch et al. 2002]. Es gibt drei Proteinfamilien, die möglicherweise für den Transport von DHEAS in Betracht kommen [Hagenbuch und Meier 2003; Kullak-Ublick et al. 2000; Sekine et al. 2000; Ugele et al. 2003]:

1. Na<sup>+</sup>-abhängige Na<sup>+</sup>-Taurocholat co-transportierende Polypeptide (NTCPs)
2. Na<sup>+</sup>-unabhängige organische Anionen transportierende Polypeptide (OATPs)
3. Na<sup>+</sup>-unabhängige organische Anionentransporter (OAT)

Im menschlichen Temporallappen konnte die Expression der den Transport von DHEAS katalysierenden Proteine OATP-A, OATP-B, OATP-D und OATP-E mittels real time RT-PCR-Untersuchungen gezeigt werden [Steckelbroeck et al. 2004]. Ebenfalls gelang der immunhistochemische Nachweis von OATP-A in menschlichen Gehirnkapillaren [Gao et al. 2000]. Es ist also zu vermuten, dass DHEAS vom menschlichen Gehirn aus der Zirkulation aufgenommen wird.

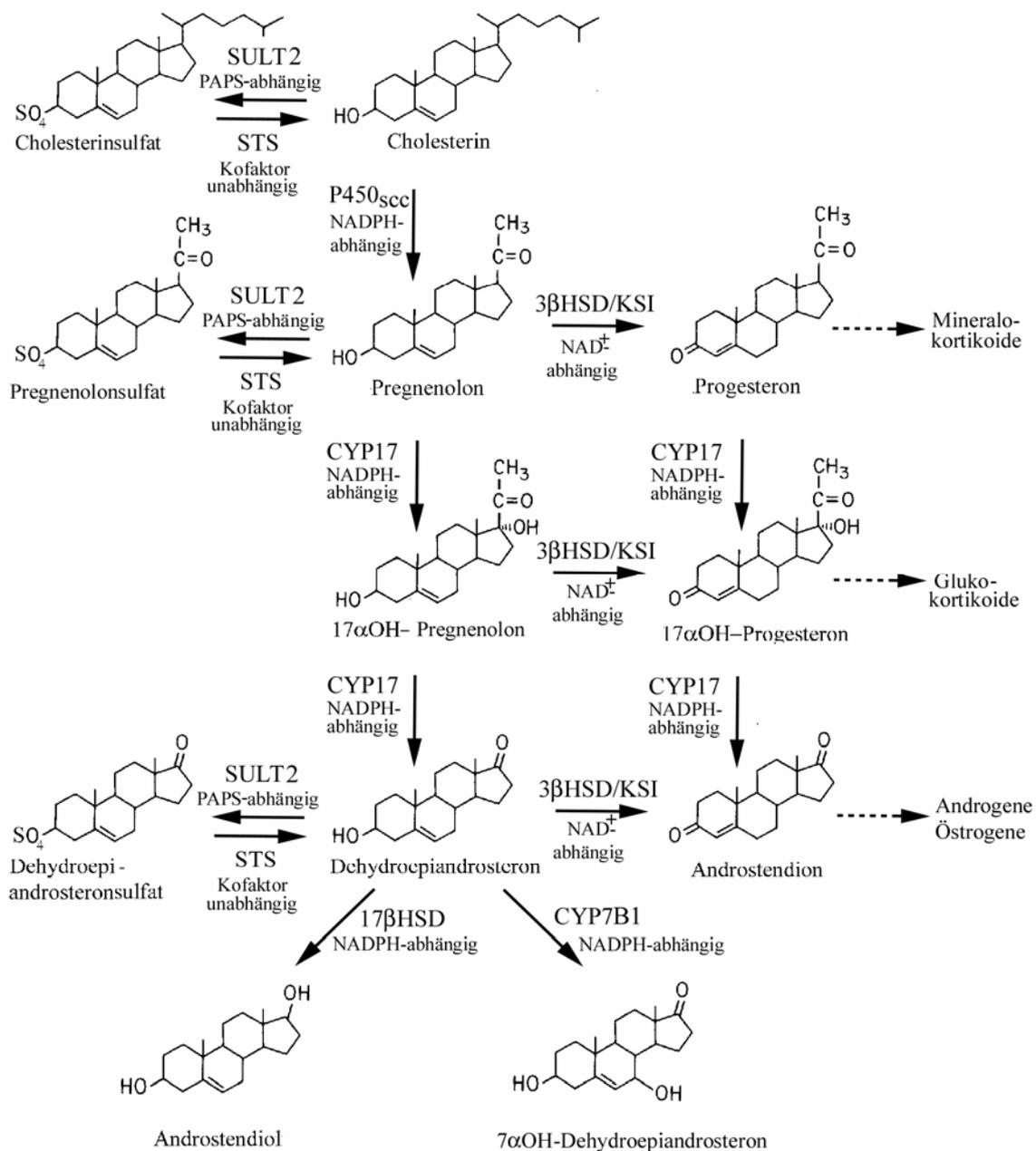
Es stellt sich die Frage, ob es dort für die Biosynthese von neuroaktiven Steroiden verwendet wird. Neben der zerebralen Biosynthese von Androgenen und/oder Östrogenen liegt eine weitere mögliche Bedeutung einer potentiellen zerebralen Aufnahme von DHEAS in der Umwandlung in immunaktive Steroide mittels Steroid-Sulfatase (STS), Oxysterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7B1) und 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) Aktivität. Ein ausgeprägter Metabolismus von DHEA im menschlichen Gehirn via CYP7B1 und 17 $\beta$ -HSD-Aktivität konnte bereits nachgewiesen werden [Steckelbroeck et al. 2002].

## **2.2. *De novo* Biosynthese von Steroidhormonen**

Für eine zerebrale *de novo* Biosynthese der Steroidhormone, müssen dort wichtige Schlüsselenzyme exprimiert sein. Essentiell für die Bildung von Steroidhormonen sind die Enzyme Cytochrom Peroxidase 450 side chain cleavage (P450scc), Cytochrom Peroxidase 450c17 (CYP17) und 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Ketosteroid-Isomerase (3 $\beta$ -HSD/KSI). Ohne die Aktivität dieser Enzyme, können keine Androgene, Östrogene, Mineralo- und Glukokortikoide aus Cholesterin synthetisiert werden (Siehe Abb.1). Die mRNA-Expression der

P450scc wurde bereits im menschlichen Gehirn nachgewiesen [Beyenburg et al. 1999], was für eine zerebrale Umwandlung von Cholesterin und Pregnenolon spricht. Um zu klären, ob das Gehirn in der Lage ist Steroidhormone aus Pregnenolon zu bilden, musste also die Expression und Aktivität der CYP17 und 3 $\beta$ -HSD/KSI untersucht werden.

Neben der zerebralen Neusynthese könnten Androgene und Östrogene auch durch zerebrale Aufnahme von zirkulierendem DHEAS und anschließender enzymatischer Umwandlung entstehen. Um diesen Steroid-Sulfatester zu DHEA umzuwandeln benötigt die zerebrale Zielzelle die Steroid-Sulfatase. Durch weitere Metabolisierung von entstehendem DHEA mittels 3 $\beta$ -HSD/KSI entsteht das Androgen Androstendion. Dies kann dann durch weitere Metabolisierungsschritte in aktive Androgene und Östrogene umgewandelt werden (5 $\alpha$ -Reduktase, Aromatase und 17 $\beta$ -HSD-Aktivität). Im menschlichen Gehirn konnte bereits die zerebrale mRNA-Expression und Enzymaktivität dieser letztgenannten Enzyme nachgewiesen werden [Steckelbroeck et al. 1999a; Steckelbroeck et al. 2001; Steckelbroeck et al. 2002]. Ein weiterer wichtiger Prozess der Kontrolle des DHEAS-Metabolismus ist die Regelung des DHEA/DHEAS Verhältnisses via STS und Steroid-Sulfotransferase (SULT2)-Aktivität. Aus diesem Grund war neben der Untersuchung der zerebralen Expression der STS auch die Untersuchung der SULT2 von Interesse.



**Abb.1 Schlüsselenzyme der Steroidhormonsynthese mit zugehörigen Kosubstraten:**

22 $\alpha$ -Hydroxylase/20-Hydroxylase/22,20-Desmolase, P450<sub>scc</sub>; 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Desmolase, CYP17; Oxysterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase, CYP7B1; 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Ketoisomerase, 3 $\beta$ -HSD/KSI; 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, 17 $\beta$ -HSD; Steroid-Sulfotransferase, SULT2; Steroid-Sulfatase, STS; Nikotinadenindinukleotid oxidierte Form, NAD<sup>+</sup>; Nikotinadenin-dinukleotidphosphat reduzierte Form, NADPH; Phosphoadenosinphosphosulfat, PAPS.

### 2.3. Das Enzym CYP17

Das Enzym CYP17 ist eines der Schlüsselenzyme der Steroidhormonsynthese. Es katalysiert irreversibel die Abspaltung der verbliebenen Seitenkette des Sterangerüsts von Pregnenolon und Progesteron an  $^{12}\text{C}$ -17. Die Reaktion verläuft in zwei Schritten. Als Zwischenprodukt entsteht  $17\alpha\text{OH}$ -Pregnenolon (bzw.  $17\alpha\text{OH}$ -Progesteron), welches weiter zu DHEA (bzw. Androstendion) umgewandelt wird [Miller 1998]. Das bevorzugte *in vitro* Kosubstrat der CYP17 ist die reduzierte Form des Nikotinadenin dinukleotidphosphats (NADPH).

Die CYP17 wird vor allem in der Nebennierenrinde und den Gonaden des Menschen exprimiert und ist essentiell für die Bildung von Androgenen und Östrogenen in den genannten Drüsen. Es existieren einige tierexperimentelle Studien, die außerdem eine Expression des Enzyms CYP17 in verschiedenen Regionen des Gehirns der Ratte zeigen [Hu et al. 1987; Mellon und Deschepper 1993; Sanne und Krueger 1995a; Strömstedt und Waterman 1995; Tsutsui et al. 2000; Zwain und Yen 1999]. Für die Existenz der CYP17 im menschlichen Zentralen Nervensystem (ZNS) gibt es bisher keinen Nachweis.

### 2.4. Das Enzym $3\beta$ -HSD/KSI

Das Enzym  $3\beta$ -HSD/KSI wandelt  $\Delta^5$ -3-Hydroxysteroiden zu  $\Delta^4$ -3-Ketosteroiden um. Die Reaktion verläuft in zwei Schritten. Zunächst wird die an  $^{12}\text{C}$ -3 und  $\beta$ -Stellung befindliche Hydroxygruppe dehydrogeniert. Dann wird die Doppelbindung von  $^{12}\text{C}$ -5 nach  $^{12}\text{C}$ -4 verschoben. Als Kosubstrate für die  $3\beta$ HSD/KSI kommen Nikotinadenin dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) und Nikotinadenin dinukleotidphosphat ( $\text{NADP}^+$ ) in Frage. Das bevorzugte Kosubstrat *in vitro* ist jedoch  $\text{NAD}^+$ .

Im Gegensatz zu den meisten anderen Dehydrogenasen verläuft die Reaktion irreversibel. Dieses Enzym wandelt verschiedene  $3\beta$ -Hydroxysteroiden um [Samuels et al. 1951] und ist unerlässlich für die Produktion aller Steroidhormone (Androgene, Östrogene, Mineralo- und Glukokortikoide). Es gibt zwei bekannte Isoenzyme des Menschen: 3HSDB1 und 3HSDB2, die sich in ihrer Aminosäuresequenz nur geringfügig unterscheiden. Die 3HSDB1 wurde hauptsächlich in Plazenta und peripherem Gewebe nachgewiesen. Das Isoenzym 3HSDB2 hingegen befindet sich in der Nebennierenrinde und den Gonaden [Stalvey et al. 1987].

Die tierexperimentellen Untersuchungen der zerebralen Expression der  $3\beta$ -HSD/KSI weisen widersprüchliche Ergebnisse auf. Die Aktivität des Enzyms konnte in fast allen

untersuchten Geweben von Rhesusaffen nachgewiesen werden, fehlte jedoch in deren Gehirn [Martel et al. 1994]. Andere Arbeiten beschreiben Genexpression und Enzymaktivität in tierischen Gehirnen [Mellon und Deschepper 1993; Tsutsui et al. 2000; Zwain und Yen 1999]. Es existieren keine Arbeiten, die die Expression oder Aktivität der 3 $\beta$ -HSD/KSI im menschlichen Gehirn untersuchen.

## 2.5. Steroid-Sulfatase und Steroid-Sulfotransferase

Um die Sulfatgruppe von sulfokonjugierten Steroidhormonen abzuspalten, benötigt die Zelle das membrangebundene Enzym Steroid-Sulfatase. Sulfokonjugierte 3-Hydroxysteroidhormone, wie z.B. DHEAS, Pregnenolonsulfat und Östrogensulfat werden durch die Desulfatierung in 3-Hydroxysteroidhormone umgewandelt [Shapiro 1985]. Diese stehen dann weiteren Stoffwechselfvorgängen zur Verfügung.

Die STS wird in den verschiedensten menschlichen Geweben exprimiert [Hernandez-Martin et al. 1999]. Periphere Gewebe können also sulfatierte Steroidhormone (wie z.B. DHEAS) aus der Zirkulation aufnehmen und mittels der STS zu aktiven Steroidhormonen umwandeln. Es sind keine weiteren Enzyme im menschlichen Körper bekannt, die diese Reaktion katalysieren können.

Die zerebrale Aktivität der STS wurde an einigen menschlichen Autopsiepräparaten nachgewiesen [Eto et al. 1974]. Eine eindeutige Untersuchung der Expression, Aktivität und Charakteristika der zerebralen STS beim Menschen fehlte bis dato.

Falls das menschliche Gehirn DHEAS aus der Zirkulation aufnehmen sollte und zur lokalen Biosynthese von neuroaktiven Steroiden nutzt, stellt sich die Frage, ob es außerdem ein System zur Regulation des DHEA/DHEAS Verhältnisses gibt.

Zytosolische Sulfotransferasen sind Enzyme, die auf ihr Substrat eine Sulfatgruppe übertragen. Somit entsteht z.B. am Ring A des Steroids ein polarer Anteil mit lipophilem Rest. Dadurch erhöht sich die Wasserlöslichkeit der entstehenden Produkte. Die Enzyme benötigen zur Übertragung der Sulfatgruppe den Substratgruppendonator 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) als Kosubstrat [Falany et al. 1995].

Es sind mehrere Gruppen von Sulfotransferasen bekannt, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. Die Sulfatierung an der 3-Hydroxygruppe der  $\Delta^5$ -Steroidhormone, werden von der DHEA- (SULT2A1), Pregnenolon- (SULT2B1a) und

Cholesterin-Sulfotransferase (SULT2B1b) katalysiert. Die ebenfalls bekannten Östrogen-Sulfotransferasen, die für die Konjugation von Östrogenen relevant sind, katalysieren die Sulfatierung von  $\Delta^5$ -3-Hydroxysteroidhormonen nur unzureichend und wurden daher in dieser Arbeit nicht untersucht.

Bekannt ist die Expression der SULT2A1 in Nebennierenrinde und Leber [Falany et al. 1995]. In der Nebennierenrinde wird sie zur Sulfatierung von DHEA benötigt. Das entstehende DHEAS wird ins Blut abgegeben. In der Leber wird sie zur Phase II Konjugation von Steroiden gebraucht. Die durch alternatives *Splicen* entstehenden Isoenzyme SULT2B1a und SULT2B1b werden in Plazenta, Ovarien und Uterus exprimiert [Meloche und Falany 2001; Geese und Raftogianis 2001]. In diesen Geweben werden ebenfalls dort synthetisierte Steroidhormone sulfatiert um eine bessere Blut-Löslichkeit zu erhalten.

Das Vorkommen der SULT2A1 und der SULT2B1 wurde in verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns mittels Northern-Blot Analyse gezeigt [Shimizu und Tamura 2002]. Die zerebrale SULT2-Enzymaktivität wurde beim Menschen bisher nicht gemessen und das Enzym nicht charakterisiert.

## 2.6. Ziele der Arbeit

Die hier vorliegende Arbeit sollte klären, ob es im menschlichen Gehirn zu einer *de novo* Synthese von Steroidhormonen (Neurosteroide) kommt. Da die Expression des Enzyms P450sc im menschlichen Gehirn bereits nachgewiesen werden konnte, wurde in dieser Arbeit die weitere Metabolisierung von Pregnenolon (als Vorläufer aller Steroidhormone) untersucht (Abb. 1).

In menschlichem Temporallappen Biopsaten und Gehirngewebe von Ratten und Mäusen, wurden die Genexpression und Aktivität von folgenden wichtigen Schlüsselenzymen gemessen:

1. CYP17, da seine Expression für die zerebrale Bildung von Androgenen und Östrogenen aus Pregnenolon unbedingt notwendig ist und somit eine Grundvoraussetzung für die *de novo* Biosynthese von Steroidhormonen darstellt.
2.  $3\beta$ -HSD/KSI, da die Expression dieses Enzyms unabdingbar für die Biosynthese aller Steroidhormone aus Cholesterin ist.

3. Steroid-Sulfatase und Steroid-Sulfotransferase, um eine alternative Möglichkeit der zerebralen Bildung von aktiven Androgenen/Östrogenen zu untersuchen. Zudem sind beide Enzyme für die enzymkinetische Regulation des Verhältnisses von DHEA/DHEAS von großer Bedeutung.

### 3. Methoden

#### 3.1. Arbeitsgeräte

Automatischer linearer Dünnschichtchromatographie-Analysator (Tracemaster 20 [LB 285] mit eindimensionalem Multi-Isotopen-Meßkopf für hohe Auflösung [LB 2821-HR] zur Computer unterstützten Auswertung (CHROMA 1D bzw. CHROMA 2D) ein- bzw. zweidimensionaler Dünnschichtchromatographien von Substanzen, die mit  $\beta$ -Strahlern markiert sind (EG&G Berthold, Wildbad, Bundesrepublik Deutschland)

pH-Meter (Portatest 655, Berlin, Deutschland)

Teflon-Glas Homogenisator (Potter S, B. Braun, Melsungen, Deutschland)

Ultraschall Homogenisator (Labsonic 2000, B. Braun)

Schüttelwasserbad, GFL 1083 (Ges. f. Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)

Spektralphotometer (Ultrascope 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)

Flüssigkeits-Szintillationszähler (Wallac 1409, Wallac, Turku, Finnland)

Zentrifuge (Z 382 K, Hermle Ag, Gosheim, Deutschland)

ABI 7700 Instrument (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

392/4 DNA-Synthesizer (Applied Biosystems)

### 3.2. Computersoftware

Die schriftliche Erstellung dieser Arbeit erfolgte mit Microsoft® Word 2002, die tabellarische Datenverarbeitung mit Microsoft® Excel 2002. Zur graphischen Darstellung wurde Fig.P® für Windows (Biosoft, Cambridge, UK) verwendet. Die Bilddateien wurden mit Adobe® Photoshop® 5.0 bearbeitet.

### 3.3. Materialien

#### 3.3.1. Chemikalien

Aceton zur Synthese	Merck, Darmstadt, Deutschland
Adenosin 3'-Phosphat 5'-Phosphosulfat	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Androst-5-en-3,17-diol	SIGMA®
Androst-4-en-3,17-dion	SIGMA®
Anisaldehyd, zur Synthese	Merck
Chloroform	Merck
Citrat	SIGMA®
Cyclohexan, p.A.	Merck
DC-Glasplatte (beschichtet mit einer 0.25 mm starken Kieselschicht 60 F <sub>254</sub> ; 20x20 cm)	Merck
Dehydroandrosteron	SIGMA®
[14- <sup>14</sup> C]-Dehydroandrosteron	PerkinElmer Life Sciences Zaventem, Belgien
Dehydroandrosteron-Sulfat	SIGMA®
[1,2,6,7- <sup>3</sup> H]-Dehydroandrosteron-Sulfat	PerkinElmer Life Sciences
Desoxynukleotide (dNTPs)	Roche, Molecular Biochemicals Mannheim, Deutschland
Dextran T 70	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Dichlormethan, LiChrosolv®	Merck
Diethylether, p.A.	Merck

5 $\alpha$ -Dihydroprogesteron	SIGMA <sup>®</sup>
Dithioerythritol	Merck
Dithiothreitol	Roche
DNA-Längenstandard	Roche
DNase I (RNase-frei)	Roche
DNase-Puffer	Roche
Einmal-Mikropipetten, 10 $\mu$ l mit Ringmarke	Blaubrand <sup>®</sup> , Wertheim, Deutschland
Essigsäure, 100% p.A.	Merck
Ethanol, LiChrosolv <sup>®</sup>	Merck
Ethidiumbromid	SIGMA <sup>®</sup>
Ethylacetat, LiChrosolv <sup>®</sup>	Merck
Ethylen-Diamin-Tetraacetat [EDTA],	SIGMA <sup>®</sup>
Glucose-6-Phosphat	Merck
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Merck
17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon	SIGMA <sup>®</sup>
20 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon	SIGMA <sup>®</sup>
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	SIGMA <sup>®</sup>
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.A.	Merck
Methanol, Lichrosolv <sup>®</sup>	Merck
n-Butanol, Lichrosolv <sup>®</sup>	Merck
Natronlauge 2,0 N	Merck
$\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid [NAD <sup>+</sup> , oxidierte Form]	Boehringer, Mannheim, Deutschland
$\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat [NADPH + H <sup>+</sup> , reduzierte Form]	Boehringer
PCR-System (expanded long template)	Roche
Polygram <sup>®</sup> Sil G, 0,25 mm Kieselgelfolien,	Machery & Nagel, England
Pregnenolon	SIGMA <sup>®</sup>
[7- <sup>3</sup> H]-Pregnenolon	PerkinElmer
Pregnenolonsulfat	SIGMA <sup>®</sup>
Progesteron	SIGMA <sup>®</sup>

Pufferlösung, Borsäure/Kaliumchlorid/ Natriumlauge (blau)	Merck
Pufferlösung, Citrat-Salzsäure (rot)	Merck
Pufferlösung, Phosphat (grün)	Merck
Schwefelsäure, 95-97% p.A.	Merck
Superscript II <sup>TM</sup> -Kit	Invitrogen GmbH Karlsruhe, Deutschland
Szintillationsfläschchen, 5 ml und 20 ml	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	Roche
Testosteron	SIGMA <sup>®</sup>
Trispuffer Hydrochlorid	SIGMA <sup>®</sup>
Trizma $\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl) methylamin	SIGMA <sup>®</sup>
Trizol LS Reagenz	Invitrogen GmbH
Ultima Gold <sup>®</sup> Szintillationsflüssigkeit	Packard Instruments, Groningen, Niederlande
Vakutainer <sup>®</sup>	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Whatman <sup>®</sup> -DC-Platte	Whatman, England

### 3.3.2. Puffer und Gele

Für die Gewebepräparationen wurde ein niedrigmolarer Homogenisationspuffer (HP; 10 mM Trizma<sup>TM</sup>-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,5) verwendet. Mit diesem Puffer wurde der pH-Wert während der Homogenisation eingestellt.

Für die Reaktion wurden gleiche Mengen eines hochmolekularen Inkubationspuffers (IKP; 160 mM Trizma<sup>TM</sup>-Citrat, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH-Werte 7,5 bzw. 8,0) dazugegeben. Mit diesem Puffer wurde der pH-Wert während der Inkubation kontrolliert.

50fach konzentrierter Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) wurde aus 242 gr Trispuffer, 57,1 ml Eisessig und 100 ml 0,5 M EDTA hergestellt. Um den einfach konzentrierten Puffer zu erhalten, wurde er mit A. dest. verdünnt. Es resultierte ein Puffer mit dem pH-Wert 8. TAE-Puffer wurden zur Gelherstellung und bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte verwendet.

Die PCR-Produkte wurden in 2%igem Agarosegel (2 gr Agarose in 100 ml TAE-Puffer) aufgetrennt. Für die Fluoreszenzfärbung der PCR-Produkte enthielt das Agarosegel 5  $\mu$ l Ethidiumbromid.

### **3.4. Aufreinigung radioaktiv markierter Substanzen**

Der Reinheitsgrad der gelieferten radioaktiv markierten Substanzen lag unter 95%. Deswegen war zunächst eine Aufreinigung der Substanzen mittels DC erforderlich.

Die in Ethanol gelösten Substanzen wurden im Stickstoff-Fluss evaporiert, in 250  $\mu$ l Chloroform zurückgelöst und mit einer Mikropipette strichförmig in einer Breite von 2 cm mittig auf eine 20 x 20 DC-Glasplatte, 2 cm vom unteren Rand entfernt, aufgetragen. Danach folgte die chromatographische Auftrennung in Dichlormethan:Aceton (9:1; v:v) als Fließmittel. Es wurde wie bei allen durchgeführten DC darauf geachtet, dass innerhalb der Trennkammern kein Temperaturgradient durch z.B. Sonneneinstrahlung entstand. Die Kammern waren vor und während der Chromatographie stets mit Laufmittel abgesättigt, es wurden deswegen auch immer zwei DC-Platten bzw. DC-Folien entwickelt. Vor der eigentlichen Trennung wurden die Platten zweimal bis 1 cm über den Auftragungsort vorentwickelt, um die bei der Auftragung entstandenen Ringchromatographien zu korrigieren.

Die Chromatographie erfolgte bis 0,5 cm unter den oberen Rand der DC-Platte. Zur Auswertung wurde eine lineare DC-Analyse (Radiodistributionsanalyse) mittels eines automatischen linearen DC-Analysators durchgeführt. Die sich auf der DC-Platte befindlichen radioaktiv markierten Steroide senden  $\beta$ -Strahlen aus, welche von dem DC-Analysator erfasst werden. Mit dieser Methode konnten die Positionen von reinem Steroid bzw. (ebenfalls radioaktiv markierten) Verunreinigungen bestimmt werden. Das Kieselgel an der Stelle der DC-Platte, an welcher sich das Steroid befand, wurde ausgekratzt. Danach wurde das Steroid durch aufeinander folgende Gabe von Methanol, Ethanol und Chloroform aus dem Kieselgel eluiert. In einem Stickstoffstrom wurde das Eluat dann getrocknet und anschließend in 10 ml Sauerstoff-freiem Ethanol zurück gelöst (Steroid-Stammlösung).

### 3.5. Gewebe

Das zur Verfügung stehende Hirngewebe stammte von an Temporallappenepilepsie leidenden Patienten, die sich in der neurochirurgischen Klinik der Universität Bonn einer Teilresektion ihres Temporallappens unterzogen hatten. Intraoperativ entnommenes Hirngewebe wurde nach der Entnahme bei 4°C nach makroskopischen Gesichtspunkten in graue und weiße Substanz getrennt. Ebenfalls wurde darauf geachtet, dass Blutgefäße, intraoperativ entstandene Blutkoagel und die weiche Hirnhaut (Pia mater) entfernt wurden. Danach wurde das Gewebe portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur endgültigen Verwertung erfolgte die Aufbewahrung in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter (Dewar).

Für die Versuche wurden nur Gewebstücke verwendet, die von der Neuropathologie als mikro- und makroskopisch unauffällig beurteilt worden waren, also keine Anzeichen eines Entzündungsgeschehens, Nekrosen oder Neoplasien aufwiesen.

Darüber hinaus wurden in den verschiedenen Versuchen weitere menschliche Biopsien als Kontrollgewebe verwendet: Nebennierenrinde (NNR) von einem 51 Jahre alten Mann, der sich einer Adrenektomie wegen eines Nebennierenadenoms unterziehen musste und Plazentagewebe einer 28 Jahre alten Frau, die per Sectio Caesarea entbunden hatte.

Für weitere Versuche wurde Großhirngewebe von Ratten (Wistar) und Mäusen (C-57BL/6) verwendet. Die Tiere wurden im Rahmen von elektrophysischen Untersuchungen der Arbeitsgruppen Prof. Dr. Steinheuser und Dr. Dietrich getötet. Das Hirngewebe dieser Tiere wurde für elektrophysiologische Untersuchungen in diesen Arbeitsgruppen entnommen. Das in den hier vorgestellten Versuchen verwendete Gewebe wäre ansonsten vernichtet worden. Die Gehirne der Tiere wurden rasch entnommen, auf Eis präpariert, in flüssigem Nitrogen tiefgefroren und die in dieser Arbeit verwendeten Gewebestücke bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden und Untersuchungen wurden von der örtlichen Ethikkommission geprüft und für unbedenklich erklärt. Die Patienten, bzw. ihre Erziehungsberechtigten wurden über die Untersuchungen informiert, sowie ihr Einverständnis eingeholt.

### 3.5.1. Gewebepräparationen

Für die enzymkinetischen Untersuchungen wurden Homogenate der verschiedenen Gewebe hergestellt. 200-400 mg Hirngewebe und 1 ml eiskalter HP wurden in ein Teflonglas des Homogenisators gegeben. Die Homogenisierung erfolgte bei 4°C durch 3x10 Auf- und Abbewegungen bei 1000 rpm des Teflon-Stempels. Zum besseren Aufschluss des Gewebes wurde es anschließend mit Ultraschall bei 4°C, 3x10 sec bei 50 Watt behandelt.

Die Herstellung der Homogenate der anderen Gewebe geschah analog zu dieser Prozedur, jedoch wurden bei der NNR 5 mg und bei der Plazenta 10 mg pro 1 ml Homogenisationspuffer verwendet.

Die so entstandenen Gesamthomogenate wurden entweder als solche bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren oder aber durch Zentrifugation in die Zellfraktionen aufgetrennt. Um einen „zellfreien Überstand“ zu gewinnen, wurde das Gewebe bei 800 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die schweren Zellfragmente wie Kerne und größere Membranstücke befanden sich im Sediment, Mikrosomen und Zytosol im Überstand. Nach Abnahme des (zellfreien) Überstandes wurde das Sediment in 2 ml HP resuspendiert, erneut bei 800 g und 4°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Die so erhaltene Kernfraktion wurde in HP resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Für die Gewinnung von Zytosol wurde der zellfreie Überstand erneut bei 100 000 g und 4°C für 1 h zentrifugiert. Der das Zytosol enthaltene Überstand wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Das die Membranfraktion enthaltene Sediment wurde zweimal mit HP gewaschen, dann in HP resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

Die Proteinbestimmung in diesen Proben erfolgte nach Lowry [Lowry et al. 1951].

### 3.6. Bestimmung der Enzymaktivitäten

#### 3.6.1. Inkubation des enzymhaltigen Gewebes

##### 3.6.1.1. Inkubationen zur Bestimmung der CYP17-Enzymaktivität

Die Messung der *in vitro* Aktivität der CYP17 in Gewebehomogenaten wurde mit [7-<sup>3</sup>H]-Pregnenolon als Substrat durchgeführt. Als Kosubstrat der CYP17 wurde NADPH verwendet.

Zunächst wurde die entsprechende Menge des Steroidsubstrates der ethanolischen Stammlösung evaporiert, in Methanol rückgelöst und dann im Inkubationspuffer (pH 7,5) suspendiert. Die finale Konzentration des Methanols im Inkubationsansatz betrug 1,5%. Die finale Pregnenolon-Konzentration betrug 0,2 µM. Um eine vollständige Suspension des Substrates im IKP zu erhalten, wurde das Gemisch 1h lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Alle Versuche wurden in Doppel-, bzw. Dreifachbestimmung durchgeführt. Jeder Inkubationsansatz enthielt 50 µl des Gewebehomogenates (bzw. der Zellfraktionen), bzw. 50 µl HP für den Leerwert, 100 µl IKP mit darin gelöstem Substrat und 50 µl HP mit darin gelöstem Kosubstrat. Die finale Konzentration des Kosubstrates betrug 3 mM. Die Messungen erfolgten bei pH 7,5. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Kosubstrates gestartet und die Inkubation erfolgte bei 37°C sowie einer Schüttelfrequenz von 40mal pro Minute. Die Hirngewebe-Präparationen wurden je nach Versuch zwischen 60 und 240 min, die NNR-Präparationen für 30 min inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl eiskaltem H<sub>2</sub>O und 2 ml eiskaltem Diethylether gestoppt. Es folgte 5minütiges Aufschütteln mit anschließender 10minütiger Zentrifugation bei 2500 U/min und 4°C. Nach Entnahme der Diethylether-Oberphase in ein neues Reagenzglas wurden zusätzlich 2 ml Chloroform zur verbliebenen Wasserphase gegeben. Nach erneutem Schütteln und Zentrifugation (s.o.), wurde die entstandene Chloroform-Unterphase entnommen und mit der organischen Diethylether-Phase vereint. Nach der Extraktion der Steroide aus dem Reaktionsgemisch, wurde das organische Extrakt mittels eindimensionaler, bzw. zweidimensionaler DC-Analyse untersucht.

### 3.6.1.2. Inkubationen zur Bestimmung der 3 $\beta$ -HSD/KSI-Enzymaktivität

Die *in vitro* Enzymaktivität der 3 $\beta$ -HSD/KSI in Gewebehomogenaten wurde mit [4-<sup>14</sup>C]-DHEA und [7-<sup>3</sup>H]-Pregnenolon als Substrate bestimmt. Als Kosubstrat für die Messung der 3 $\beta$ -HSD/KSI wurde NAD<sup>+</sup> verwendet.

Die radioaktiven Substrate wurden wie unter 3.6.1.1. beschrieben evaporiert und in IKP suspendiert. Die finale Konzentration des Pregnenolons im Inkubationsansatz betrug 0,2  $\mu$ M, die des DHEA betrug 2  $\mu$ M. Die finale Konzentration des im HP gelösten Kosubstrat NAD<sup>+</sup> betrug 3 mM. Die Inkubation erfolgte wie unter 3.6.1.1. beschrieben und wurde schließlich durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Chloroform:Methanol (2:1;v:v) terminiert. Nach 5minütigem Aufschütteln und 10minütiger Zentrifugation (bei 2500 U/min und 4°C), wurde ein 350  $\mu$ l Aliquot der organischen Phase mittels eindimensionaler, bzw. zweidimensionaler DC-Analyse untersucht.

### 3.6.1.3. Inkubationen zur Bestimmung der SULT2-Enzymaktivität

Die *in vitro* Messung der SULT2-Aktivität in Gewebehomogenaten wurde mit den Substraten [4-<sup>14</sup>C]-DHEA und [7-<sup>3</sup>H]-Pregnenolon gemessen. Als Kosubstrat für die Messung der SULT2-Aktivität wurde PAPS verwendet.

Die Herstellung der Suspension von radioaktivem Substrat in IKP erfolgte wie unter 3.6.1.1. beschrieben. Es wurde jedoch IKP mit einem pH-Wert von 8 verwendet. Die finale Pregnenolon-Konzentration betrug 0,2  $\mu$ M und die DHEA-Konzentration 2  $\mu$ M. Die Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Jeder Inkubationsansatz enthielt 50  $\mu$ l des Gewebehomogenates (bzw. der Zellfraktionen), bzw. 50  $\mu$ l HP für den Leerwert, 50  $\mu$ l HP mit darin gelöstem DTE (finale Konzentration von 1 mM) und PAPS (finale Konzentration von 10 mM bzw. 50 mM) und 100  $\mu$ l IKP mit darin gelösten Substrat

Die Inkubation erfolgte bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 40 pro Minute. Die Hirngewebe-Präparate wurden 90 min und NNR-Präparate 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Chloroform gestoppt. Im Anschluss erfolgte 5minütiges Aufschütteln und 10minütige Zentrifugation (bei 2500 U/min und 4°C) um die Phasen zu trennen. Die Chloroform-Unterphase wurde extrahiert und in ein neues Reagenzglas überführt. Danach wurde 1 ml wassergesättigtes n-Butanol zu den Inkubationsansätzen hinzugegeben. Nach

erneutem Aufschütteln und Zentrifugation (s.o.) wurde die n-Butanol-Oberphase entnommen und mit der Chloroform-Phase vereint. Die organischen Extrakte wurden anschließend mittels eindimensionaler DC-Analyse untersucht.

#### **3.6.1.4. Inkubationen zur Bestimmung der STS-Enzymaktivität**

Die *in vitro* Bestimmung der STS-Enzymaktivität in den Gewebehomogenaten erfolgte mit [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-DHEAS als Substrat.

Die Endkonzentration des Substrates betrug 0,1 µM. Die Herstellung der Suspension von Substrat in IKP erfolgte wie unter 3.6.1.1. beschrieben. Der Inkubationsansatz enthielt 100 µl Gewebehomogenat (bzw. Zellfraktion), bzw. 100 µl HP für den Leerwert und 100 µl IKP mit darin gelöstem Substrat. Die Versuche wurden bei pH 7.5 durchgeführt.

Die 90minütige Inkubation der Hirngewebe-Präparationen erfolgte bei 37°C und unter 40maligem Schütteln pro min. Die Plazenta-Präparationen wurden unter gleichen Bedingungen für 30 min inkubiert. Der Reaktionsstopp und die Extraktion erfolgten nach der unter 3.6.1.3. beschriebenen Methode. Im Anschluss erfolgte die eindimensionale DC-Analyse.

### **3.6.2. Auftrennung der Produkte**

#### **3.6.2.1. Eindimensionale Dünnschichtchromatographie-Analyse**

Für die Untersuchung der organischen Phasen mittels Dünnschichtchromatographie, wurden diese zunächst im Stickstoff-Fluss evaporiert. Danach wurde das trockene Extrakt in 50 µl Referenzsteroidlösung (Chloroform:Methanol (2:1;v:v)) zurückgelöst. Die Referenzsteroidlösung enthielt je 25 µg folgender nicht radioaktiv markierter authentischer Referenzen:

- 1.) für die Untersuchung der CYP17-Aktivität: Pregnenolon, 17αOH-Pregnenolon, DHEA und Progesteron
- 2.) für die Untersuchung der 3β-HSD/KSI-Aktivität mit DHEA als Substrat: DHEA, Androstendion, Testosteron, Androstendiol
- 3.) für die Untersuchung der SULT2-Aktivität mit DHEA: DHEA und DHEAS

- 4.) für die Untersuchung der SULT2-Aktivität mit Pregnenolon: Pregnenolon und Pregnenolonsulfat
- 5.) für die Untersuchung der STS-Aktivität: DHEAS und DHEA

Die Referenzsteroidlösung und das darin gelöste Extrakt des Inkubationsansatzes wurden anschließend auf eine Whatman<sup>®</sup> DC-Platte bzw. Merck DC-Platte aufgetragen. Um die verschiedenen Steroidhormone mittels eindimensionaler DC aufzutrennen, wurden verschiedene Laufmittelsysteme angewendet:

- 1.) für die Untersuchung der CYP17-Aktivität erfolgte die DC einmal vollständig im Laufmittel:  
Chloroform:Ethylacetat (7:1;v:v)
- 2.) für die Untersuchung der 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität mit DHEA als Substrat erfolgte die DC einmal vollständig im Laufmittel:  
Dichlormethan:Aceton (9:1;v:v)
- 3.) für die Untersuchung der SULT2 und STS-Aktivität erfolgte die DC bis 3 cm unterhalb des oberen Randes der DC-Platte in Laufmittel 1. Danach wurde mit Laufmittel 2 einmal bis 9 cm und anschließend bis 10 cm unterhalb des oberen Randes entwickelt:  
Cyclohexan:Ethylacetat:Ethanol (9:9:2;v:v) (1)  
Cyclohexan:Ethylacetat:Ethanol:Eisessig:Wasser (45:45:40:1:1;v:v) (2)

Nach der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung wurden die Referenzsteroide mit einem Sprühreagenz (1 ml Anisaldehyd und 2 ml konzentrierte Schwefelsäure in 100 ml Eisessig) angefärbt, wodurch die Positionen der Referenzen detektiert wurden. Die Erfassung der radioaktiven Metabolite erfolgte mit Hilfe eines linearen DC-Analysators ( $\beta$ -Scanner, siehe 3.6.3.)

### **3.6.2.2. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie-Analyse**

Für die Untersuchung der CYP17 und 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität mit Pregnenolon als Substrat wurden spezifische zweidimensionale DC-Methoden entwickelt, um alle Metabolite identifizieren zu können. Dazu wurden zunächst die organischen Phasen wie unter 3.6.2.1. beschrieben evaporiert und in Referenzsteroidlösungen zurückgelöst. Für die Untersuchung

beider Enzyme wurden die gleichen Referenzsteroidlösungen verwendet. Sie enthielten je 25 µg folgender nicht radioaktiv markierter Referenzen:

Pregnenolon, 17 $\alpha$ -OH-Pregnenolon, DHEA, Progesteron, 17 $\alpha$ -OH-Progesteron, Androstendion, 20 $\alpha$ -OH-Pregnenolon und 5 $\alpha$ -Dihydroprogesteron

Nach dem Auflösen der Extrakte in der Referenzsteroidlösung, wurde diese punktförmig in der linken unteren Ecke einer DC-Platte mit einem Abstand von 2 cm vom unteren und 3 cm vom linken Rand aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in folgendem Laufmittelsystem:

zweimal vollständig in	Chloroform:Ethylacetat (9:1;v:v)	(x-Richtung)
zweimal vollständig in	Dichlormethan:Aceton (9:1;v:v)	(y-Richtung)

Die chromatographierten Platten wurden anschließend wie unter 3.6.2.1. beschrieben angefärbt und mittels zweidimensionaler Radiodistributionsanalyse (siehe 3.6.3.) am linearen  $\beta$ -Scanner ausgewertet.

### **3.6.3. Qualitativer Nachweis und quantitative Berechnung der Produkte mittels Radiodistributionsanalyse (RDA)**

Nach erfolgter DC wurden die Platten mittels Computer-unterstützter RDA am linearen  $\beta$ -Scanner ausgewertet. Dazu standen zwei Auswertungsmöglichkeiten zur Verfügung.

#### 1.) Die eindimensionale Radiodistributionsanalyse:

Hierbei wurden die einzelnen Spuren der DC-Platte mittels  $\beta$ -Scanner auf einer Länge von 20 cm und einer Breite von 2 cm erfasst. Durch die Computer-unterstützte Integration der erfassten radioaktiven Substanz-Signale konnten dann die entstandenen Metabolite quantifiziert werden. Da die Ausgangskonzentration des Substrates bekannt war, konnten die Konzentrationen der Produkte mittels Integralrechnung anteilig berechnet werden. Unter Berücksichtigung der Inkubationszeit, sowie der Proteinmenge im Inkubationsansatz, konnte anschließend die Enzymaktivität berechnet werden.

#### 2.) Die zweidimensionale Radiodistributionsanalyse:

Hierbei wurden mit dem  $\beta$ -Scanner auf einer Länge von 20 cm in x-Richtung, 100 Spuren von 0,2 cm Breite in y-Richtung erfasst. Die Computer-unterstützte Auswertung der 100 Einzelmessungen ergab dann eine Aufnahme der zweidimensionalen Verteilung der radioaktiven Substrate und ihrer Metabolite auf der DC-Platte.

### 3.7. RNA-Extraktion

Für die Untersuchung der mRNA-Expression der Steroidhormon metabolisierenden Enzyme mittels RT-PCR, wurden zunächst 50 – 100 mg Gewebe in 750 µl Trizol Reagenz homogenisiert. Danach erfolgte eine 5minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden 150 µl Chloroform hinzugegeben und 15 sec lang geschüttelt. Es erfolgte eine weitere Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur, bevor für 15 min bei 12 000 g und 4°C zentrifugiert wurde. Die RNA befindet sich dann in der wässrigen Phase, die in ein neues 2 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt wurde. Dann wurde die RNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt. Durch Zentrifugation für 1 h bei 12 000 g und 4°C, wurde die RNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen. Das trockene Pellet wurde in 900 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H<sub>2</sub>O aufgenommen, in dem 10 µl 10fach konzentrierten DNase-Puffer und 1 Unit DNase gelöst waren. Das Gemisch wurde 1 h lang bei 37°C inkubiert, um DNA-Reste zu beseitigen. Durch eine erneute Trizol Extraktion (s.o.) wurde dann ein reines RNA-Pellet gewonnen, dass in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen wurde. Die RNA-Konzentration der gewonnenen RNA-Lösung wurde mittels Extinktionsbestimmung bei 260 nm bestimmt. Die Messung der Extinktion bei 280 nm bestätigte das Fehlen von Protein-Verunreinigungen.

### 3.8. Reverse Transkription (RT)

Für die reverse Transkription der gewonnenen total-RNA-Proben, wurde der GIBCO BRL Superscript II<sup>TM</sup>-Kit verwendet. Entsprechend den Anweisungen des Herstellers wurden je Probe 1 µg RNA in 5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach Zugabe von weiteren 5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, die 0,5 µg Oligo(dT), 50 ng Random Hexamere und 2 mM (final) dNTPs enthielten, wurde das Gemisch für 5 min auf 65°C erwärmt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Nach einminütiger Abkühlung auf 0°C, wodurch die erneute Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert wird, wurden weitere 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, die den RT-Puffer (final 40 mM Tris-HCL (pH 8,4), 100 mM KCl), sowie 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 40 Units Ribonuclease Inhibitor und 50 Units Superscript II<sup>TM</sup> enthielten, hinzugegeben. Nach 5minütiger Inkubation bei 25°C (zur Anlagerung der Oligo(dT) bzw. Random Hexamere), erfolgte die reverse Transkription bei 42°C über 60 min. Zuletzt wurde (da die reverse Transkriptase bei Temperaturen über 50°C denaturiert) das Gemisch für 15 min auf 70°C erhitzt, um die Reaktion zu beenden. Die cDNA-

Produkte wurden dann bis zur Verwendung in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bei -20°C gelagert.

### 3.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die *in vitro* Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten und durchläuft zyklisch folgende Reaktionsschritte:

- 1.) Hitzedenaturierung: die doppelsträngige DNA bzw. cDNA wird bei ca. 94°C in die Einzelstränge getrennt.
- 2.) Anlagerung der Primer zum jeweiligen Plus- (Schreibrichtung auf der DNA 5' nach 3') bzw. Minus-Strang (von 3' nach 5') bei Temperaturen von ca. 50°-60°C.
- 3.) Verlängerung der DNA von 5' nach 3' am Primer durch die DNA Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) bei 72°C. Diese ist resistent gegen Denaturierung von Temperaturen bis über 94°C und hat ein Temperaturoptimum von ca. 72°C.

Da diese Reaktionen zyklisch ablaufen, sind nach n Zyklen theoretisch  $2^n - 1$  Kopien des Originals entstanden.

Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) bezogen, bzw. mit einem Labor eigenen DNA-Synthesizer hergestellt. Dabei wurde auf ein etwa gleiches AT:GC Verhältnis geachtet. Die komplementären cDNA-Sequenzen der entsprechenden Primerpaare lagen immer auf unterschiedlichen Exons der prä-mRNA-Sequenz, um eine unerwünschte Amplifikation von DNA-Spuren der cDNA-Proben zu verhindern. Somit konnte nur die aus der mRNA gewonnene cDNA amplifiziert werden.

Der PCR-Reaktionsansatz hatte ein finales Volumen von 50 µl (Zusammensetzung: PCR einfach konzentrierter Puffer, der 100-200 ng cDNA und 1U Polymerase enthielt. Die Konzentration der Primer im Reaktionsansatz betrug je 20-40 pmol/l, die des dNTP-Mix 32 µmol/l), optional wurden 2µl Dimethylsulfoxid hinzugegeben.

Es wurden PCRs zur Untersuchung der mRNA-Expression der Enzyme CYP17, 3β-HSD/KSI, STS, SULT2A1, SULT2B1a und SULT2B1b im menschlichen Temporallappen durchgeführt. Zur qualitativen Überprüfung der cDNA-Proben aller verwendeten Gewebepreparationen wurde außerdem die Expression der *Housekeeping-Gene* β-Actin und GAPDH untersucht. Diese Proteine werden in allen Zellen des Körpers in nahezu gleicher Höhe

exprimiert. Die Spezifität aller PCR-Produkte wurde mittels Sequenzierung bestätigt. Die verwendeten Primer finden sich in Tab.1, die PCR-Reaktionsbedingungen sind in Tab.2 beschrieben.

Gen	5' Plus-Strang 3'	3' Minus-Strang 5'
CYP17	CAACAACCGTAAGGGTATCG	GTCTTACACCCAAAGTCGG
3 $\beta$ HSD/KSI	TTCTGGATGAGCCATTCCTG	CATGTGTTTTCCAGAGGCTC
SULT2A1	GTGGACAAAGCACAACCTTCTG	CTGACCCCAGTAACACATTCT
SULT2B1a	CTCCCTCATGGCGTCTCCC	GCTTCGGAAGCTAGCACGGA
SULT2B1b	CACCCACCTGCCATGGACG	GCTTCGGAAGCTAGCACGGA
Sulfatase	CCAACGCTCCGATCATGAGT	CAAGGTTGCCTACGAAACGG
GAPDH	CATCTCTGCCCCCTCTGCTGA	TCCGACACCCGTTCCAGTAGG
$\beta$ -Actin	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	GGGTCTAGTACAAACTCTGG

**Tab.1** Verwendete Primer für die PCR.

Gen	Anfangsbedingung	Denaturierung	Anlagerung	Polymerisation	Zyklen
CYP17	94°C 5min	94°C 35sec	55°C 45sec	72°C 90sec	38
3 $\beta$ HSD/KSI	94°C 5min	94°C 45sec	64°C 45sec	72°C 90sec	38
SULT2A1	94°C 5min	94°C 30sec	56°C 30sec	72°C 120sec	40
SULT2B1a	94°C 5min	94°C 30sec	62°C 30sec	72°C 120sec	40
SULT2B1b	94°C 5min	94°C 30sec	58°C 30sec	72°C 120sec	40
Sulfatase	94°C 5min	94°C 30sec	58°C 30sec	72°C 105sec	40
GAPDH	94°C 5min	94°C 35sec	58°C 45sec	72°C 90sec	42
$\beta$ Actin	94°C 5min	94°C 30sec	58°C 45sec	72°C 90sec	40

**Tab.2** PCR-Bedingungen der untersuchten Gene.

### **3.10. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte**

Die RT-PCR Produkte wurden im 2%igen Agarose-Gel, welches Ethidiumbromid enthielt, elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Visualisierung der Produkte wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet, wodurch das mit den PCR-Produkten interagierende Ethidiumbromid mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht wird. Die Größe der amplifizierten PCR-Produkte wurde anhand der Position von co-aufgetrennten Längenstandards abgeschätzt.

### **3.11. Statistische Analysen**

Da nur eine geringe Anzahl an Hirngewebe-Präparationen untersucht werden konnte, wurden spezielle statistische Tests durchgeführt, um eine Aussage über die Signifikanz der gemessenen Daten zu erhalten. Der U-Test wurde angewendet, um die Signifikanz der ungepaarten Proben zu prüfen. Hierbei wurden die Ergebnisse der Enzymaktivität bei Mann und Frau in den gleichen Geweben (graue bzw. weiße Substanz) verglichen.

Mit Hilfe des Wilcoxon-Test wurde die Signifikanz der gepaarten Proben geprüft, d.h. die Enzymaktivität der grauen und weißen Substanz (männliche und weibliche Hirngewebe-Präparationen separat betrachtet) wurden miteinander verglichen.

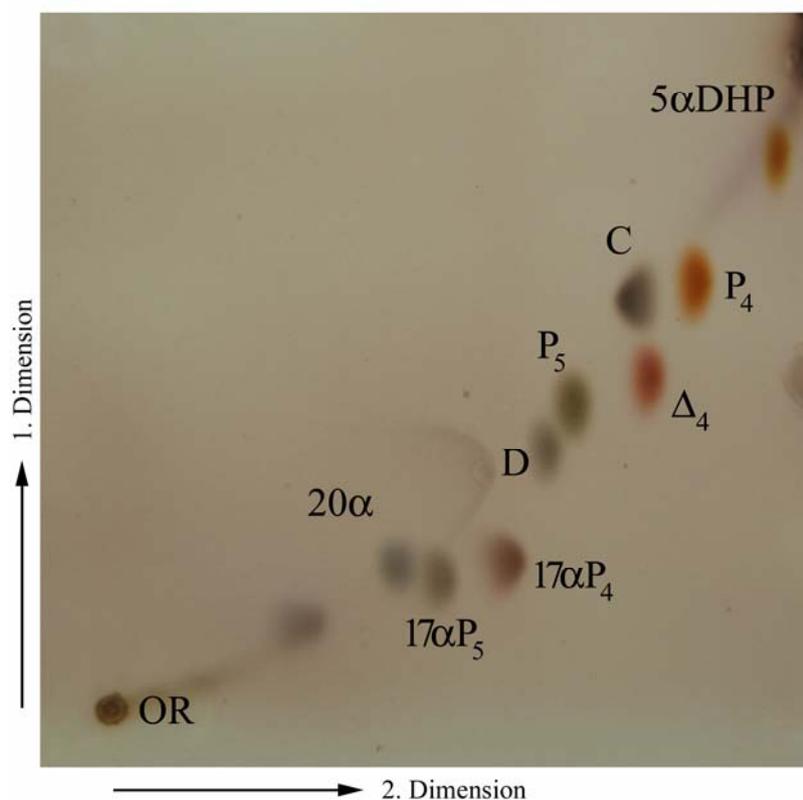
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Untersuchung der CYP17-Aktivität und Genexpression im menschlichen Gehirn

#### 4.1.1. Zweidimensionale DC-Methode zur Auftrennung aller potentiellen Pregnenolon Metabolite

Für die qualitative Analyse der CYP17-Aktivität wurde zunächst eine zweidimensionale DC-Methode entwickelt. Als bevorzugtes Kosubstrat der CYP17 wurde NADPH eingesetzt. Bei vorhandener CYP17-Aktivität entsteht im Laufe der Katalyse  $\text{NADP}^+$ . Dieses kann dann im Inkubationsansatz bei eventueller  $3\beta$ -HSD/KSI-Expression nachfolgend als Kosubstrat dieses Enzyms verwendet werden. Aus diesem Grund mussten neben den direkten CYP17-Metaboliten des Pregnenolons, auch die mittels  $3\beta$ -HSD/KSI entstehenden Metabolite aufgetrennt werden (siehe Abb.1). Außerdem sollte die Methode  $20\alpha$ -OH-Pregnenolon bei Expression der  $20\alpha$ -Hydroxylase und  $5\alpha$ -Dihydroprogesteron, bei Expression der  $5\alpha$ -Reduktase ein mögliches Progesteron-Produkt, auftrennen.

Nach der DC in y-Richtung der Platte wurde diese um  $90^\circ$  gedreht und eine DC in x-Richtung der Platte durchgeführt. Die Trennstrecke wurde durch diese Methode verlängert. Die beiden verwendeten unterschiedlichen Laufmittelsysteme ermöglichen so die Auftrennung aller oben genannter Pregnenolon Metabolite. Die DC wurde wie unter 3.6.2.2. beschrieben durchgeführt (siehe Abb.2).

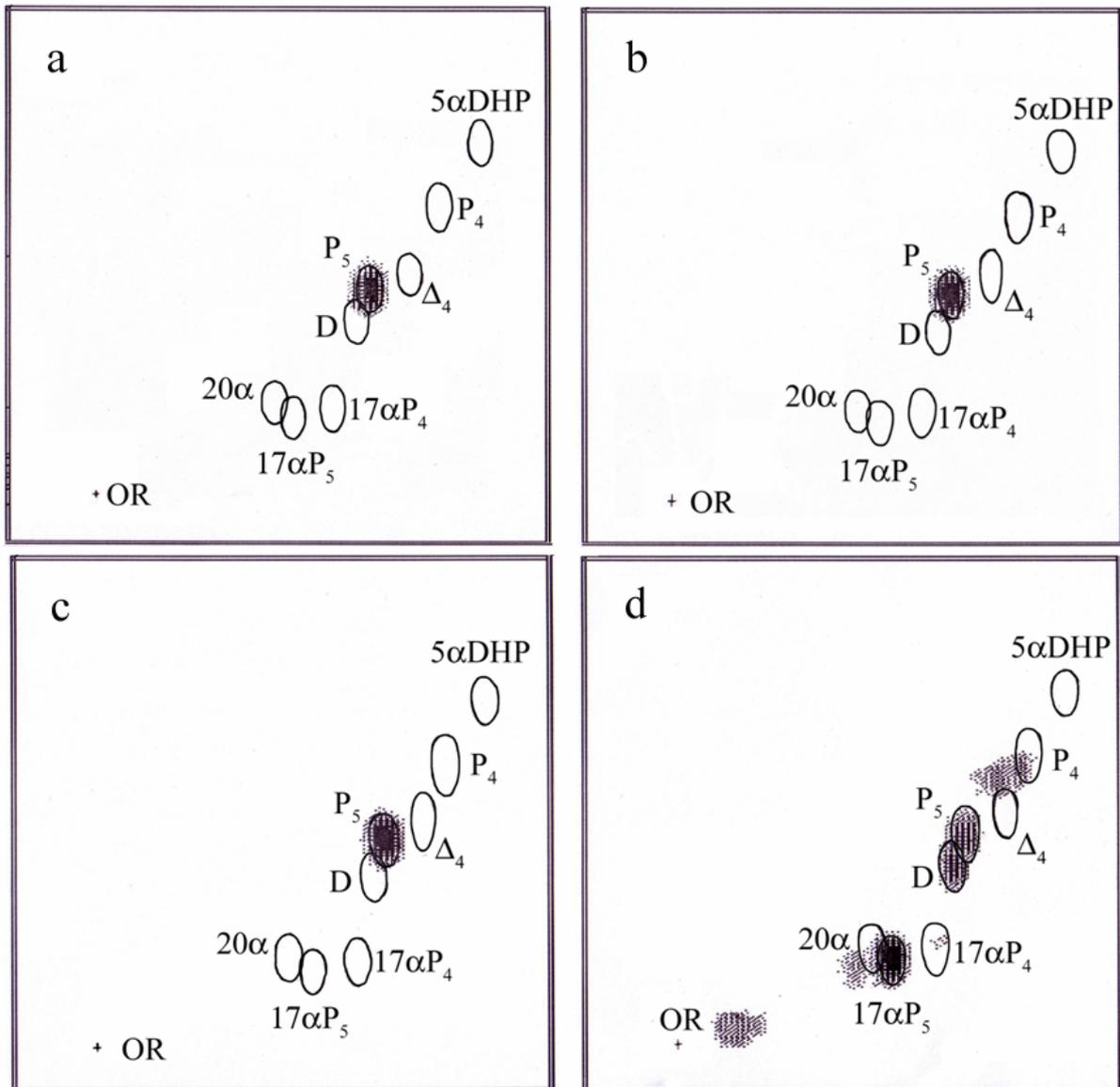


**Abb.2 Zweidimensionale DC der potentiellen Pregnenolon Metabolite.** Das Bild zeigt neben dem (OR) Auftragungsort die angefärbten co-chromatografierten Referenzen: ( $20\alpha$ )  $20\alpha$ -OH-Pregnenolon, ( $17\alpha P_5$ )  $17\alpha$ -OH-Prgnenolon, ( $17\alpha P_4$ )  $17\alpha$ -OH-Progesteron, (D) DHEA, ( $P_5$ ) Pregnenolon, ( $\Delta_4$ ) Androstendion, ( $P_4$ ) Progesteron, ( $5\alpha$ DHP)  $5\alpha$ -Dihydroprogesteron. Außerdem wurde aus dem Homogenat extrahiertes (C) Cholesterin angefärbt.

#### 4.1.2. Fehlende CYP17-Aktivität im menschlichen Temporallappen

Bei der Untersuchung der CYP17-Aktivität im menschlichen Hirngewebe wurde Temporallappengewebe mit gleichen Anteilen grauer und weißer Substanz einer 33jährigen Frau und eines 65jährigen Mannes als Gesamthomogenat eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde menschliche NNR eines 51jährigen Mannes als Gesamthomogenat verwendet. Im Inkubationsansatz der Gehirngewebepräparation des Mannes befanden sich 3373  $\mu\text{g}$  Protein, in dem der Frau 2701  $\mu\text{g}$  Protein und in dem der NNR 43  $\mu\text{g}$  Protein. Die Inkubation erfolgte mit 0,2  $\mu\text{M}$  7- $^3\text{H}$ -Pregnenolon als Substrat und 3 mM NADPH als Kosubstrat der CYP17 bei pH 7,5. Das Hirngewebe wurde 90 min, die NNR-Präparation 30 min inkubiert (siehe 3.6.1.1.). Zur Auswertung wurde die unter 4.1.1. beschriebene zweidimensionale DC und RDA zur qualitativen Analyse der Pregnenolon Metabolite durchgeführt. Im Inkubationsansatz mit menschlichem Hirngewebe konnte keine mittels CYP17-Aktivität entstandenen Pregnenolon-Metabolite detektiert werden

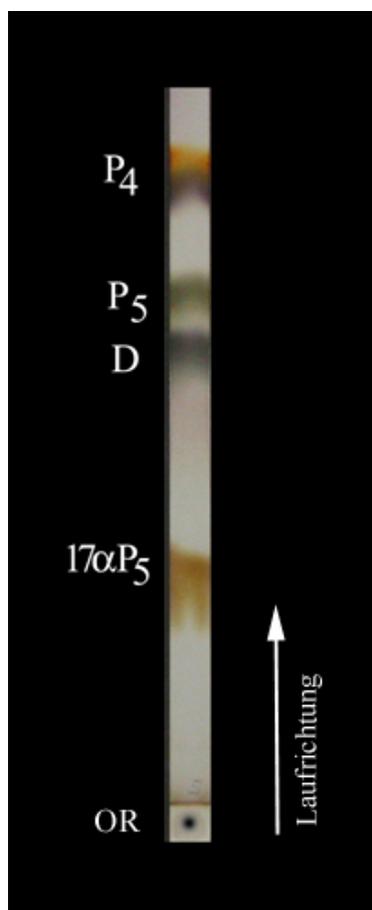
(Abb.3 b und c). In der NNR-Positivkontrolle (Abb.3 d) zeigten sich dagegen die CYP17-Produkte  $17\alpha$ -OH-Pregnenolon und DHEA, sowie weitere nicht identifizierbare Metabolite.



**Abb.3 Im Gesamthomogenat aus Temporallappengewebe des Menschen konnte keine CYP17-Aktivität festgestellt werden.** Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm der [ $^3\text{H}$ ]-Radiosignale des Substrates ( $0,2 \mu\text{M}$   $7\text{-}[^3\text{H}]$ - Pregnenolon) und der Metabolite nach zweidimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Untersucht wurde die CYP17-Aktivität in (a) einer Kontrollinkubation ohne Gewebe, (b) Gesamthomogenat aus Temporallappengewebe einer 33jährigen Frau ( $2701 \mu\text{g}$  Protein), (c) Gesamthomogenat aus Temporallappengewebe eines 65jährigen Mannes ( $3373 \mu\text{g}$  Protein) und (d) Gesamthomogenat aus einer NNR eines 51jährigen Mannes ( $43 \mu\text{g}$  Protein). Die Position der angefärbten und co-chromatografierten Referenzsteroiden ist durch die eingezeichneten Ränder gekennzeichnet: (OR) Auftragungsort, ( $20\alpha$ )  $20\alpha$ -OH-Pregnenolon, ( $17\alpha\text{P}_5$ )  $17\alpha$ -OH-Pregnenolon, ( $17\alpha\text{P}_4$ )  $17\alpha$ -OH-Progesteron, (D) DHEA, ( $\text{P}_5$ ) Pregnenolon, ( $\Delta_4$ ) Androstendion, ( $\text{P}_4$ ) Progesteron, ( $5\alpha\text{DHP}$ )  $5\alpha$ -Dihydroprogesteron. Die Inkubationsdauer der Gesamthomogenate aus Hirngewebe betrug 90 min, die aus NNR 30 min. Als Kosubstrat wurde NADPH verwendet.

#### 4.1.3. Eindimensionale DC-Methode zur Auftrennung der mittels CYP17 entstandenen Pregnenolon Metabolite

Für die quantitative Bestimmung der CYP17-Aktivität wurde außerdem eine schnellere, eindimensionale DC-Methode entwickelt. Im Gegensatz zur zweidimensionalen DC wurde die DC-Platte hierbei nur in y-Richtung entwickelt. Diese Methode wurde verwendet, um schnell größere Probenmengen untersuchen zu können. Die eindimensionale DC wurde wie unter 3.6.2.1. beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis der Auftrennung zeigt Abb.4.

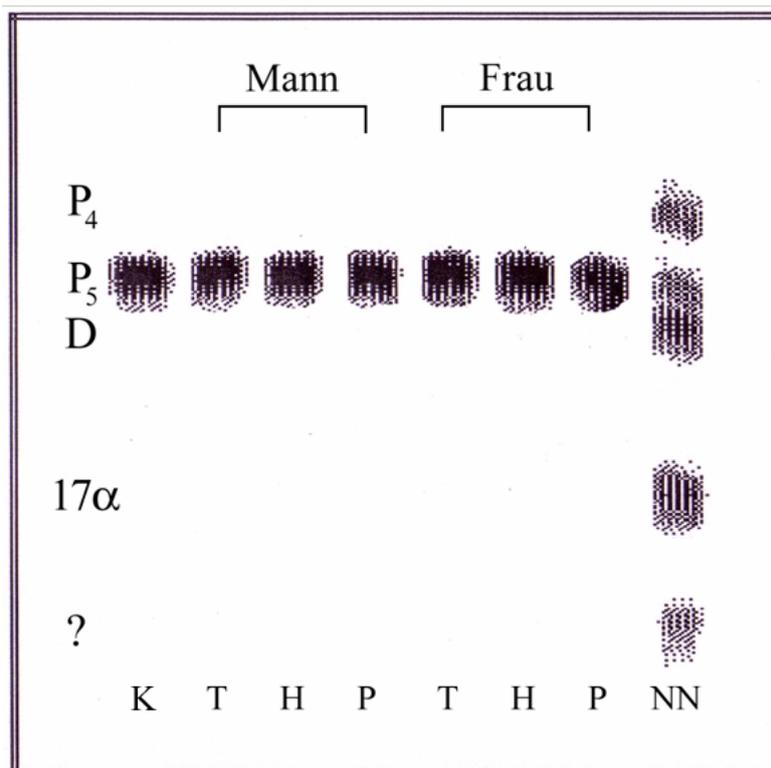


**Abb.4 Eindimensionale DC der mittels CYP17-Aktivität entstandenen Pregnenolon Metabolite.** Das Bild zeigt den Ausschnitt einer Whatman<sup>®</sup>-Platte mit den angefärbten und co-chromatographierten Referenzen: (17αP<sub>5</sub>) 17αOH-Pregnenoln, (D) DHEA, (P<sub>5</sub>) Pregnenolon und (P<sub>4</sub>) Progesteron einer Kontrollinkubation, nach erfolgter DC (wie unter 3.6.2.1. beschrieben). Der (OR) Auftragungsort und die Laufrichtung der DC sind markiert.

#### 4.1.4. Untersuchung weiterer Gewebepräparationen und Verlängerung der Inkubationszeit

In einer weiteren Versuchsreihe wurden für die Messung der CYP17-Aktivität zellfreie Überstände von menschlichem Temporallappen (gleiche Mengen grauer und weißer Substanz), Hippocampus und Parahippocampus einer 48jährigen Frau und eines 58jährigen Mannes verwendet. Als Positivkontrolle wurde Gesamthomogenat menschlicher NNR eines 51jährigen Mannes eingesetzt. Die Proteinmengen in den Inkubationsansätzen der Hirngewebepräparationen der Frau betragen: Temporallappen 238 µg, Hippocampus 273 µg, Parahippocampus 254 µg. Die Inkubationsansätze des Mannes enthielten: Temporallappen 276 µg, Hippocampus: 250 µg, Parahippocampus 234 µg Protein. Die Proteinmenge im Inkubationsansatz der NNR-Präparation betrug 43 µg.

Die Inkubation erfolgte wie unter 3.6.1.1. beschrieben (mit 0,2 µM 7-[<sup>3</sup>H]-Pregnenolon als Substrat, 3 mM NADPH als Kosubstrat bei pH 7,5). Das Gehirngewebe wurde 90 min, das NNR-Gewebe 30 min inkubiert. Im Anschluss erfolgten die unter 4.1.3. beschriebene eindimensionale DC-Methode und die zweidimensionale RDA. Auch in diesem Versuch konnte keine CYP17-Aktivität nachgewiesen werden (siehe Abb.5).

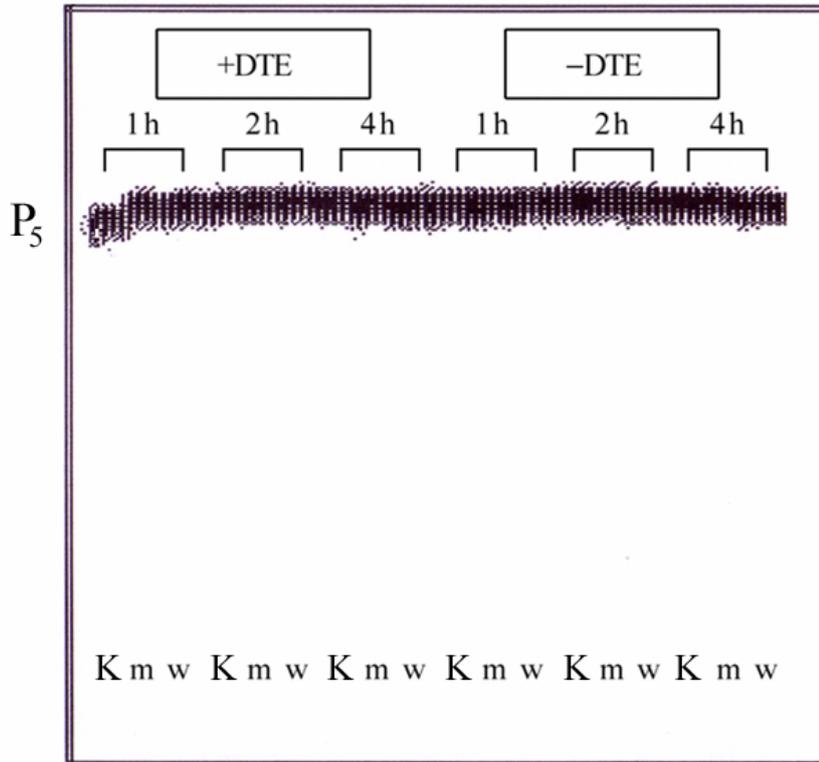


**Abb.5 Im zellfreien Überstand des Temporallappens, Hippocampus und Parahippocampus des Menschen konnte keine CYP17-Aktivität gemessen werden.** Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm der [ $^3\text{H}$ ]-Radiosignale des Substrates ( $0,2 \mu\text{M}$   $7\text{-}[^3\text{H}]$ -Pregnenolon) und der Metabolite auf einer Whatman<sup>®</sup>-Platte nach eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Untersucht wurde die CYP17-Aktivität einer (K) Kontrollinkubation ohne Gewebe, Inkubationen mit zellfreien Überständen aus Gewebepräparationen des (T) Temporallappens ( $276 \mu\text{g}$  Protein), (H) Hippocampus ( $250 \mu\text{g}$  Protein), (P) Parahippocampus ( $234 \mu\text{g}$  Protein) eines 58jährigen Mannes und einer 48jährigen Frau (Proteinmengen: Temporallappen  $238 \mu\text{g}$ , Hippocampus  $273 \mu\text{g}$ , Parahippocampus  $234 \mu\text{g}$ ), sowie einer Inkubation mit (NN) Gesamthomogenat von einer NNR ( $43 \mu\text{g}$  Protein) eines 51jährigen Mannes. Die Position der Referenzen ist angegeben: ( $\text{P}_4$ ) Progesteron, ( $\text{P}_5$ ) Pregnenolon, (D) DHEA, ( $17\alpha$ )  $17\alpha\text{-OH-Pregnenolon}$ , (?) nicht identifizierbarer Metabolit. Die Inkubationsdauer der Präparationen aus Hirngewebe betrug  $90 \text{ min}$ , die der NNR  $30 \text{ min}$ . Als Kosubstrat wurde  $3\text{mM}$  NADPH verwendet.

Nachdem die vorherigen Versuche keinen Umsatz von Pregnenolon mittels CYP17 zeigten, sollte ausgeschlossen werden, dass eine zu geringe Enzymkonzentration bzw. Inkubationszeit für diese Ergebnisse verantwortlich waren. Die Inkubationszeiten wurden daher von  $1,5 \text{ h}$  auf  $4 \text{ h}$  verlängert, um auch geringste Spuren von CYP17-Aktivität zu erfassen.

Es wurde Gesamthomogenat (gleiches Mengen von grauer und weißer Substanz) aus dem Temporallappen einer 19jährigen Frau ( $3244 \mu\text{g}$  Protein) und eines 29jährigen Mannes ( $3349 \mu\text{g}$  Protein) verwendet und wie unter 3.6.1.1. beschrieben (mit  $0,2 \mu\text{M}$   $7\text{-}[^3\text{H}]$ -Pregnenolon als

Substrat, 3 mM NADPH als Kosubstrat bei pH 7,5) für 1, 2 und 4 h inkubiert. Zusätzlich wurden ein Teil der Inkubationsansätze zum Schutz der Enzyme vor Oxidation mit DTE (final 1 mM) versetzt. Die Auswertung erfolgte mittels eindimensionaler DC-Analyse und zweidimensionaler RDA. Auch nach einer Inkubationsdauer von 4 h konnte wiederum keine CYP17-Aktivität gemessen werden (siehe Abb.6). Die entsprechende Kontrolle war wieder positiv (nicht abgebildet).

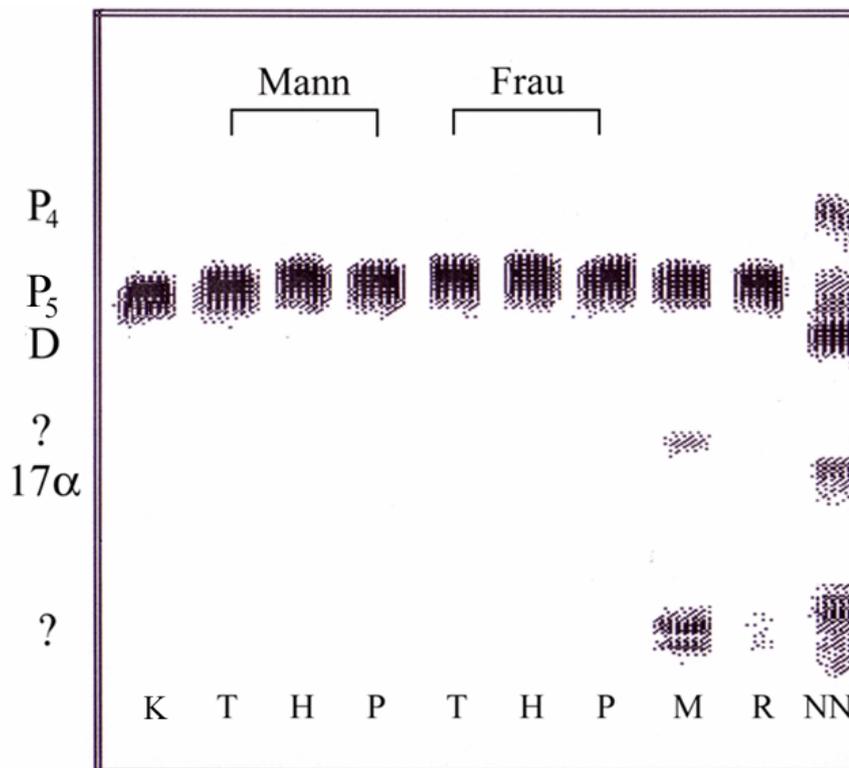


**Abb.6 Im menschlichen Temporallappen ist auch nach 4h Inkubation keine CYP17-Aktivität zu messen.** Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm der [<sup>3</sup>H]-Radiosignale des Substrates (0,2 µM 7-[<sup>3</sup>H]-Pregnenolon) einer Whatman®-Platte nach eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Untersucht wurde die CYP17-Aktivität in jeweils neun Proben mit und neun Proben ohne DTE (1 mM). Die Inkubation erfolgte zur (K) Kontrolle ohne Gewebe, im Gesamthomogenat aus menschlichen Temporallappen eines (m) 29 jährigen Mannes (3349 µg Protein) und einer (w) 19jährigen Frau (3244 µg Protein). (P<sub>5</sub>) Pregnenolon wurde nicht umgesetzt. Inkubiert wurde für 1, 2 bzw. 4 h. Als Kosubstrat wurde 3 mM NADPH verwendet.

#### 4.1.5. Fehlende CYP17-Aktivität im Gehirn der Maus und Ratte

Um die Frage zu klären, ob die CYP17-Aktivität nur in Gehirnen von Menschen fehlt, wurde dann das Vorkommen dieses Enzyms in Gehirnen von Mäusen und Ratten untersucht. Zur Kontrolle wurde die Enzymaktivität auch in zellfreien Überständen von menschlichen Temporallappen (220 µg Protein, gleiches Verhältnis von grauer und weißer Substanz), Hippocampus (197 µg Protein) und Parahippocampus (241 µg Protein) einer 48jährigen Frau und eines 58jährigen Mannes (Proteinmengen: Temporallappen 228 µg, Hippocampus 212 µg, Parahippocampus 198 µg) und im Gesamthomogenat von NNR (30 µg Protein) eines 51jährigen Mannes untersucht. Die Proteinmenge im Inkubationsansatz der Hirngewebepräparation der Maus betrug 395 µg, in dem der Ratte 532 µg. Es wurde wie unter 3.6.1.1. beschrieben (mit 0,2 µM 7-[<sup>3</sup>H]-Pregnenolon als Substrat, 3 mM NADPH als Kosubstrat bei pH 7,5) inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug für die Präparationen aus Hirngewebe 90 min, für die der NNR 30 min. Der Versuch wurde erneut mittels eindimensionaler DC-Analyse und zweidimensionaler RDA ausgewertet.

Auch in diesen Untersuchungen konnte weder im menschlichen Hirngewebe noch im Großhirngewebe der Maus und Ratte das Vorkommen der CYP17 nachgewiesen werden. Die Aktivität konnte nur im Kontrollgewebe detektiert werden (Siehe Abb.7). In Inkubationsansätzen mit Hirngewebe der Maus und in Spuren auch in den Inkubationsansätzen mit Rattenhirngewebe wurde stattdessen die Bildung von nicht identifizierbaren Metaboliten beobachtet.

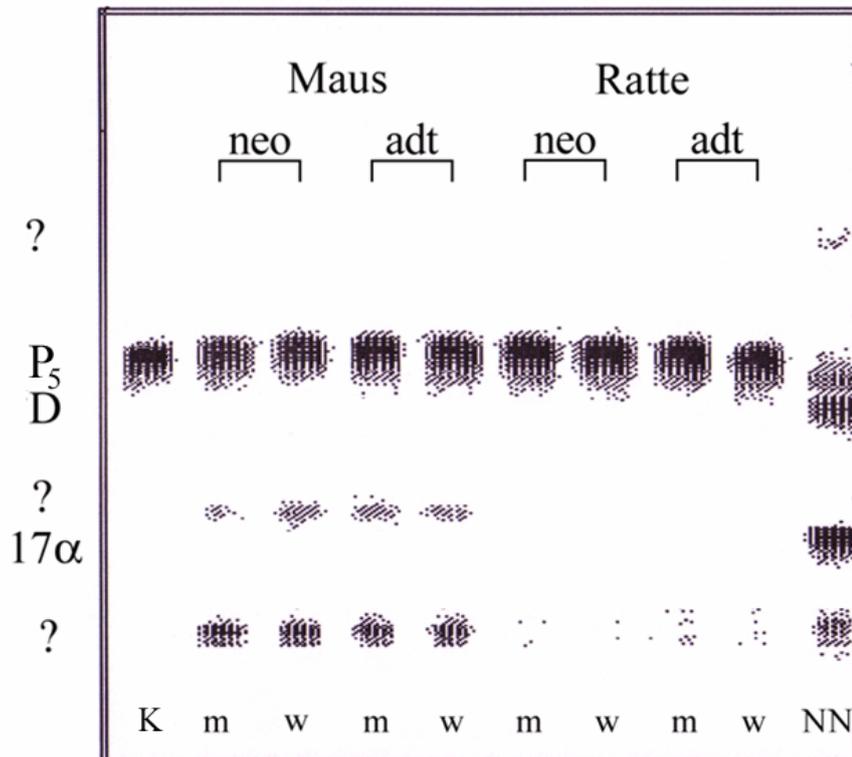


**Abb.7 Im Gehirn der Maus und Ratte konnte keine CYP17-Aktivität gemessen werden.**

Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm der [<sup>3</sup>H]-Radiosignale des Substrates (0,2 μM 7-[<sup>3</sup>H]-Pregnenolon) und der Metabolite nach eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Untersucht wurde die CYP17-Aktivität in einer (K) Kontrollinkubation ohne Gewebe und Inkubationsansätzen mit zellfreien Überständen von (T) Temporallappen (228 μg Protein), (H) Hippocampus (212 μg Protein) und (P) Parahippocampus (198 μg Protein) eines 58jährigen Mannes und einer 48jährigen Frau (Temporallappen 220 μg Protein, Hippocampus 197 μg Protein, Parahippocampus 241 μg Protein), sowie zellfreiem Überstand vom Großhirn einer (M) Maus (395 μg Protein) und einer (R) Ratte (532 μg Protein). Eine Inkubation mit (NN) Gesamthomogenat von NNR (30,8 μg Protein) eines 51jährigen Mannes diente als Positivkontrolle. Die mittels der co-chromatographierten Referenzsteroiden identifizierten Metabolite sind wie folgt gekennzeichnet: (P<sub>4</sub>) Progesteron, (P<sub>5</sub>) Pregnenolon, (D) DHEA, (17α) 17α-OH-Pregnenolon. Nicht identifizierte Metabolite sind mit (?) gekennzeichnet. Die Inkubationsdauer der Hirngewebe betrug 90 min, die der NNR 30 min. Als Kosubstrat wurde 3 mM NADPH verwendet.

Um eventuelle Unterschiede der zerebralen CYP17-Aktivität in verschiedenen Entwicklungsstadien der Maus und Ratte zu erfassen, wurden zellfreie Überstände der Großhirnrinde von weiblichen und männlichen neonatalen, sowie weiblichen und männlichen adulten Mäusen und Ratten inkubiert. (Proteinmengen: männlich Mäuse: neonatal 441 μg, adult 635 μg; weibliche Mäuse: neonatal 551 μg, adult 711 μg; männliche Ratten: neonatal 392 μg, adult 579 μg; weibliche Ratten: neonatal 403 μg, adult 597,1 μg). Erneut wurde Gesamthomogenat von NNR (30 μg Protein) eines 51jährigen Mannes für die Kontrollinkubation

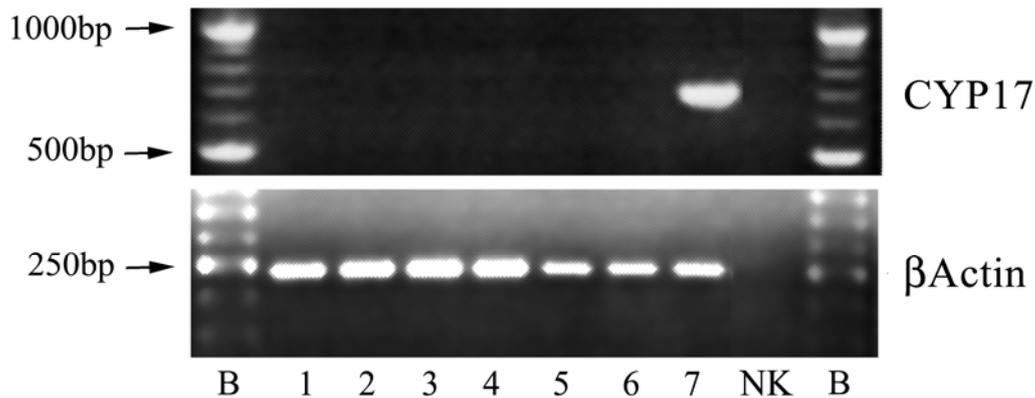
verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Inkubiert wurde wie zuvor. Wiederum konnte in keinem der untersuchten Hirngewebeproben CYP17-Aktivität nachgewiesen werden (Siehe Abb.8). Vor allem im Hirngewebe der Maus wurde dagegen erneut die Bildung von nicht identifizierten Pregnenolon-Metaboliten festgestellt.



**Abb.8 Fehlende CYP17-Aktivität im Großhirn der Maus und Ratte verschiedener Entwicklungsstadien.** Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm der [<sup>3</sup>H]-Radiosignale des Substrates (0,2 μM 7-[<sup>3</sup>H]-Pregnenolon) und der Metabolite auf einer Whatman<sup>®</sup>-Platte nach eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Untersucht wurde die CYP17-Aktivität in einer (K) Kontrollinkubation ohne Gewebe und Inkubationen aus zellfreien Überständen des Großhirns je einer (w) weiblichen und (m) männlichen (neo) neonatalen und (adt) adulten Maus und Ratte. (Proteinmengen: männlich Mäuse: neonatal 441 μg, adult 635 μg; weibliche Mäuse: neonatal 551 μg, adult 711 μg; männliche Ratten: neonatal 392 μg, adult 579 μg; weibliche Ratten: neonatal 403 μg, adult 597 μg.) Eine Inkubation mit (NN) Gesamthomogenat von NNR (30 μg Protein) eines 51jährigen Mannes diente als Positivkontrolle. Die mittels co-chromatographierten Referenzsteroiden identifizierten Metabolite sind: (P<sub>5</sub>) Pregnenolon, (D) DHEA, (17α) 17α-OH-Pregnenolon. Nicht identifizierte Metabolite sind mit (?) gekennzeichnet. Die Hirngewebe wurden 90 min, die NNR 30 min inkubiert. Als Kosubstrat wurde 3 mM NADPH verwendet.

#### 4.1.6. Fehlende CYP17 mRNA-Expression im menschlichen Temporallappen

Mittels RT-PCR-Analyse wurde die mRNA-Expression der CYP17-Aktivität im Hirngewebe untersucht. Die Ergebnisse bestätigten das Fehlen einer Expression der CYP17 im menschlichen Hirngewebe. In den PCR-Versuchsansätzen wurden die Expression des Enzyms in grauer und weißer Substanz aus dem Temporallappen und dem Hippocampus einer 48jährigen Frau und eines 58jährigen Mannes untersucht. Als Kontrollgewebe wurde NNR-Gewebe eines 51jährigen Mannes verwendet. Durch die spezifischen Primer (siehe Tab.1) wurden 701 Basenpaare der CYP17-mRNA-Sequenz in der NNR amplifiziert. Im Gegensatz zur NNR wurde im Hirngewebe kein CYP17-PCR-Produkt amplifiziert, während das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin in allen Proben amplifiziert wurde (siehe Abb.9).



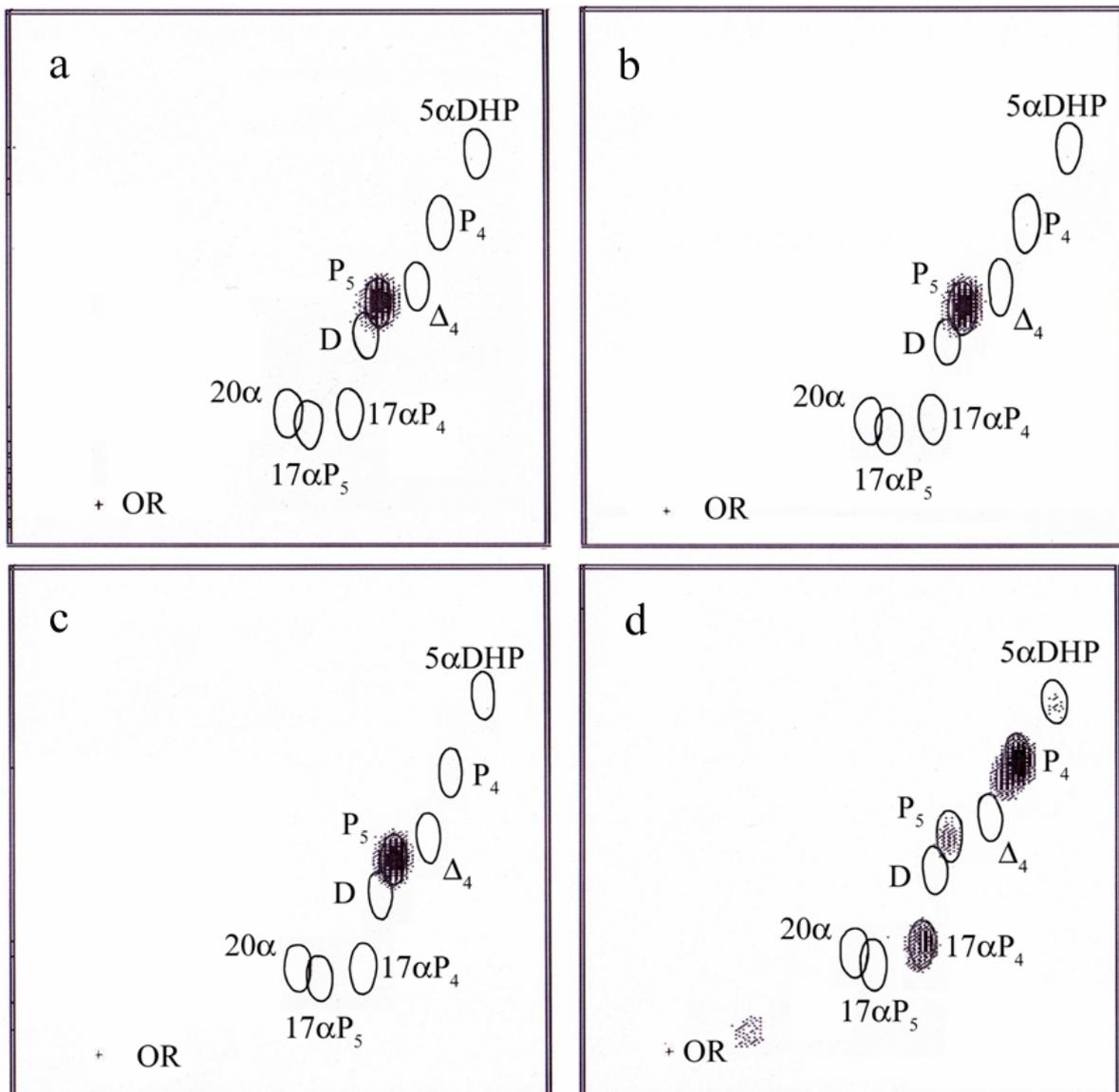
**Abb.9 Fehlende mRNA-Expression der CYP17 im menschlichen Gehirn.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der RT-PCR-Analyse nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel unter UV-Licht. Fehlende mRNA-Expression der CYP17 in der (1) grauen und (2) weißen Substanz des Temporallappens sowie (3) Hippocampus eines 58jährigen Mannes und der (4) grauen und (5) weißen Substanz des Temporallappens sowie (6) Hippocampus einer 48jährigen Frau. Die CYP17 wird in (7) NNR eines 51jährigen Mannes exprimiert. (NK) Negativkontrolle ohne cDNA. Die  $\beta$ -Actin Expression wurde zur Kontrolle der cDNA-Qualität in allen Geweben untersucht. Zur Abschätzung der Größe der PCR-Produkte sind die (bp) Basenpaare der (B) Basenpaarleiter (Längenstandard), angegeben.

## 4.2. Untersuchung der 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität und Genexpression im menschlichen Gehirn

### 4.2.1. Ausbleibende Metabolisierung von Pregnenolon mittels 3 $\beta$ -HSD/KSI

Im ersten Versuch wurde die katalytische Umsetzung von Pregnenolon in Progesteron via zerebraler 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität untersucht. Der Versuch wurde mit Gesamthomogenat von menschlichem Temporallappengewebe einer 33jährigen Frau und eines 65jährigen Mannes (gleiches Verhältnis von grauer und weißer Substanz) durchgeführt. Als Kontrolle wurde Gesamthomogenat aus menschlichem NNR-Gewebe eines 51jährigen Mannes verwendet. Im Inkubationsansatz der Gehirngewebepräparation des Mannes befand sich 3373  $\mu$ g Protein, in dem der Frau 2701  $\mu$ g Protein und in dem der NNR 43  $\mu$ g Protein. Die Inkubation erfolgte mit 0,2  $\mu$ M [7-<sup>3</sup>H]-Pregnenolon als Substrat und 3 mM NAD<sup>+</sup> als Kosubstrat der 3 $\beta$ -HSD/KSI bei pH 7,5. Das Hirngewebe wurde 90 min, die NNR 30 min inkubiert (siehe 3.6.1.2.). Für die qualitative Untersuchung des Vorkommens der 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität im menschlichen Temporallappen wurde die unter 4.1.1. beschriebene zweidimensionale DC-Methode zur Auftrennung der potentiellen Pregnenolon Metabolite verwendet. Die weitere Analyse erfolgte mittels zweidimensionaler RDA.

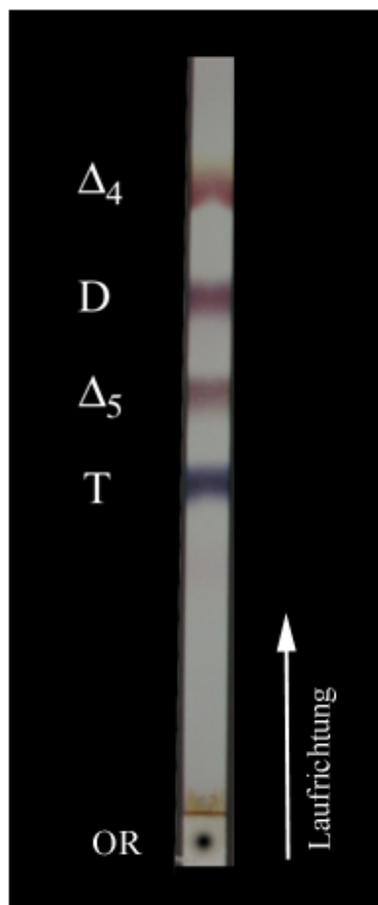
Im menschlichen Temporallappen konnte keine 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität nachgewiesen werden, da in den entsprechenden Versuchen Pregnenolon nicht in Progesteron umgewandelt wurde (siehe Abb.10 b und c). Im Gegensatz dazu wurde im Kontrollgewebekomogenat aus menschlicher NNR sowohl die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron (3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität; siehe Abb.1) als auch die nachfolgende Umwandlung von Progesteron in 17 $\alpha$ -OH-Progesteron (CYP17-Aktivität) und in Spuren von 5 $\alpha$ -Dihydroprogesteron (5 $\alpha$ -Reduktase-Aktivität) gemessen. Die beiden nachfolgenden reduktiven Reaktionen wurden erst durch die während der starken 3 $\beta$ -HSD/KSI-Reaktion katalysierte Umwandlung von NAD<sup>+</sup> in NADH ermöglicht (siehe Abb.10 d).



**Abb.10 Fehlende 3β-HSD/KSI-Aktivität im Temporallappengewebe des Menschen .** Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm der [<sup>3</sup>H]-Radiosignale des Substrates (0,2 μM 7-[<sup>3</sup>H]- Pregnenolon) und der Metabolite nach zweidimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Untersucht wurde die 3β-HSD/KSI-Aktivität in (a) einer Kontrollinkubation ohne Gewebe, (b) Gesamthomogenat aus Temporallappengewebe einer 33jährigen Frau (2701 μg Protein), (c) Gesamthomogenat aus Temporallappengewebe eines 65jährigen Mannes (3373 μg Protein) und (d) Gesamthomogenat aus NNR-Gewebe eines 51jährigen Mannes (43 μg Protein). Die Position der angefärbten und co-chromatografierten Referenzsteroiden ist durch die eingezeichneten Ränder gekennzeichnet. (OR) Auftragungsort, (20α) 20α-OH-Pregnenolon, (17αP<sub>5</sub>) 17α-OH-Pregnenolon, (17αP<sub>4</sub>) 17α-OH-Progesteron, (D) DHEA, (P<sub>5</sub>) Pregnenolon, (Δ<sub>4</sub>) Androstendion, (P<sub>4</sub>) Progesteron, (5αDHP) 5α-Dihydroprogesteron. Die Inkubationsdauer der Gesamthomogenate aus Hirngewebe betrug 90 min, die aus NNR 30 min. Als Kosubstrat wurde NAD<sup>+</sup> verwendet.

#### 4.2.2. Eindimensionale DC-Methode zur Auftrennung der mittels $3\beta$ -HSD/KSI entstandenen DHEA Metabolite

Für die quantitative Bestimmung der  $3\beta$ -HSD/KSI-Aktivität wurde ebenfalls eine schnellere, eindimensionale DC-Methode entwickelt. Als Substrat der  $3\beta$ -HSD/KSI wurde in den folgenden Versuchen  $[4-^{14}\text{C}]$ -DHEA verwendet. Deswegen mussten in diesen Versuchen DHEA und die potentiellen Produkte Androstendion, Testosteron und Androstendiol (siehe Abb.1) voneinander getrennt werden. Die eindimensionale DC erfolgte wie unter 3.6.2.1 beschrieben (siehe Abb.11).

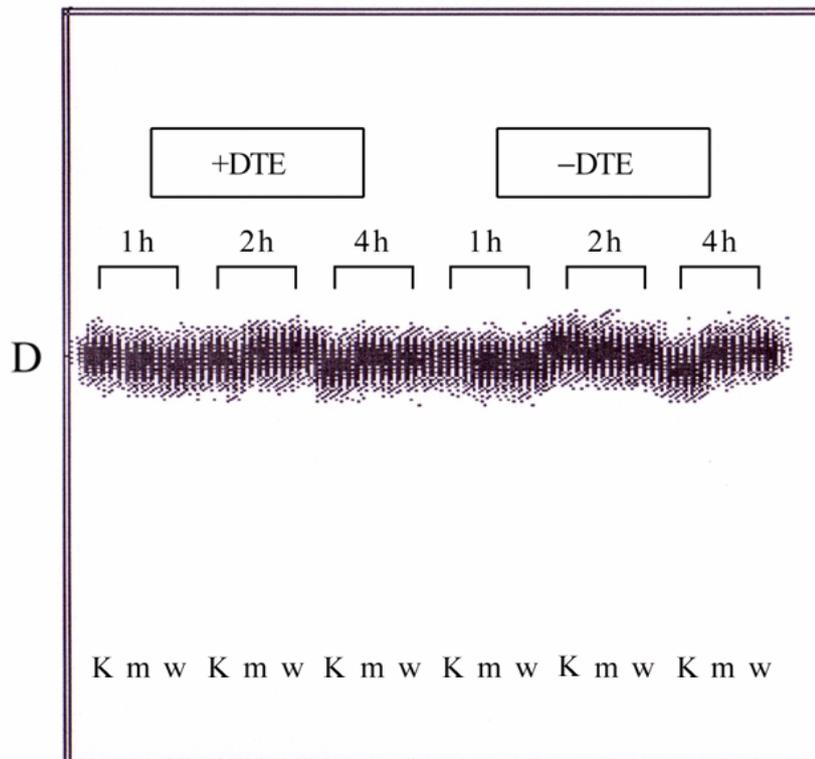


**Abb.11 Eindimensionale DC der mittels  $3\beta$ -HSD/KSI-Aktivität entstandenen DHEA-Metabolite.** Das Bild zeigt den Ausschnitt einer Whatman<sup>®</sup>-Platte mit den angefärbten und co-chromatographierten Referenzen: (T) Testosteron, ( $\Delta_5$ ) Androstendiol, (D) DHEA und ( $\Delta_4$ ) Androstendion einer Kontrollinkubation, nach erfolgter DC (wie unter 3.6.2.1. beschrieben). Der (OR) Auftragungsort und die Laufrichtung der DC sind markiert.

#### **4.2.3. Ausbleibende Metabolisierung von DHEA mittels 3 $\beta$ -HSD/KSI**

Die entsprechenden Versuche wurden mit Gesamthomogenat aus Hirngewebe (gleiches Verhältnis von grauer und weißer Substanz) einer 19jährigen Frau (3349  $\mu$ g Protein) und eines 29jährigen Mannes (3244  $\mu$ g Protein) durchgeführt und wie unter 3.6.1.2. beschrieben (2  $\mu$ M [4-<sup>14</sup>C]-DHEA als Substrat, 3 mM NAD<sup>+</sup> als Kosubstrat bei pH 7,5) für 1, 2 und 4 h inkubiert. Zusätzlich wurde ein Teil der Gesamthomogenate zum Schutz der Enzyme vor Oxidation mit DTE (final 1 mM) versetzt. Die Analyse erfolgte mittels der unter 4.2.2. beschriebenen eindimensionalen DC-Methode und zweidimensionaler RDA.

Auch der Einsatz von DHEA als 3 $\beta$ -HSD/KSI-Substrat und eine Verlängerung der Inkubationszeit bis zu 4 h bestätigte das Fehlen von 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität im menschlichen Temporallappen (siehe Abb.12). Die entsprechende Kontrolle war wieder positiv (nicht abgebildet).



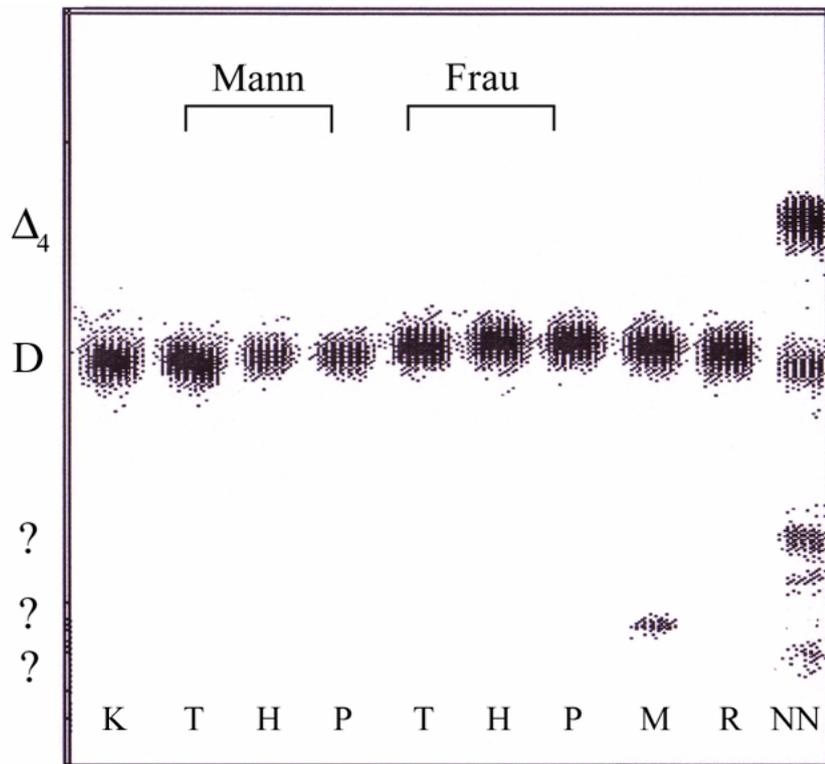
**Abb.12 Im menschlichen Temporallappen ist auch nach 4 h Inkubation keine 3β-HSD/KSI-Aktivität zu messen.** Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm der [<sup>14</sup>C]-Radiosignale von Substrat (2 μM [4-<sup>14</sup>C]-DHEA) auf einer Whatman®-Platte nach eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Untersucht wurde die 3β-HSD/KSI-Aktivität in jeweils neun Proben mit und neun Proben ohne DTE (1 mM). Die Inkubation erfolgte zur Kontrolle (K) ohne Gewebe, in Inkubationsansätzen aus Gesamthomogenat von menschlichen Temporallappen eines (m) 29jährigen Mannes (3244 μg Protein) und einer (w) 19jährigen Frau (3349 μg Protein). (D) DHEA wurde nicht umgesetzt. Inkubiert wurde für 1, 2 bzw. 4 h. Als Kosubstrat wurde 3 mM NAD<sup>+</sup> verwendet.

#### 4.2.4. Fehlende 3β-HSD/KSI-Aktivität im Gehirn der Maus und Ratte

In einem Versuch wurde die zerebrale Aktivität der 3β-HSD/KSI von Mensch, Maus und Ratte verglichen. Für die Aktivitätsbestimmung wurden zellfreie Überstände von menschlichem Temporallappen (220 μg Protein), Hippocampus (197 μg Protein) und Para-hippocampus (241 μg Protein) einer 34jährigen Frau und eines 65jährigen Mannes (Proteinmengen: Temporallappen 228 μg, Hippocampus 212 μg, Parahippocampus 198 μg), sowie zellfreie Überstände aus Großhirngewebe einer Maus (395 μg Protein) und einer Ratte (532 μg Protein) verwendet. Die Inkubation erfolgte entsprechend 3.6.1.2. (mit 2 μM [4-<sup>14</sup>C]-DHEA als Substrat, 3 mM NAD<sup>+</sup> als Kosubstrat der 3β-HSD/KSI für 90 min bei pH 7,5). Als Kontrollgewebe wurde erneut Gesamthomogenat aus NNR-Gewebe eines 51jährigen Mannes (30 μg Protein, Inkubationszeit

30 min) verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA.

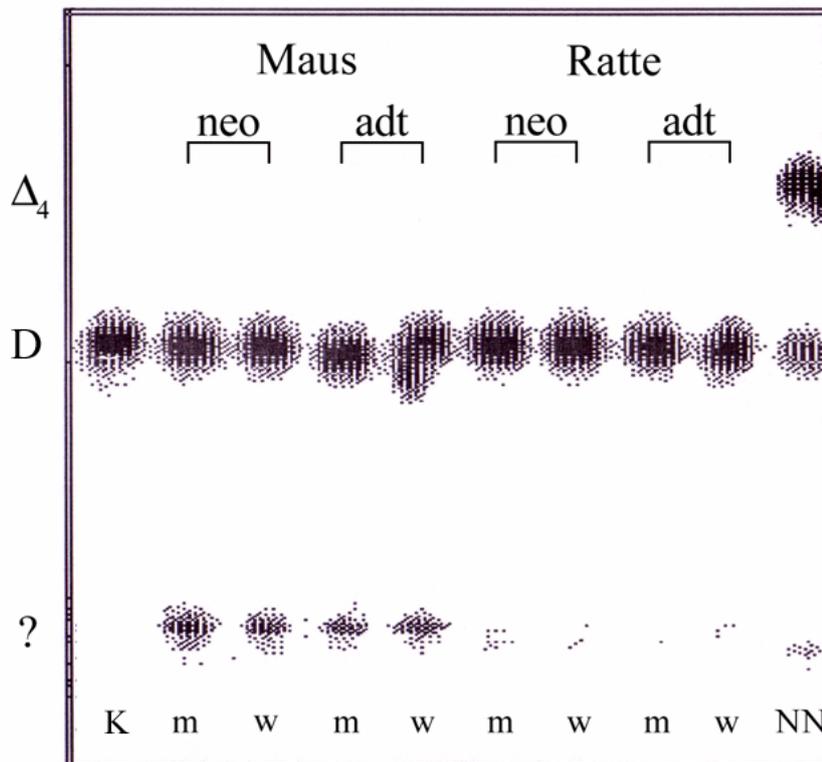
In keinem der untersuchten Hirngewebe konnte eine 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität nachgewiesen werden. Die Kontrollinkubation war dagegen erneut positiv. Bei der Inkubation mit Maushirngewebehomogenat wurde eine Umwandlung von DHEA in einen nicht identifizierten polaren Metaboliten festgestellt (siehe Abb.13).



**Abb.13 Weder im menschlichen Temporallappen, Hippocampus und Parahippocampus noch in der Großhirnrinde der Maus und Ratte konnte eine 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität festgestellt werden.** Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm der [ $^{14}$ C]-Radiosignale vom Substrat (2  $\mu$ M [ $4$ - $^{14}$ C]-DHEA) und Metaboliten nach eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Untersucht wurde die 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität in einer (K) Kontrollinkubation ohne Gewebe und Inkubationsansätze mit zellfreien Überständen von (T) Temporallappen (228  $\mu$ g Protein), (H) Hippocampus (212  $\mu$ g Protein) und (P) Parahippocampus (198  $\mu$ g Protein) eines 65jährigen Mannes und einer 34jährigen Frau (Temporallappen 220  $\mu$ g Protein, Hippocampus 197  $\mu$ g Protein, Parahippocampus 241  $\mu$ g Protein), sowie zur Kontrolle mit (NN) Gesamthomogenat aus NNR eines 51jährigen Mannes (30  $\mu$ g Protein) durchgeführt. Außerdem wurden zellfreie Überstände von Homogenaten aus Großhirnen einer (M) Maus (395  $\mu$ g Protein) und einer (R) Ratte (532  $\mu$ g Protein) verwendet. Die Positionen der co-chromatographierten Referenzsteroiden sind gekennzeichnet: (D) DHEA, ( $\Delta_4$ ) Androstendion. Nicht identifizierte Metabolite sind mit (?) gekennzeichnet. Die Inkubationsdauer der Hirngewebe betrug 90 min, die der NNR 30 min. Als Kosubstrat wurde 3 mM NAD $^+$  verwendet.

Um eine mögliche altersspezifische Abhängigkeit der zerebralen  $3\beta$ -HSD/KSI-Aktivität im Gehirn von Mäusen und Ratten zu erfassen, wurde die Enzymaktivität in zellfreien Überständen von neonatalen und adulten Mäusen- und Rattengehirnen (von je einem weiblichen und männlichen Tier) wie unter 3.6.1.2. beschrieben (mit  $2\ \mu\text{M}$   $[4\text{-}^{14}\text{C}]\text{-DHEA}$  als Substrat,  $3\ \text{mM}$   $\text{NAD}^+$  als Kosubstrat für  $90\ \text{min}$  bei  $\text{pH}\ 7,5$ ) gemessen. (Proteinmengen: männliche Mäuse: neonatal  $441\ \mu\text{g}$ , adult  $635\ \mu\text{g}$ ; weibliche Mäuse: neonatal  $551\ \mu\text{g}$ , adult  $711\ \mu\text{g}$ ; männliche Ratten: neonatal  $392\ \mu\text{g}$ , adult  $579\ \mu\text{g}$ ; weibliche Ratten: neonatal  $403\ \mu\text{g}$ , adult  $597,1\ \mu\text{g}$ ). Als Kontrollgewebe wurde Gesamthomogenat von NNR ( $30\ \mu\text{g}$  Protein) eines 51jährigen Mannes verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA.

Wie Abb. 14 zeigt konnte in keinem der Gewebe eine Umwandlung von DHEA mittels  $3\beta$ -HSD/KSI-Aktivität in Androstendion festgestellt werden. Wie schon im vorangegangenen Versuch wurde DHEA im Homogenat aus Mäusehirngewebe in einen polaren, nicht identifizierten Metaboliten umgewandelt. Die größte Menge dieses Metaboliten wurde dabei im Homogenat aus neonatalem Mäusegehirn gebildet.

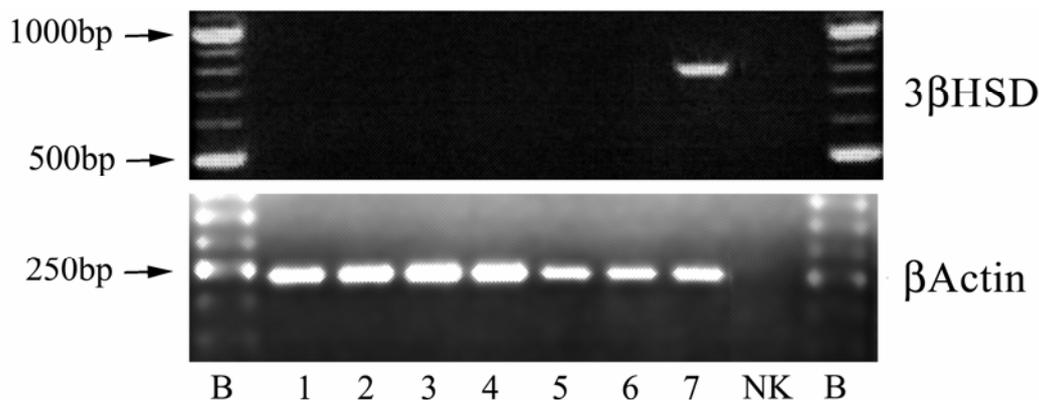


**Abb.14 Mäuse und Ratten besitzen keine zerebrale 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität.** Die Abbildung zeigt ein Auotradiogramm der [ $^{14}$ C]-Radiosignale vom Substrat (2  $\mu$ M [4- $^{14}$ C]-DHEA) und Metaboliten nach zweidimensionaler DC und eindimensionaler RDA. Untersucht wurde die 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität einer (K) Kontrollinkubation ohne Gewebe und Inkubationen aus zellfreien Überständen des Großhirns je einer (w) weiblichen und (m) männlichen (neo) neonatalen und (adt) adulten Maus und Ratte. (Proteinmengen: männliche Mäuse: neonatal 441  $\mu$ g, adult 635  $\mu$ g; weibliche Mäuse: neonatal 551  $\mu$ g, adult 711  $\mu$ g; männliche Ratten: neonatal 392  $\mu$ g, adult 579  $\mu$ g; weibliche Ratten: neonatal 403  $\mu$ g, adult 597  $\mu$ g.) Eine Inkubation mit Gesamthomogenat von (NN) NNR (30  $\mu$ g Protein) eines 51jährigen Mannes diente als Positivkontrolle. Die mittels co-chromatographierten Referenzsteroiden identifizierten Metabolite sind: ( $\Delta_4$ ) Androstendiol und (D) DHEA. Nicht identifizierte Metabolite sind mit (?) gekennzeichnet. Die Hirngewebe wurden 90 min, die NNR 30 min inkubiert. Als Kosubstrat wurde 3 mM NAD $^+$  verwendet.

#### 4.2.5. Fehlende 3 $\beta$ -HSD/KSI mRNA-Expression im menschlichen Temporallappen

Die Untersuchung der 3 $\beta$ -HSD/KSI mRNA-Expression im menschlichen Gehirn wurde mittels RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde zunächst die total-RNA aus Temporallappen, Hippocampus einer 48jährigen Frau und eines 58jährigen Mannes gewonnen und mittels einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als Kontrollgewebe wurde cDNA aus NNR-Gewebe eines 51jährigen Mannes eingesetzt. Die anschließende Amplifikation der 3 $\beta$ -HSD/KSI mRNA-Sequenz mittels PCR erfolgte mit spezifischen Primern (Tab.1), die ein 798 Basenpaare großes Produkt ergeben. Es gibt zwei Isoenzyme der 3 $\beta$ -HSD/KSI (3HSDB1 und 3HSDB2). Diese

unterscheiden sich in ihrer mRNA-Sequenz nur geringfügig. Die Primer wurden so gewählt, dass ein übereinstimmender mRNA-Abschnitt der beiden Isoenzyme amplifiziert wurde. Zusätzlich wurde in allen Proben die mRNA-Sequenz des  $\beta$ -Actin Housekeeping-Gens amplifiziert. Dieses Protein wird in allen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert und diente somit als Qualitätskontrolle für die cDNA der Hirngewebeproben. Im Gehirn des Menschen konnte keine mRNA-Expression der  $3\beta$ -HSD/KSI Isoenzyme festgestellt werden (siehe Abb.15). In der Positivkontrolle zeigte sich dagegen ein cDNA-Amplifikationsprodukt der  $3\beta$ -HSD/KSI Isoenzyme.



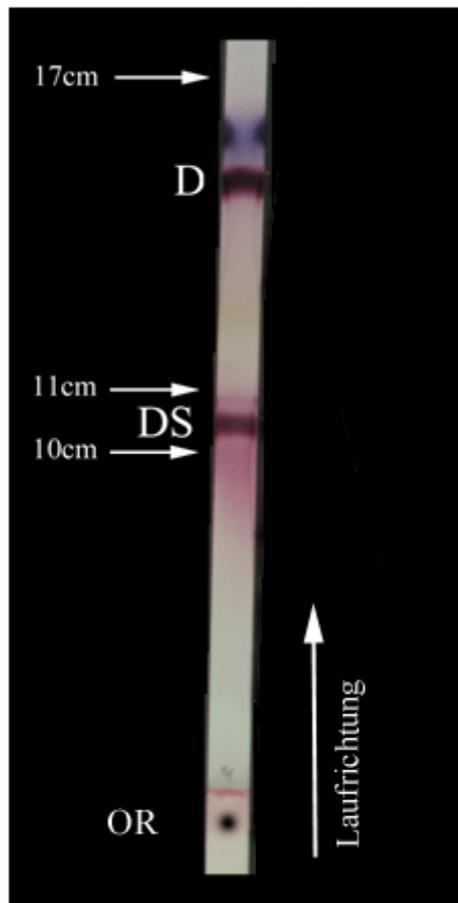
**Abb.15 Fehlende mRNA-Expression der  $3\beta$ -HSD/KSI im menschlichen Gehirn.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der RT-PCR-Analyse nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel unter UV-Licht. Fehlende mRNA-Expression der  $3\beta$ -HSD/KSI in der (1) grauen und (2) weißen Substanz des Temporallappens sowie (3) Hippocampus eines 58jährigen Mannes und der (4) grauen und (5) weißen Substanz des Temporallappens sowie (6) Hippocampus einer 48jährigen Frau. Die  $3\beta$ -HSD/KSI wird in (7) NNR eines 51jährigen Mannes exprimiert. (NK) Negativkontrolle ohne cDNA. Die  $\beta$ -Actin mRNA Expression wurde untersucht um die cDNA Qualität der Proben zu belegen. Zur Abschätzung der Größe der PCR-Produkte sind die (bp) Basenpaare der (B) Basenpaarleiter (Längenstandard) angegeben.

### 4.3. Untersuchung der Steroid-Sulfotransferase (SULT2)-Aktivität und Genexpression im menschlichen Gehirn

#### 4.3.1. Eindimensionale DC-Methode zur Trennung der Substrate und Metabolite der SULT2 und STS

Für die Untersuchung der SULT2- und STS-Aktivität musste eine DC entwickelt werden, welche die entsprechenden 3-Hydroxysteroiden von ihren sulfatierten Metaboliten trennen konnte. Dazu wurden die unter 3.6.2.1. beschriebenen Laufmittelsysteme verwendet. Die DC-Platten wurden

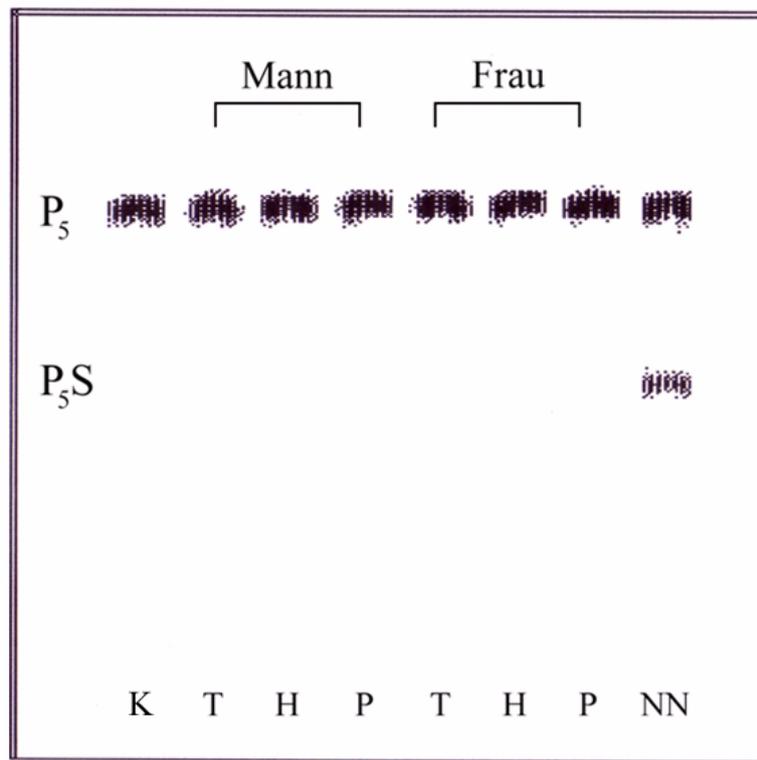
mit dem ersten Laufmittel einmal bis 3 cm unterhalb des oberen Randes entwickelt. Bei der ersten Anwendung des zweiten Laufmittels sollte dieses eine Höhe von 11 cm nicht überschreiten. Bei der zweiten Anwendung wurde bis zu einer Höhe von 10 cm entwickelt. Mit Hilfe der co-chromatographierten Referenzen konnte man die Position der Referenzsteroiden nach Anfärbung ermitteln. Mit dieser Methode wurden sowohl DHEA von DHEAS als auch Pregnenolon von Pregnenolonsulfat getrennt (Abb. 16).



**Abb.16 Eindimensionale DC-Methode zur Trennung der SULT2- bzw. STS-Substrate und Metabolite:** (DS) DHEAS und (D) DHEA. Das Bild zeigt den Ausschnitt einer Whatmann© -Platte einer Kontrollinkubation nach erfolgter DC. Der (OR) Auftragungsort und die Laufrichtung sind markiert. Die Zentimeterangaben beziehen sich auf die Laufstrecke der einzelnen Laufmittel: 1. Laufmittel bis 17 cm entwickelt, 2. Laufmittel beim ersten Entwickeln bis 11 cm, beim 2. Entwickeln bis 10 cm. Die Auftrennung von Pregnenolon und Pregnenolonsulfat erfolgte nach der gleichen Methode (hier nicht abgebildet).

#### 4.3.2. Ausbleibende Metabolisierung von Pregnenolon mittels SULT2

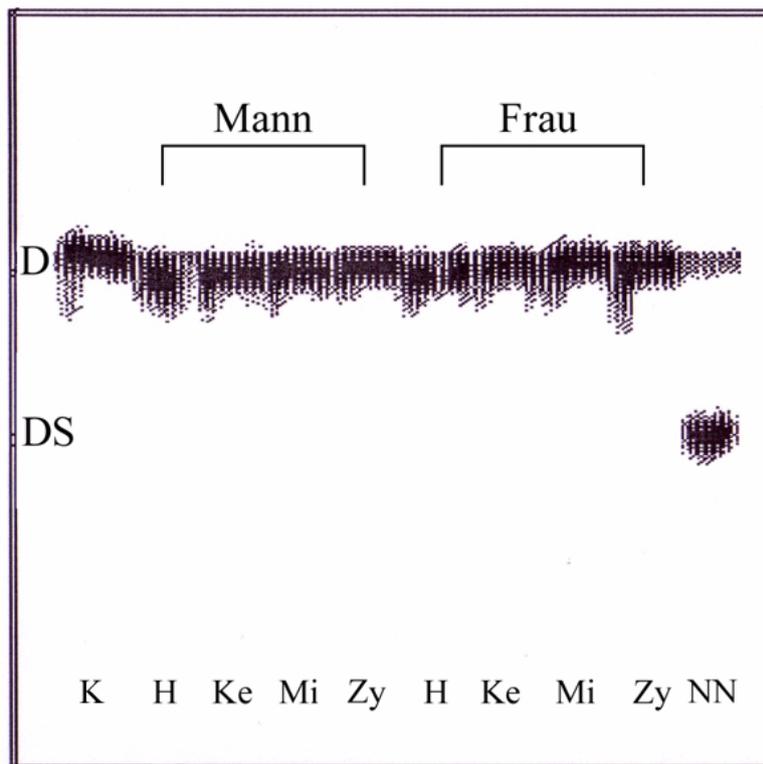
Die Untersuchung der SULT2-Aktivität im menschlichen Hirngewebe erfolgte in zellfreien Überständen aus Temporallappen-, Hippocampus- und Parahippocampusgewebe einer 48jährigen Frau und eines 58jährigen Mannes. (Proteinmengen der Hirngewebepräparationen der Frau: Temporallappen 420 µg, Hippocampus 324 µg, Parahippocampus 353 µg und des Mannes: Temporallappen 428 µg, Hippocampus 421 µg, 389 µg.) Als Positivkontrolle wurde die Zytosolfraction aus NNR-Gewebe eines 51jährigen Mannes (30 µg Protein) verwendet. Als Substrat der SULT2 wurde in diesem Versuch 0,2 µM 7-[<sup>3</sup>H]-Pregnenolon eingesetzt. Die finale Konzentration des Kosubstrats (PAPS) betrug 10 mM. Inkubiert wurde 90 min (Inkubationsdauer 30 min NNR) bei pH 8,0 (siehe 3.6.1.3.). Die Auswertung erfolgte mittels der unter 4.3.1. beschriebenen eindimensionalen DC-Methode und anschließender zweidimensionaler RDA. Im menschlichen Temporallappen, Hippocampus und Parahippocampus konnte keine Umwandlung von Pregnenolon mittels SULT2 festgestellt werden (siehe Abb.17). Die Positivkontrolle bewies dagegen die Funktionalität des Assays.



**Abb.17 Fehlende SULT2-Aktivität in Temporallappen, Hippocampus und Parahippocampus Gesamthomogenat und Zellfraktionen des menschlichen Temporallappens.** Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm der [ $^3\text{H}$ ]-Radiosignale des Substrates ( $0,2 \mu\text{M}$   $7\text{-}[^3\text{H}]\text{-Pregnenolon}$ ) und der Metabolite auf einer Whatman<sup>®</sup>-Platte nach eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Untersucht wurde die SULT2-Aktivität einer (K) Kontrollinkubation ohne Gewebe und Inkubationsansätzen mit zellfreien Überständen von (T) Temporallappen ( $428 \mu\text{g}$  Protein), (H) Hippocampus ( $421 \mu\text{g}$  Protein) und (P) Parahippocampus ( $389 \mu\text{g}$  Protein) eines 58jährigen Mannes und einer 48jährigen Frau (Temporallappen  $420 \mu\text{g}$  Protein, Hippocampus  $324 \mu\text{g}$  Protein, Parahippocampus  $353 \mu\text{g}$  Protein). Eine Inkubation mit (NN) Gesamthomogenat von NNR eines 51jährigen Mannes ( $30 \mu\text{g}$  Protein) wurde als Positivkontrolle verwendet. Die mittels co-chromatographierten Referenzsteroiden identifizierten Metabolite sind: ( $\text{P}_5$ ) Pregnenolon und ( $\text{P}_5\text{S}$ ) Pregnenolonsulfat. Die Hirngewebe wurden 90 min, die NNR 30 min inkubiert. Als Kosubstrat wurde  $10 \text{ mM}$  PAPS verwendet.

### 4.3.3. Ausbleibende Metabolisierung von DHEA mittels SULT2

Die verschiedenen Isoenzyme der SULT2 weisen unterschiedliche Substratspezifität auf. Deshalb wurde im nächsten Versuch die Sulfatierung von  $2\mu\text{M}$   $[4\text{-}^{14}\text{C}]\text{-DHEA}$  bestimmt. Untersucht wurde das Vorkommen der SULT2-Enzymaktivität in Gesamthomogenat, sowie Kern-, Mikrosomen- und Zytosolfractionen aus dem Temporallappengewebe einer 33jährigen Frau und eines 34jährigen Mannes. Als Positivkontrolle wurde eine Zytosolfraction aus NNR-Gewebe eines 51jährigen Mannes verwendet. (Proteinmengen im Hirngewebe der Frau: Gesamthomogenat 2248  $\mu\text{g}$ , Kernfraktion 454  $\mu\text{g}$ , Mikrosomenfraktion 342  $\mu\text{g}$ , Zytosolfraction 546  $\mu\text{g}$ , im Hirngewebe des Mannes: Gesamthomogenat 2648  $\mu\text{g}$ , Kernfraktion 538  $\mu\text{g}$ , Mikrosomenfraktion 556  $\mu\text{g}$ , Zytosolfraction 460  $\mu\text{g}$ , in NNR: 42  $\mu\text{g}$ ). Um sicher zu stellen, dass das Kosubstrat definitiv in ausreichend hoher Menge in den Inkubationsansätzen vorhanden war, wurde die Konzentration von PAPS auf 50 mM erhöht. Die Inkubation wurde wie unter 3.6.1.3. beschrieben (Inkubationsdauer Hirngewebe 90 min, NNR 30 min) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Auch DHEA wurde in keiner der untersuchten Hirngewebe-Fractionen mittels SULT2-Aktivität metabolisiert. In der Positivkontrolle konnte die SULT2-Aktivität gezeigt werden und beweist die Funktionsfähigkeit des Testsystems (siehe Abb.18).

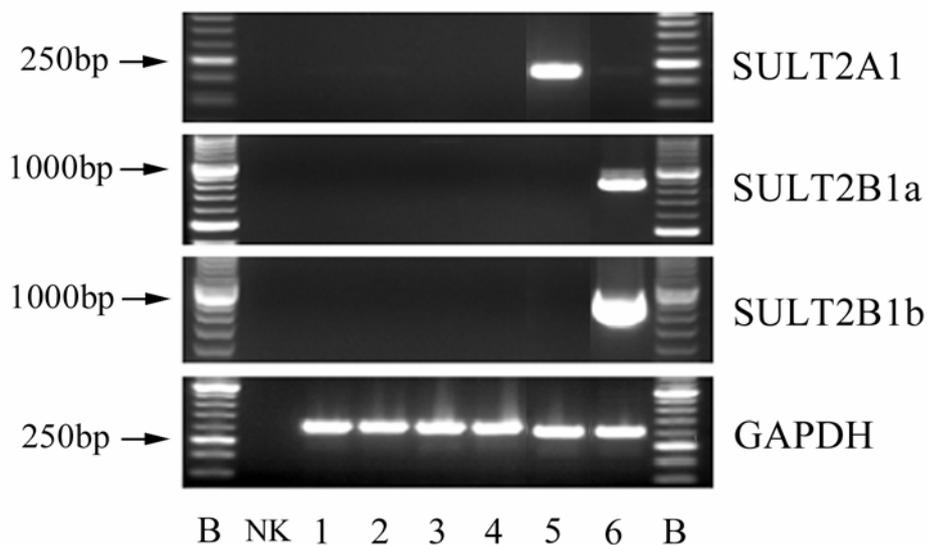


**Abb.18 Auch [4-<sup>14</sup>C]-DHEA wird nicht mittels SULT2-Aktivität in Gesamthomogenat und Zellfraktionen des menschlichen Temporallappens umgewandelt.** Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm der [<sup>14</sup>C]-Radiosignale vom Substrat (2 μM [4-<sup>14</sup>C]-DHEA) und Metabolit nach eindimensionaler DC und zweidimensionaler RDA. Untersucht wurde die SULT2-Aktivität einer (K) Kontrollinkubation ohne Gewebe und Inkubationen aus (H) Gesamthomogenat (2248 μg Protein), (Ke) Kern- (538 μg Protein), (Mi) Mikrosomen- (556 μg Protein) und (Zy) Zytosolfraktion (460 μg Protein) des Temporallappens eines 34jährigen Mannes und einer 33jährigen Frau (Proteinmengen: Gesamthomogenat 2248 μg, Kernfraktion 454 μg, Mikrosomenfraktion 342 μg, Zytosolfraktion 546 μg). Die (NN) Zytosolfraktion von NNR eines 51jährigen Mannes (42 μg Protein) wurde als Positivkontrolle verwendet. Die mittels co-chromatographierten Referenzsteroiden identifizierten Metabolite sind: (D) DHEA und (DS) DHEAS. Die Hirngewebe wurden 90 min, die NNR 30 min inkubiert. Als Kosubstrat wurde 50 mM PAPS verwendet.

#### 4.3.4. Fehlende SULT2A1, SULT2B1a und SULT2B1b mRNA-Expression im menschlichen Temporallappen

Die Untersuchung der mRNA-Expression aller in Frage kommender SULT2-Isoenzyme im menschlichen Gehirn erfolgte mittels RT-PCR-Analyse in grauer und weißer Substanz aus Temporallappengewebe von Frauen und Männern. Dafür wurde total-cDNA von 8 Frauen (im Alter von 11-60 Jahren) und 8 Männern (im Alter von 5-58 Jahren) gepoolt. Als Positivkontrollen wurde total-cDNA aus NNR und Plazenta-Gewebe verwendet. Die Amplifikation der SULT2

mRNA-Sequenz mittels PCR erfolgte mit spezifischen Primern (Tab.1), die für die SULT2A1 ein 228 Basenpaare, für die SULT2B1a ein 859 Basenpaare und für die SULT2B1b ein 901 Basenpaare großes Produkt ergeben. Zur Kontrolle der cDNA Qualität der verschiedenen Proben wurde das Housekeeping-Gen GAPDH amplifiziert. Im Hirngewebe konnte keine Expression von SULT2A1, SULT2B1a und SULT2B1b festgestellt werden (siehe Abb.19). In der NNR-Positivkontrolle konnte dagegen die mRNA-Expression von SULT2A1 nachgewiesen werden. Im Plazenta-Gewebe wird hingegen SULT2B1a und SULT2B1b exprimiert. Der Nachweis von GAPDH-Expression in allen Geweben bestätigte die Intaktheit total-cDNA Proben.

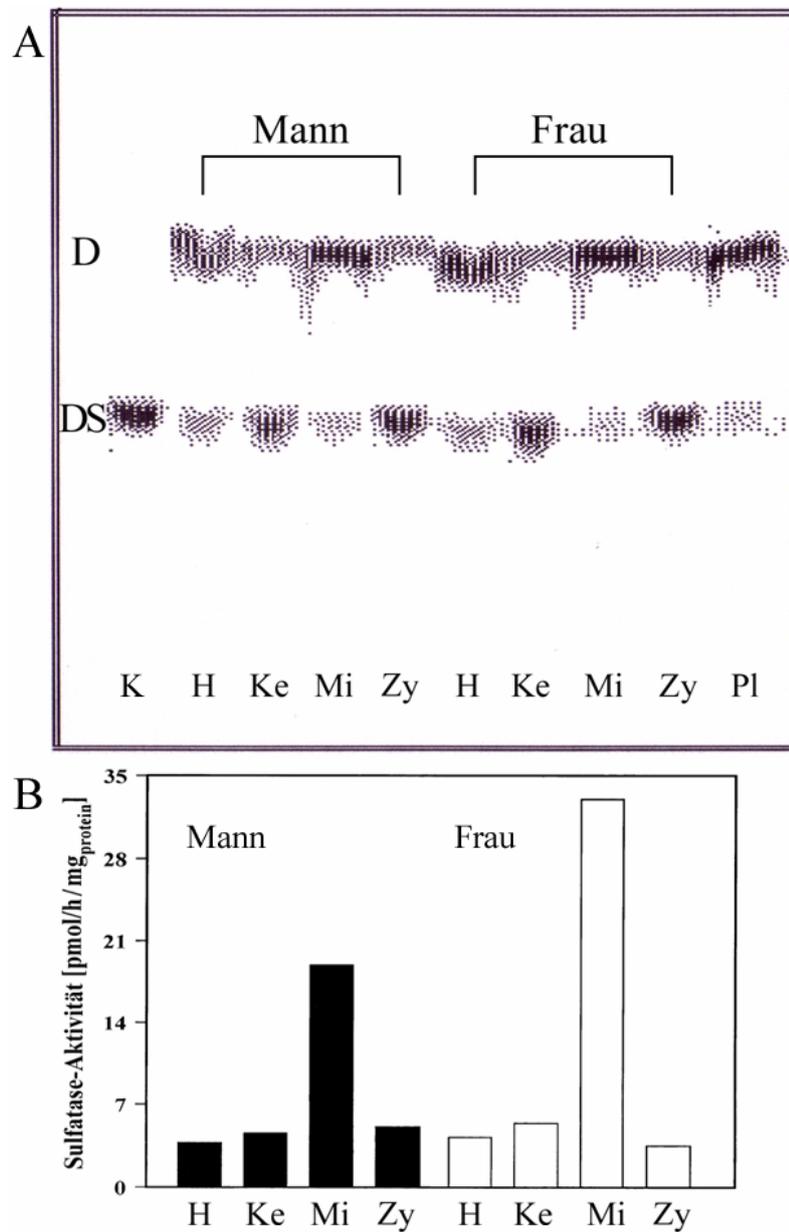


**Abb.19 Fehlende SULT2 mRNA-Expression im menschlichen Gehirn.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der RT-PCR-Analyse nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel unter UV-Licht. Untersucht wurde die SULT2 mRNA-Expression im Temporallappengewebe aus gepoolten Proben von 8 Frauen (Alter: 11-60 Jahre) und 8 Männern (Alter: 5-58 Jahre). (NK) Negativkontrolle ohne cDNA. Fehlende SULT2 mRNA-Expression in (1) grauer und (2) weißer Substanz der männlichen Temporallappen, sowie (3) grauer und (4) weißer Substanz der weiblichen Temporallappen. Die SULT2A1 wird in (5) NNR, die SULT2B1-Isoenzyme in (6) Plazenta exprimiert. Außerdem wurde die Expression des GAPDH-Housekeeping-Gens zur Bestätigung der erhaltenen cDNA-Qualität untersucht. Zur Abschätzung der Größe der PCR-Produkte sind die (bp) Basenpaare der (B) Basenpaarleiter (Längenstandard) angegeben.

#### **4.4. Untersuchung der Steroid-Sulfatase (STS)-Aktivität und Genexpression im menschlichen Gehirn**

##### **4.4.1. Hohe STS-Aktivität im menschlichem Gehirn**

Für den quantitativen Nachweis der STS-Aktivität wurden Gesamthomogenat, sowie Kern-, Mikrosomen- und Zytosolfraktion aus menschlichem Temporallappengewebe (Verhältnis grauer zu weißer Substanz 1:1) einer 33jährigen Frau und eines 34jährigen Mannes mit 0,1  $\mu\text{M}$  [1,2,6,7- $^3\text{H}$ ]-DHEAS inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Gesamthomogenat aus Plazenta einer 28jährigen Frau verwendet. Die Inkubation erfolgte wie unter 3.6.1.4. beschrieben, die Auftrennung von Substrat und Produkt wurde mit der unter 4.3.1. beschriebenen DC-Methode durchgeführt. Anschließend erfolgte sowohl die ein- als auch zweidimensionale RDA. In allen Zellfraktionen des Temporallappens wurde das Vorhandensein der STS-Aktivität festgestellt (siehe Abb.20 A). Zu einer Anreicherung der Enzymaktivität gegenüber dem Gesamthomogenat kam es in der mikrosomalen Fraktion (siehe Abb.20 B). Die Messung der Enzymaktivität erfolgte mittels eindimensionaler RDA.

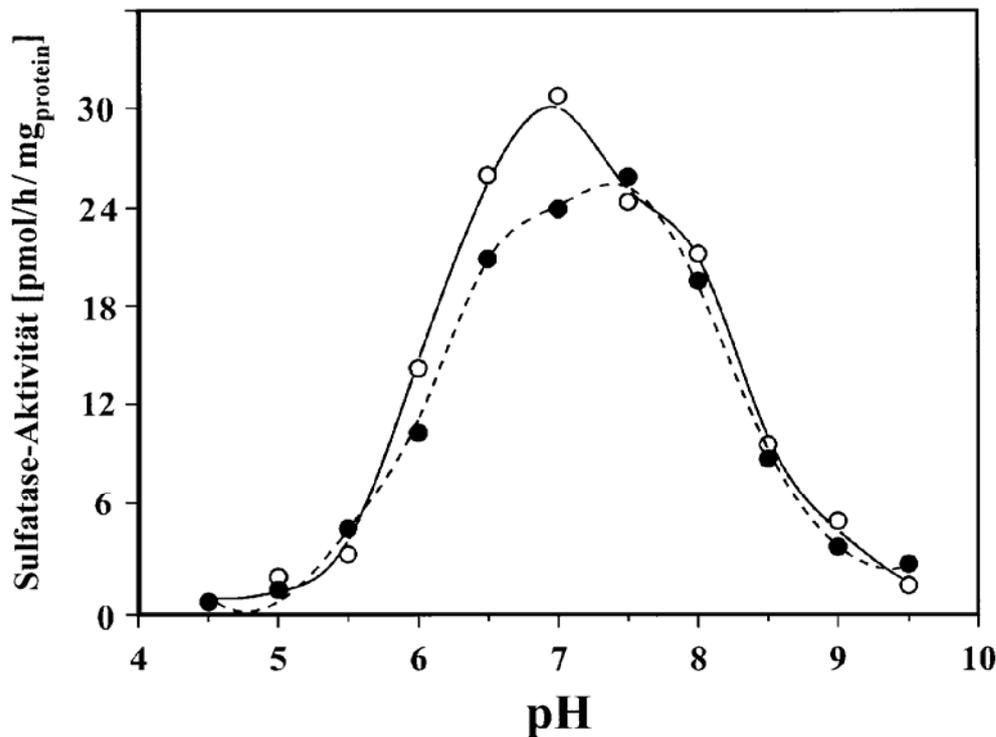


**Abb.20 STS-Aktivität in den Zellfraktionen des menschlichen Temporallappen.** Der obere Teil (A) des Bildes zeigt das Autoradiogramm der [ $^3\text{H}$ ]-Radiosignale des Substrates (0,1  $\mu\text{M}$  [1,2,6,7- $^3\text{H}$ ]-DHEAS) und des Metaboliten in (K) Kontrollprobe ohne Gewebe, (H) Gesamthomogenat, (Ke) Kernfraktion, (Mi) Mikrosomenfraktion, (Zy) Zytosol eines 34jährigen Mannes, Gesamthomogenat (H), Kernfraktion (K), Mikrosomenfraktion (Mi), Zytosol (Zy) einer 33jährigen Frau und in Gesamthomogenat von Plazenta einer 28jährigen Frau. Durch die angefärbten und co-chromatografierten Referenzen konnte DHEAS (DS) und DHEA (D) zugeordnet werden. Der untere Teil (B) der Abbildung zeigt die dazu gehörige Aktivitätsmessung der STS in den genannten Proben. Die Aktivitätsmessung erfolgte mittels eindimensionaler RDA.

#### 4.4.2. Charakterisierung der zerebralen STS-Aktivität

##### 4.4.2.1 pH-Optimum der zerebralen STS-Aktivität

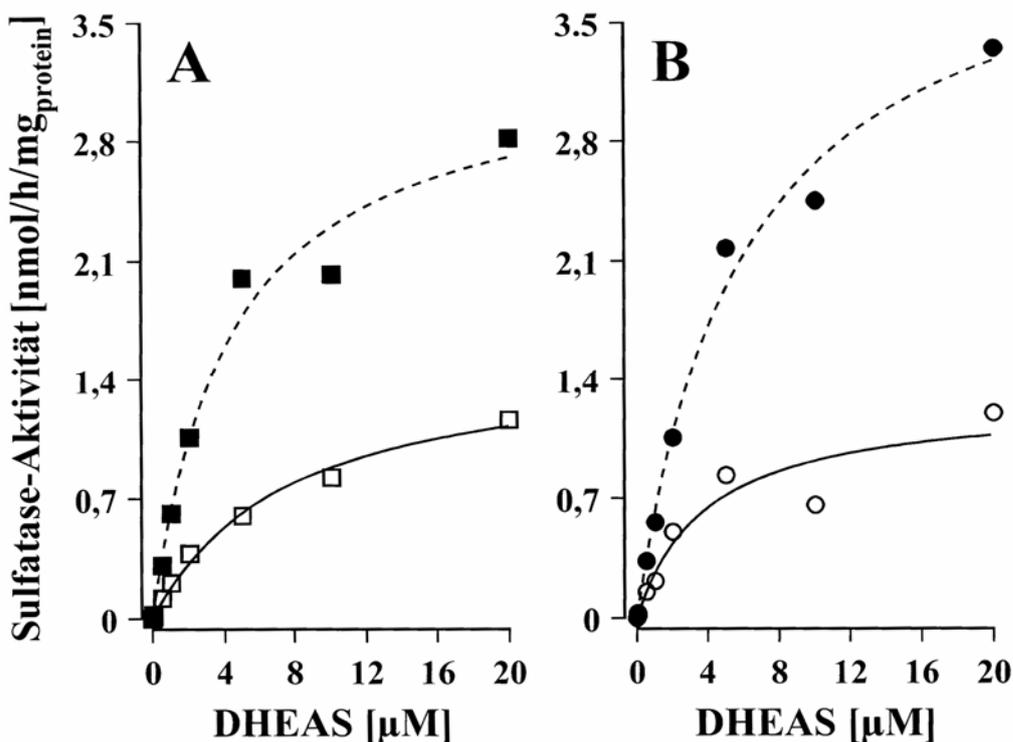
Zur genaueren Charakterisierung der zerebralen STS wurde zunächst das pH-Optimum des Enzyms bestimmt. Es wurden zellfreie Überstände aus Temporallappengewebe (graue und weiße Substanz im Verhältnis 1:1) einer 19jährigen Frau und eines 31jährigen Mannes verwendet. Um den optimalen pH-Wert des Enzyms zu ermitteln, wurde die STS-Aktivität bei verschiedenen, regelmäßig ansteigenden pH-Werten gemessen (pH 4,5 bis pH 9,5). Die zellfreien Überstände wurden mit  $0,05 \mu\text{M}$   $[1,2,6,7\text{-}^3\text{H}]\text{-DHEAS}$  für 90 min inkubiert. Wie in Abb.21 grafisch dargestellt, wurde in beiden Geweben ein pH-Optimum der zerebralen STS von  $\sim \text{pH } 7,5$  festgestellt. Die stärkste STS-Aktivität wurde im Temporallappen des Mannes bei pH 7,5 und bei der Frau bei pH 7,0 gemessen.



**Abb.21 pH-Optimum der STS-Aktivität im menschlichen Temporallappen.** Die Abhängigkeit der zerebralen STS-Aktivität von der Protonenkonzentration im Inkubationsansatz, wurde in zellfreien Überständen aus Temporallappengewebe einer 19jährigen Frau (offene Kreise) und eines 31jährigen Mannes (geschlossene Kreise) untersucht. Alle Inkubationsansätze enthielten  $0,01 \mu\text{M}$   $[1,2,6,7\text{-}^3\text{H}]\text{-DHEAS}$ .

#### 4.4.2.2. Kinetische Parameter der zerebralen STS

Die kinetischen Parameter der zerebralen STS wurden in zellfreien Überständen aus grauer und weißer Substanz des Temporallappens einer 18jährigen Frau und eines 30jährigen Mannes untersucht. Dazu wurde die STS-Aktivität bei Substratkonzentrationen von 0,05 bis 20  $\mu\text{M}$  DHEAS gemessen. Die Computer-unterstützte Datenanalyse ergab für die von der STS katalysierte Reaktion in grauer Substanz einen  $K_m$ -Wert von 4,4  $\mu\text{M}$  beim Mann und von 5,9  $\mu\text{M}$  bei der Frau, in weißer Substanz 7,4  $\mu\text{M}$  (Mann) bzw. 4,3  $\mu\text{M}$  (Frau). Die zugehörigen  $V_{\text{max}}$ -Werte waren in grauer Substanz beim Mann 3,5  $\text{nmol/h/mg}_{\text{Protein}}$  bzw. 4,4  $\text{nmol/h/mg}_{\text{Protein}}$  bei der Frau, in weißer Substanz 1,6  $\text{nmol/h/mg}_{\text{Protein}}$  (Mann) bzw. 1,5  $\text{nmol/h/mg}_{\text{Protein}}$  (Frau). Es wurden also in allen Geweben ähnliche  $K_m$ -Werte festgestellt, wobei die gemessenen  $V_{\text{max}}$ -Werte in grauer Substanz deutlich höher waren als in der weißen Substanz (siehe Abb.22).



**Abb.22 Untersuchung der kinetischen Parameter der zerebralen STS.** Die Enzymaktivität der STS wurde in zellfreien Überständen aus grauer (geschlossene Symbole) und weißer (offene Symbole) Substanz eines 31jährigen Mannes (A, Quadrate) und einer 19jährigen Frau (B, Kreise) bei ansteigender DHEAS-Konzentration gemessen.

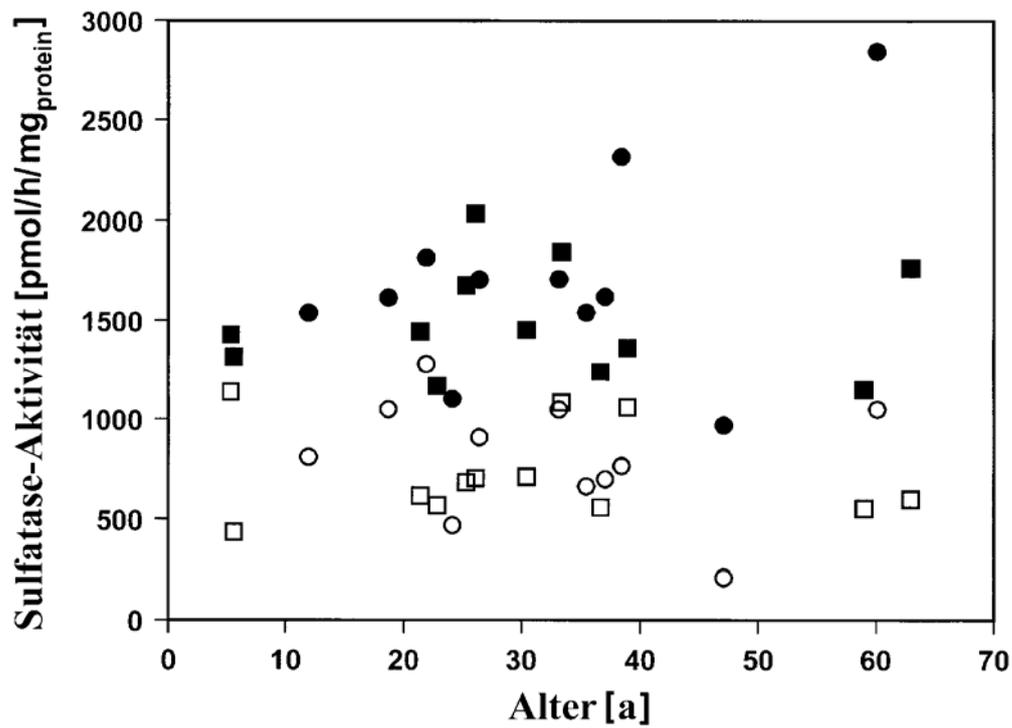
#### 4.4.2.3. Alters- und geschlechtsspezifische STS-Aktivität in grauer und weißer Substanz des menschlichen Temporallappens

Um alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede der Sulfatase-Aktivität im Temporallappen zu bestimmen, wurden zellfreie Überstände aus Temporallappengewebe von 11 weiblichen (Alter 11 bis 60 Jahre) und 12 männlichen (Alter 5 bis 62 Jahre) Patienten untersucht. Dazu wurde der Umsatz von 5  $\mu$ M DHEAS sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz bestimmt.

Die Untersuchungen zeigten weder einen alters- noch einen geschlechtsspezifischen signifikanten Unterschied.

Der durchschnittliche Umsatz im Temporallappen der Frauen betrug  $1,71 \pm 0,52$  nmol/h/mg<sub>Protein</sub> in grauer und  $0,81 \pm 0,30$  nmol/h/mg<sub>Protein</sub> in weißer Substanz. Im Temporallappen der Männer betrug die durchschnittliche STS-Aktivität  $1,49 \pm 0,28$  nmol/h/mg<sub>Protein</sub> in grauer Substanz und  $0,73 \pm 0,24$  nmol/h/mg<sub>Protein</sub> in weißer Substanz.

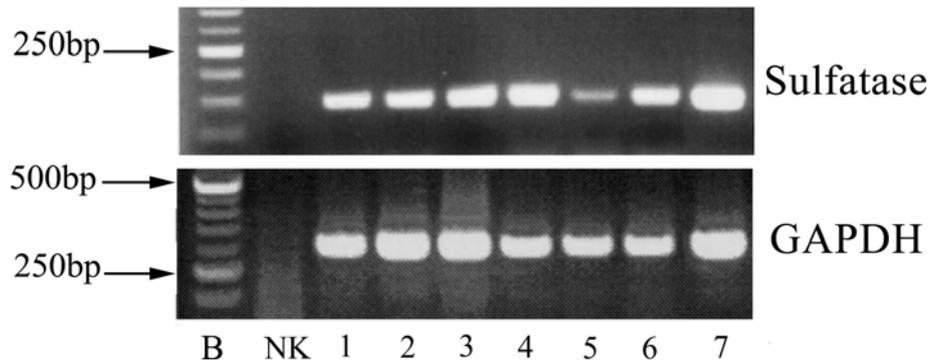
Für die statistische Untersuchung des Unterschiedes in grauer und weißer Substanz, wurden die Werte von Männer und Frauen vereint untersucht, da keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt worden waren. Wie in Abb.23 gezeigt, fand sich hierbei eine hochsignifikant höhere STS-Aktivität ( $P < 0,00005$ ) in der grauen Substanz ( $1,59 \pm 0,42$  nmol/h/mg<sub>Protein</sub>) im Vergleich zur weißen Substanz ( $0,77 \pm 0,27$  nml/h/mg<sub>Protein</sub>).



**Abb.23 Alters- und geschlechtsspezifische STS-Aktivität im menschlichen Temporallappen.** Der Umsatz von 5  $\mu$ M DHEAS wurde in zellfreien Überständen aus grauer (geschlossene Symbole) und weißer Substanz (offene Symbole) des Temporallappens von 11 Frauen (Kreise) und 12 Männern (Quadrate) untersucht. Es konnten keine alters- bzw. geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt werden, wohl aber eine hochsignifikant höhere ( $P < 0,00005$ ) STS-Aktivität in grauer Substanz im Vergleich zur weißen Substanz.

#### 4.4.3. STS-mRNA Expression im menschlichen Gehirn

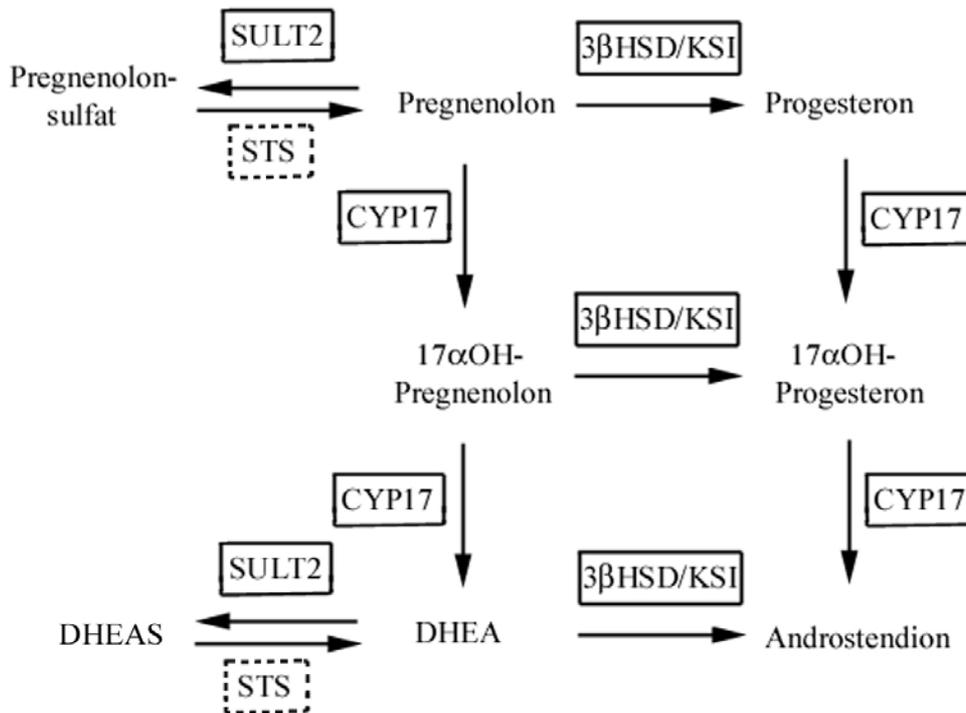
Für die Untersuchung der mRNA-Expression im menschlichen Gehirn wurde zunächst total-RNA von weißer und grauer Substanz aus dem Temporallappen von 8 Frauen (im Alter von 11-60 Jahren) und 8 Männern (im Alter von 5-58 Jahren) in cDNA umgeschrieben und gepoolt. Mit spezifischen Primern wurde dann mittels der PCR ein 148 Basenpaare großes Stück der cDNA-Sequenz der STS amplifiziert. Als Positivkontrolle diente total-cDNA aus Plazenta. Wie in Abb.24 zu sehen, konnte in allen Gewebeproben eine Expression der STS nachgewiesen werden. Die Untersuchung der GAPDH Housekeeping-Gen-Expression verifiziert die Qualität der verwendeten mRNA-Proben.



**Abb.24 mRNA-Expression der STS im menschlichen Gehirn.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der RT-PCR-Analyse nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel unter UV-Licht. Untersucht wurde die STS mRNA-Expression im Temporallappengewebe aus gepoolten Proben von 8 Frauen (Alter: 11-60 Jahre) und 8 Männern (Alter: 5-58 Jahre). (NK) Negativkontrollprobe ohne cDNA. STS mRNA-Expression in (1) grauer und (2) weißer Substanz des Temporallappens sowie des (3) Hippocampus des Mannes und der (4) grauen und (5) weißen Substanz des Temporallappens sowie (6) Hippocampus der Frau und in (7) Plazenta. Untersucht wurde auch die Expression des GAPDH-Housekeeping-Gens, zur Überprüfung der Qualität der cDNA-Proben. Zur Abschätzung der Größe der PCR-Produkte sind die (bp) Basenpaare der (B) Basenpaarleiter (Längenstandard) angegeben.

## 5. Diskussion

### 5.1. Fehlende *de novo* Biosynthese von DHEA im menschlichen Temporallappen



**Abb.25** Syntheseweg der Steroidhormone mit den in dieser Arbeit untersuchten **Enzymen:** CYP17, 3βHSD/KSI, (SULT2) Steroid-Sulfotransferase, (STS) Steroid-Sulfatase. Das im Temporallappen des Menschen nachgewiesene Enzym STS ist gestrichelt eingezeichnet, die übrigen Enzyme konnten nicht nachgewiesen werden.

Steroidhormone und neuroaktive Steroidhormonabkömmlinge beeinflussen die Funktionen des Gehirns auf klassischem Weg durch Bindung an intrazelluläre transaktivierende Steroidhormonrezeptoren [Beato et al. 1996] und/oder auf nicht genomischen Weg durch Interaktionen mit ligandengesteuerten Ionenkanälen [Majewska et al. 1986]. Steroide die nicht in peripheren Drüsen sondern im Gehirn aus Cholesterin gebildet werden, bezeichnet man als sogenannte „Neurosteroide“. Frühere Publikationen wiesen auf eine Bildung von DHEA im zentralen Nervensystem hin: Im ZNS von Laborratten wurde auch nach einer Ovariectomie/Adrenectomie eine andauernde, relativ hohe Konzentration von DHEA beobachtet, während die DHEA-Konzentration in anderen Geweben schnell abnahm [Baulieu und Robel

1990]. Es wurde daher vermutet, dass es im Gehirn zu einer *de novo* Biosynthese von DHEA aus Cholesterin kommt. Andererseits konnte in diesen Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden, dass die andauernd hohen zerebralen DHEA-Werte nur eine lang andauernde Speicherung von DHEA im ZNS widerspiegeln. In der hier vorgelegten Arbeit sollte daher zunächst systematisch die Fähigkeit des menschlichen Gehirns zur Bildung von DHEA (und seinem Sulfatester DHEAS) untersucht werden.

Ein Schlüsselenzym für die Neusynthese von DHEA ist CYP17. Das Enzym katalysiert NADPH-abhängig die Umwandlung des  $^{12}\text{C}$ -19- $\Delta^5$ -Steroids Pregnenolon in das  $^{12}\text{C}$ -17- $\Delta^4$ -Steroid DHEA (siehe Abb.1). Die bisherigen Arbeiten zur zerebralen CYP17-Expression ergaben kein eindeutiges Ergebnis. Im ZNS von embryonalen und adulten Ratten wurde eine CYP17-mRNA-Expression mittels hochzyklus RT-PCR-Analysen nachgewiesen [Compagnone et al. 1995; Sanne und Krueger 1995b; Strömstedt und Waterman 1995]. Außerdem gelang offenbar der immunzytochemische Nachweis des Proteins im Hippocampus von embryonalen Mäusen [Compagnone et al. 1995]. In Zellkulturen aus isolierten und kultivierten neuronalen Zellen neonataler Ratten und Mäuse wurden die mRNA-Expression und die Enzymaktivität der CYP17 nachgewiesen [Zwain und Yen 1999]. Diese Zellen wurden aber über einige Tage kultiviert und sind somit nicht mit *in vivo* Situation vergleichbar. Bei diesem Versuch wurden beispielsweise die Mikrogliazellen entfernt, die möglicherweise *in vivo* die Expression der CYP17 supprimieren. Eine ganze Reihe andere Autoren konnte dagegen eine zerebrale Expression der CYP17 nicht bestätigen. So konnte die CYP17 im Gehirn der Ratte weder immunhistochemisch nachgewiesen werden [Le Goascogne et al. 1991], noch wurde eine mRNA-Expression der CYP17 im Rattengehirn und in Gliazellkulturen festgestellt [Mellon und Deschepper 1993; Akwa et al. 1991]. Bei *in vitro* Untersuchungen der Enzymaktivität in Homogenaten aus adulten Rattengehirnen wurde ebenfalls keine Bildung von DHEA aus Pregnenolon nachgewiesen [Baulieu und Robel 1998]. Frühe Untersuchungen an fötalem menschlichen Gehirn wiesen ebenfalls keine Umwandlung von  $^{12}\text{C}$ -19-Steroide in  $^{12}\text{C}$ -17-Steroide mittels der CYP17 nach [Mickan 1972].

Zur Klärung der Frage, ob DHEA im Gehirn synthetisiert wird, wurde in dieser Arbeit die NADPH-abhängige Metabolisierung von Pregnenolon im menschlichen Temporallappen, Parahippocampus und Hippocampus, sowie in Hirngewebeproben neonataler und adulter Ratten und Mäuse untersucht. Zur Verifizierung der Enzymaktivitäts-Messung wurde außerdem die mRNA-Expression der CYP17 bestimmt. Weder im menschlichen Hirngewebe, noch in dem von

Ratten und Mäusen (verschiedener Entwicklungsstadien) konnte die CYP17-Enzymaktivität gemessen werden (Abb.3 & 5-8). Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf bis zu 4 h, die Zugabe von DTE (Schutz enzymaler Sekundärstrukturen vor Oxidation) und Erhöhung der Proteinmenge im Ansatz, ergaben keine feststellbare CYP17-Aktivität (Abb.6). Damit übereinstimmend konnte außerdem eine mRNA-Expression der CYP17 mittels RT-PCR-Analyse ausgeschlossen werden (Abb.9). Die Ergebnisse der hier vorgestellten systematisch durchgeführten Untersuchungen weisen eindeutig darauf hin, dass es im ZNS des Menschen zu keiner nachweisbaren Expression der CYP17 kommt. Somit kann auch eine zerebrale *de novo* Biosynthese von DHEA(S) aus Cholesterin ausgeschlossen werden. Die NADPH-abhängige Bildung eines von uns beobachteten, aber nicht identifizierten polaren Metaboliten mit einem ähnlichen  $R_f$ -Wert wie  $17\alpha$ -OH-Pregnenolon im Hirngewebehomogenat der Maus (siehe Abb.8) kann durchaus für die Publikation falsch positiver CYP17-Aktivität in zerebralen Proben verantwortlich sein.

## **5.2. Fehlende *de novo* Biosynthese von Androgenen, Östrogenen, Mineralo- und Glukokortikoiden im menschlichen Gehirn**

Besonders den Sexualhormonen wird eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Gehirnfunktionen zugeschrieben [Toran-Allerand 1978; Hutchinson 1991]. Die hohe DHEA Konzentration im menschlichen Gehirn [Guazzo 1996] und der zerebrale Nachweis von am Androgen- und Östrogenstoffwechsel beteiligten Enzymen [Steckelbrock et al. 1999; Steckelbrock et al. 2002], gaben Anlass zu der Vermutung, dass es im Gehirn möglicherweise zu einer Biosynthese von Sexualsteroiden aus DHEA kommt. In früheren Versuchen wurde die Aktivität des dafür verantwortlichen Schlüsselenzyms, der  $3\beta$ -HSD/KSI (siehe Abb.1) in *in vitro* Versuchen mit Hirngewebehomogenaten adulter Ratten nachgewiesen [Weidenfeld et al. 1980]. Die  $3\beta$ -HSD/KSI katalysiert die  $NAD^+$ -abhängige Umwandlung von  $\Delta^5$ -3-oxo-Steroide in  $\Delta^4$ -3-hydroxy-Steroide. Weiterhin wurde der immunhistochemische Nachweis der  $3\beta$ -HSD/KSI im Rattenhirn mittels In-situ-Hybridisation erbracht [Dupont et al.1994]. Die mRNA-Expression und Enzymaktivität der  $3\beta$ -HSD/KSI konnten außerdem in Zellkulturexperimenten mit primären Rattenhirnzellen nachgewiesen werden [Jung-Testas et al. 1989; Guennoun et al. 1995; Sanne und Krueger 1995a].

Diese Daten der  $3\beta$ -HSD/KSI-Expression im Gehirn der Ratte stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Ein  $\text{NAD}^+$ -abhängiger Umsatz von Pregnenolon bzw. DHEA mittels  $3\beta$ -HSD/KSI konnte in keinem der untersuchten menschlichen Hirngewebehomogenate (Temporallappen, Hippocampus, Parahippocampus) festgestellt werden (siehe Abb.10, 12 & 13). Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf bis zu 4 h und eine Erhöhung der Proteinmenge im Inkubationsansatz erbrachte kein anderes Ergebnis (siehe Abb.12). Mittels RT-PCR-Analyse konnte außerdem eine mRNA-Expression der beiden menschlichen  $3\beta$ -HSD/KSI Isoenzyme im Gehirn des Menschen ausgeschlossen werden (siehe Abb.15). Auch in unseren Versuchen mit Hirngewebehomogenaten neonataler und adulter Ratten und Mäuse konnten wir keine Umwandlung von DHEA in Androstendion via zerebraler  $3\beta$ -HSD/KSI-Aktivität nachweisen (siehe Abb.13 & 14). Wiederum wurde besonders bei der Maus eine Umwandlung des  $\Delta^5$ -Steroids in polare Metabolite beobachtet. Dies kann nur nach einer Umwandlung von  $\text{NAD}^+$  in NADH erfolgen. Daher muss es in den Hirngewebehomogenaten zu einer allmählichen Umwandlung von  $\text{NAD}^+$  in NADH kommen, was möglicherweise den Nachweis geringster  $3\beta$ -HSD/KSI-Aktivität beeinträchtigt. Nach unseren Arbeiten kommt es weder im menschlichen Gehirn, noch im Gehirn von Ratten und Mäusen (verschiedener Entwicklungsstadien) zu einer messbaren Expression der  $3\beta$ -HSD/KSI. Dies bedeutet, dass im menschlichen Gehirn auch das zweite Schlüsselenzym zur *de novo* Biosynthese von Steroidhormonen fehlt. Folglich kommt es im ZNS nicht zu einer Bildung von Androgenen, Östrogenen, Mineralo- und Glukokortikoiden aus Cholesterin. Darüber hinaus kann auch die zerebrale Bildung von Androgenen und Östrogenen, aus zirkulierenden DHEA(S), nach Aufnahme ins ZNS ausgeschlossen werden.

### **5.3. Fehlende Steroid-Sulfotransferase-Aktivität im menschlichen Temporallappen**

DHEA und DHEAS üben selbst wichtige, oft entgegengesetzte Funktionen auf die Abläufe im ZNS aus [Friess et al. 1995; Majewska et al. 1990; Zinder und Dar 1999]. Obwohl es offensichtlich nicht zu einer zerebralen *de novo* Biosynthese von DHEA kommt (siehe 5.1.), kann DHEA und vor allem DHEAS aus der Zirkulation aufgenommen werden. Insbesondere Menschen und einige höhere Primaten weisen extrem hohe DHEA(S)-Serum Spiegel auf [Cutler et al. 1978; Guazzo et al. 1996]. Betrachtet man die hohe DHEA/DHEAS Relation des menschlichen Gehirns im Vergleich zu den Serum-Werten, (DHEA/DHEAS-Relation im Serum

0,01; DHEA/DHEAS-Relation im Liquor 0,52 [Guazzo et al. 1996]), ist zu vermuten, dass es im menschlichen ZNS zu einer Anreicherung von DHEA (im Vergleich zu DHEAS) kommt.

In den letzten Jahren konnte die zerebrale Expression mehrerer membrangebundener Transportmoleküle für organische Anionen wie z.B. DHEAS und Cholesterolsulfate nachgewiesen werden. Somit ist vermutlich ein Transport von z.B. DHEAS durch die BHS möglich. Eine Regulation des Verhältnisses von DHEA und DHEAS ist vermutlich entscheidend für deren zerebrale Aktivität. Dieses wird mutmaßlich mittels Steroid-Sulfatase-Aktivität (STS, Hydrolyse der Sulfatesterbindung von DHEAS) und Steroid-Sulfotransferase-Aktivität (SULT2, Sulfatierung von DHEA) eingestellt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde im Rahmen dieser Arbeit daher die Enzymaktivität und mRNA-Expression der STS und SULT2 untersucht.

Wiederum waren die bis dato veröffentlichten Ergebnisse nicht eindeutig und widersprüchlich. So wurden die beiden SULT2-Isoenzyme SULT2A1 und SULT2B1 mittels Northern-Blot-Analysen in verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns nachgewiesen [Shimizu und Tamura 2002]. Die Autoren verzichteten jedoch auf eine Positivkontrolle, und das detektierte, schwache Signal des Northern-Blots von ca. 1,2-kb entspricht in seiner Größe nicht dem zuvor veröffentlichten plazentaren Northern-Blot-Signal von ca. 1,4-kb [Her et al. 1998]. Andere Autoren fanden eine mRNA-Expression der SULT2A1 und SULT2B1 mittels Hochzyklus-RT-PCR-Analyse in nicht weiter spezifiziertem menschlichen Hirngewebe [Geese und Raftogianis 2001; Javitt et al. 2001]. Eine Reihe anderer publizierter Northern-Blot-Studien zur Expression der SULT2-Isoenzyme in menschlichen Geweben konnte dagegen keine zerebrale mRNA-Expression der entsprechenden Gene im menschlichen ZNS nachweisen [Falany et al. 1995; Her et al. 1998; Meloche und Falany 2001]. Außerdem war bis dato keine Arbeit zur SULT2-Aktivität im ZNS veröffentlicht worden.

In den in dieser Arbeit untersuchten menschlichen Hirngewebeproben, konnten wir weder mit Pregnenolon, noch mit DHEA als Substrat (siehe Abb.1) eine PAPS-abhängige Steroid-Sulfotransferase-Aktivität feststellen. Auch eine Erhöhung der Kosubstrat-Konzentration (auf 50 mM) und eine Inkubation subzellulärer Fraktionen erbrachten keine zerebrale SULT2-Aktivität (siehe Abb.18). Das Fehlen der SULT2-Expression konnte in nachfolgenden RT-PCR-Untersuchungen bestätigt werden. In diesen Versuchen konnte weder die mRNA-Expression der SULT2A1, noch der SULT2B1 Isoenzyme in menschlichem Hirngewebe nachgewiesen werden (siehe Abb.19).

Das Fehlen der 3-Hydroxysteroid sulfatierenden SULT2-Isoenzyme im menschlichen Hirngewebe bedeutet, dass die Balance zwischen DHEA und DHEAS nicht durch eine konzentrierte Aktivität von SULT2 und STS bewerkstelligt wird. Die zerebrale Konzentration von DHEA wird anscheinend über andere metabolische/katabolische Wege kontrolliert. So konnte in den letzten Jahren im menschlichen Gehirn eine intensive Verstoffwechslung von DHEA via Oxysterol-7 $\alpha$ -Hydroxysteroid und 17-Ketosteroid-Reduktase-Aktivität festgestellt werden [Steckelbroeck et al. 2002]. Man kann also vermuten, dass die fehlende Sulfatierung von DHEA im menschlichen ZNS verantwortlich ist für die ca. 50fach höhere DHEA/DHEAS-Relation des ZNS im Vergleich zum Serum [Guazzo et al. 1996].

Aufgrund der fehlenden *de novo* Biosynthese von DHEA im menschlichen Gehirn muss es dann aber zu einer Aufnahme von DHEAS aus dem Blut und einer anschließenden Hydrolyse der Sulfatesterbindung mittels STS-Aktivität kommen.

#### **5.4. Die Steroid-Sulfatase weist hohe zerebrale Aktivität auf**

Nachdem eine Sulfatierung von DHEA im menschlichen Temporallappen ausgeschlossen werden konnte, bleibt also die Frage ob DHEAS via STS-Aktivität in DHEA umgewandelt wird. Untersuchungen mit menschlichen Autopsieproben gaben einen ersten Hinweis auf das Vorkommen von STS-Enzymaktivität im menschlichen Gehirn [Eto et al. 1974].

Zur Aktivitätsbestimmung wurde die Hydrolyse der Sulfatestergruppe von DHEAS mittels STS-Aktivität gemessen. Dabei konnten wir eine relativ hohe STS-Aktivität feststellen (siehe Abb.20-23).

Um die zerebrale Enzymaktivität mit der bekannten plazentaren STS zu vergleichen wurde das zerebrale Enzym im Detail charakterisiert. Dazu wurden die subzelluläre Verteilung, das pH-Optimum und die kinetischen Parameter des Hirnenzyms bestimmt. Wie das plazentare Enzym [Hernandez-Guzman et al. 2001] ist offensichtlich auch das zerebrale Enzym ein membrangebundenes Protein (siehe Abb.20). Außerdem entspricht das pH-Optimum der zerebralen STS (~ 7,5; siehe Abb.21) dem pH-Optimum (~ 7,3) des plazentaren Proteins [Shankaran et al. 1991]. Darüber hinaus ergaben auch die Untersuchungen der kinetischen Parameter eine Übereinstimmung mit der plazentaren STS. Der gemessene mittlere Km-Wert des cerebralen Enzyms von 5,5  $\mu$ M (4,3-7,4  $\mu$ M; siehe Abb.22) stimmt gut mit dem im Plazentahomogenat gemessenen Km-Wert von 5,88  $\mu$ M überein [Hernandez-Guzman et al.

2001]. Der Vergleich der  $V_{\max}$ -Werte im Hirngewebehomogenat (3,5 & 4,4 nmol/h/mg<sub>Protein</sub>) in grauer Substanz bzw. (1,6 & 1,5 nmol/h/mg<sub>Protein</sub>) in weißer Substanz und im Plazenta-homogenat (1420 pmol/min/mg<sub>Protein</sub> (entspricht 85,2 nmol/h/mg<sub>Protein</sub>); [Haning et al. 1992]) zeigen, dass die Aktivität des Enzyms im Gehirn (graue Substanz) ungefähr 5% der extrem hohen Aktivität in der Plazenta beträgt.

Der  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Wert der zerebralen STS wurden mit Hilfe einer Computer-unterstützten nicht regressiven Regressionsanalyse erstellt.

Die im menschlichen Temporallappen gemessenen enzymkinetischen Parameter, weisen die gleichen Merkmale auf, wie die der bekannten Steroid-Sulfatase der Plazenta [Hernandez-Guzman et al. 2001; Parenti et al. 1997; Haning et al. 1992; Shankaran et al. 1991]. Die Übereinstimmung der charakteristischen Eigenschaften der zerebralen STS mit den Eigenschaften des plazentaren Enzyms sprechen eindeutig für eine zerebrale Bildung der bekannten menschlichen STS im ZNS. Dies konnte in nachfolgenden RT-PCR-Analysen bestätigt werden (siehe Abb.24). Darüber hinaus ergaben kürzlich durchgeführte quantitative real-time-RT-PCR-Analysen cerebrale Expressionsraten der STS von ungefähr 10% der plazentaren Raten [Steckelbroeck et al. 2004]. Dies stimmt mit den Ergebnissen unserer enzymkinetischen Untersuchungen überein und bestätigt ebenfalls die Verantwortlichkeit der bekannten STS für die gemessene Steroid-Sulfatase-Aktivität im Gehirn des Menschen.

Die nachfolgend durchgeführten Versuche zur geschlechts- bzw. altersabhängigen Expression der STS im menschlichen Gehirn mit Temporallappengewebe von 11 weiblichen (Alter von 11 bis 60 Jahren), sowie 12 männlichen Patienten (Alter von 5 bis 62 Jahren) ergab keine geschlechts- bzw. altersabhängigen Unterschiede (siehe Abb.23).

Es wurde dagegen eine hochsignifikante höhere Enzymaktivität in der grauen Substanz im Vergleich zur weißen Substanz festgestellt. Dieses Ergebnis spricht wegen der zellulären Verteilung in den beiden unterschiedlichen Hirngeweben für eine Expression der STS in Neuronen. Dies konnte in kürzlich durchgeführten immunohistochemischen Analysen mit einem Antiserum gegen die humane STS bestätigt werden [Steckelbroeck et al. 2004].

Demnach kommt es im menschlichen Gehirn zu einer neuronalen Hydrolyse der Sulfatesterbindung von  $\Delta^5$ Steroiden wie DHEAS und Cholesterinsulfate. Beide Steroide kommen im Serum in großer Konzentration vor [Cutler et al. 1978; Guazzo et al. 1996]. Außerdem werden im menschlichen ZNS Transportmoleküle für diese Anionen exprimiert [Gao et al. 2000;

Steckelbroeck et al. 2004], so dass eine Hydrolyse der Sulfatesterbindung nach Aufnahme aus dem Blut vermutet werden kann.

### 5.5. Der zerebrale Stoffwechsel von DHEA/DHEAS

Da bisher kein spezifischer Rezeptor für DHEA bzw. DHEAS bekannt ist, stellt sich daher die Frage, welche Funktionen DHEA(S) im ZNS ausüben. Zum einen werden unterschiedliche nicht genomische Wirkungen von DHEA und DHEAS an Neurotransmitter-Rezeptoren (GABA<sub>A</sub> bzw. NMDA-Rezeptor) vermutet [Majewska et al. 1986; Rupprecht und Holsboer 1999]. Dafür bedarf es aber einer Regulation der DHEA/DHEAS Relationen, was wegen der fehlenden SULT2-Aktivität jedoch nicht möglich ist. Im menschlichen ZNS wurde eine weitere Verstoffwechslung in zwei neuroaktive Metabolite festgestellt [Steckelbroeck et al. 2002]. Diese Metabolite ermöglichen eine indirekte genomische Wirkung von DHEA. Mittels NADPH-abhängiger Oxysterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität (CYP7B1) wird DHEA im menschlichen Gehirn in das Oxysterol-7 $\alpha$ -Hydroxy-DHEA umgewandelt [Steckelbroeck et al. 2002]. Diesem Steroid werden wichtige antiglukokortikoidale/neuro-protektive Eigenschaften zugesprochen [Hampl et al. 1997]. Diese Aktivität vermittelt das Steroid vermutlich, wie auch andere Oxysterole, nach Bindung an einen sogenannten „Orphan Nuclear Receptor“ [Chiang et al. 2002]. Interessanterweise korreliert ein Mangel dieses Oxysterols und eine niedrigere Expression der CYP7B1 im ZNS des Menschen mit der Schwere bzw. der Inzidenz der Alzheimer'schen Erkrankung [Weil-Engerer et al. 2002; Yau et al. 2003]. Außerdem nehmen die hohen DHEAS-Serumspiegel beim Menschen mit dem Alter ab, während die relativ hohen Serumspiegel des neurotoxischen Kortisols gleich bleibend hoch sind [Guazzo et al. 1996]. Es kommt also vermutlich bei niedrigeren DHEA-Serumspiegeln und niedrigerer zerebraler CYP7B1 Expression zu einer dadurch hervorgerufenen niedrigeren zerebralen 7 $\alpha$ -Hydroxy-DHEA Konzentration, bei gleichzeitig unveränderter zerebraler Konzentration von neurotoxischen Kortisol. Deswegen muss ein Zusammenhang zwischen diesen altersabhängigen Prozessen und der Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit vermutet werden.

Ein weiteres im menschlichen ZNS exprimiertes Enzym, eine NADPH-abhängige zytosolische 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase [Steckelbroeck et al. 2002], vermutlich AKR1C3 [Lin et al. 2004], ist für die Umwandlung von DHEA in das am nuklearen Östrogen-Rezeptor östrogenartig wirkende Androstendiol [Ahmed et al. 2002] verantwortlich. Auf diesem

Weg übt DHEA im ZNS vermutlich eine weitere wichtige neuroprotektive Wirkung aus, da Östrogenen eine Reihe neuroprotektiver/neurotropher Funktionen zugeschrieben werden [Carrer et al. 2005; Garcia-Segura et al. 2001].

Außerdem wirkt Androstendiol in Zellkulturexperimenten ebenfalls antiglukokortikoidal/antiinflammatorisch, was aber vermutlich auf einer weiteren Verstoffwechslung in  $7\alpha$ -Hydroxy-Androstendiol beruht [Loria 1997; Padgett und Loria 1994].

## 6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob das menschliche Gehirn zu einer *de novo* Biosynthese von Steroidhormonen befähigt ist. Mit der Aufnahme und Metabolisierung im Blut zirkulierender Hormonvorstufen wurde eine alternative Möglichkeit der zerebralen Bildung von aktiven Steroidhormonen untersucht. Dazu wurden in menschlichen Temporallappen Biopsaten die Enzymaktivität und Genexpression der relevanten Enzyme gemessen.

Die für die *de novo* Biosynthese von DHEA und weiteren Steroidhormonen wichtigsten Schlüsselenzyme (CYP17 und 3 $\beta$ -HSD/KSI) werden nach unseren Untersuchungen im menschlichen Gehirn nicht exprimiert. Somit kann sowohl eine zerebrale Bildung von DHEA mittels CYP17-Aktivität, als auch eine zerebrale Bildung von Progesteron via 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität ausgeschlossen werden. Das bedeutet aber auch, dass im menschlichen ZNS gar keine Steroidhormone neu gebildet werden können, da die Expression der CYP17 und 3 $\beta$ -HSD/KSI notwendige Voraussetzung für die Bildung von Steroidhormonen aller fünf Klassen (Gestagene, Mineralokortikoide, Glukokortikoide, Androgene und Östrogene) ist. Statt dessen kann das Gehirn aber sehr wahrscheinlich wegen der zerebralen Expression verschiedener Membrantransportmoleküle für den Transport organischer Anionen, Steroidsulfate (wie z.B. DHEAS und Cholesterolsulfat) aus dem Blut aufnehmen. Im menschlichen ZNS wird dann mittels hoher neuronaler STS-Aktivität die Sulfatgruppe abgespalten. Die Rückreaktion (Sulfatierung von DHEA) erfolgt nicht, da wir in unseren Untersuchungen die Expression der dafür verantwortlichen SULT2-Isoenzyme ausschließen konnten. Diese Ergebnisse erklären auch die hohen DHEA/DHEAS Relationen im menschlichen ZNS (0,52) im Vergleich zum Serum (0,01), obwohl keine zerebrale *de novo* Biosynthese erfolgt.

Wegen der fehlenden 3 $\beta$ -HSD/KSI-Aktivität im menschlichen Gehirn kann DHEA nach der Aufnahme von DHEAS aus dem Blut und der anschließenden Abspaltung der Sulfatgruppe nicht in Androgene bzw. Östrogene umgewandelt werden.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse dieser Arbeit nach, dass es im menschlichen ZNS zu keiner *de novo* Biosynthese von DHEA und weiteren Steroidhormonen kommt. Das aus der Zirkulation gewonnene DHEA dient vermutlich der Bildung von neuroprotektiven/neurotrophen DHEA-Metaboliten und nicht der zerebralen Bildung von Androgenen/Östrogenen.

## 7. Literaturverzeichnis

**Akwa Y, Young J, Kabbadj K, Sancho MJ, Zucman D, Vourc'h C, Jung-Testas I, Hu ZY, Le Goascogne C, Jo DH, Baulieu EE.** Neurosteroids: biosynthesis, metabolism and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991; 40:71-81.

**Ahmed S, Owen CP, James K, Sampson L, Patel CK.** Review of estrone sulfatase and its inhibitors--an important new target against hormone dependent breast cancer. *Curr Med Chem.* 2002; 9:263-273.

**Baulieu EE, Robel P.** Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1990; 37:395-403.

**Baulieu EE, Robel P.** Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:4089-4091.

**Beato M, Chavez S, Truss M.** Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 1996; 61:240-251.

**Beyenburg S, Stoffel-Wagner B, Watzka M, Blumcke I, Bauer J, Schramm J, Bidlingmaier F, Elger CE.** Expression of cytochrome P450scc mRNA in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Neuroreport.* 1999; 10:3067-3070.

**Birge SJ.** The role of estrogen in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1997; 48 Suppl. 7:S36-41.

**Carrer HF, Cambiasso MJ, Gorosito S.** Effects of estrogen on neuronal growth and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 93:319-323.

**Chiang JY.** Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev.* 2002; 23:443-463.

**Compagnone NA, Bulfone A, Rubenstein JL, Mellon SH.** Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology*. 1995; 136:5212-5223.

**Cutler GB Jr, Glenn M, Bush M, Hodgen GD, Graham CE, Loriaux DL.** Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates. *Endocrinology*. 1978; 103:2112-2118.

**Dupont E, Simard J, Luu-The V, Labrie F, Pelletier G.** Localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain as studied by in situ hybridization. *Mol Cell Neurosci*. 1994; 5:119-123.

**Eto Y, Rampini S, Wiesmann U, Herschkowitz NN.** Enzymic studies of sulphatases in tissues of the normal human and in metachromatic leukodystrophy with multiple sulphatase deficiencies: arylsulphatases A, B and C, cerebroside sulphatase, psychosine sulphatase and steroid sulphatases. *J Neurochem*. 1974; 23:1161-1170.

**Falany CN, Comer KA, Dooley TP, Glatt H.** Human dehydroepiandrosterone sulfotransferase. Purification, molecular cloning, and characterization. *Ann N Y Acad Sci*. 1995; 774:59-72.

**Friess E, Trachsel L, Guldner J, Schier T, Steiger A, Holsboer F.** DHEA administration increases rapid eye movement sleep and EEG power in the sigma frequency range. *Am J Physiol*. 1995; 268(1 Pt 1):E107-113.

**Gao B, Hagenbuch B, Kullak-Ublick GA, Benke D, Aguzzi A, Meier PJ.** Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 294:73-79.

**Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL.** Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*. 2001; 63:29-60.

**Geese WJ, Raftogianis RB.** Biochemical characterization and tissue distribution of human SULT2B1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 288:280-289.

**Guazzo EP, Kirkpatrick PJ, Goodyer IM, Shiers HM, Herbert J.** Cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate in the cerebrospinal fluid of man: relation to blood levels and the effects of age. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81:3951-3960.

**Guennoun R, Fiddes RJ, Gouezou M, Lombes M, Baulieu EE.** A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase (3 beta-HSD), is expressed in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995; 30:287-300.

**Hagenbuch B, Gao B, Meier PJ.** Transport of xenobiotics across the blood-brain barrier. *News Physiol Sci.* 2002; 17:231-234.

**Hagenbuch B, Meier PJ.** The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1609:1-18.

**Hampl R, Morfin R, Starka L.** 7-Hydroxylated derivatives of dehydroepiandrosterone: what are they good for? *Endocr Regul.* 1997; 31:211-218.

**Haning RV Jr, Hackett RJ, Canick JA.** Steroid sulfatase in the human ovary and placenta: enzyme kinetics and phosphate inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992; 41:161-165. Erratum in: *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992; 42:251.

**Her C, Wood TC, Eichler EE, Mohrenweiser HW, Ramagli LS, Siciliano MJ, Weinshilboum RM.** Human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1: two enzymes encoded by a single chromosome 19 gene. *Genomics.* 1998; 53:284-295.

**Herbert J.** Neurosteroids, brain damage, and mental illness. *Exp Gerontol.* 1998; 33:713-727.

**Hernandez-Guzman FG, Higashiyama T, Osawa Y, Ghosh D.** Purification, characterization and crystallization of human placental estrone/dehydroepiandrosterone sulfatase, a membrane-bound enzyme of the endoplasmic reticulum. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001; 78:441-450.

**Hernandez-Martin A, Gonzales-Sarmiento R, De Unamuno P.** X-linked ichthyosis: an update. *Br J Dermatol.* 1999; 141:617-627.

**Hu ZY, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE.** Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 8215-8219.

**Hutchison JB.** Hormonal control of behaviour: steroid action in the brain. *Curr Opin Neurobiol.* 1991; 1:562-570.

**Javitt NB, Lee YC, Shimizu C, Fuda H, Strott CA.** Cholesterol and hydroxycholesterol sulfotransferases: identification, distinction from dehydroepiandrosterone sulfotransferase, and differential tissue expression. *Endocrinology.* 2001; 142:2978-2984.

**Jung-Testas I, Hu ZY, Baulieu EE, Robel P.** Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology.* 1989; 125:2083-2091.

**Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G.** Hepatobiliary transport. *J Hepatol.* 2000; 32 Suppl 1:3-18.

**Le Goascogne C, Sananes N, Guezou M, Takemori S, Kominami S, Baulieu EE, Robel P.** Immunoreactive cytochrome P-450(17 alpha) in rat and guinea-pig gonads, adrenal glands and brain. *J Reprod Fertil.* 1991; 93:609-622.

**Lin HK, Steckelbroeck S, Fung KM, Jones AN, Penning TM.** Characterization of a monoclonal antibody for human aldo-keto reductase AKR1C3 (type 2 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase); immunohistochemical detection in breast and prostate. *Steroids.* 2004; 69:795-801.

**Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.

**Loria RM.** Antigluccorticoid function of androstenediol. *Psychoneuroendocrinology*. 1997; 22 Suppl 1:S103-108.

**Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM.** Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*. 1986; 232:1004-1007.

**Majewska MD, Demirgoren S, Spivak CE, London ED.** The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABA<sub>A</sub> receptor. *Brain Res*. 1990; 526:143-146.

**Martel C, Melner MH, Gagne D, Simard J, Labrie F.** Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase (3 $\beta$ -HSD), 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ -reductase and aromatase activities in the rhesus monkey. *Mol Cell Endocrinol*. 1994; 104:103-111.

**Mellon SH, Deschepper CF.** Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Res*. 1993; 629:283-292.

**Meloche CA, Falany CN.** Expression and characterization of the human 3 beta-hydroxysteroid sulfotransferases (SULT2B1a and SULT2B1b). *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001; 77:261-269.

**Mickan H.** Metabolism of 4-<sup>14</sup>C-progesterone and 4-<sup>14</sup>C-testosterone in brain of the preivable human fetus. *Steroids*. 1972; 19:659-668.

**Miller WL.** Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1998; 12:67-81.

**Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z.** Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human foetuses. *J Endocrinol*. 1971; 51:795-796.

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

**Parenti G, Meroni G, Ballabio A.** The sulfatase gene family. *Curr Opin Genet Dev.* 1997; 7:386-391.

**Polleri A, Gianelli MV, Murialdo G.** Dementia: a neuroendocrine perspective. *J Endocrinol Invest.* 2002; 25:73-83.

**Rupprecht R, Holsboer F.** Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* 1999; 22:410-416.

**Samuels LT, Helmreich ML, Lasater MB, Reich H.** An enzyme in endocrine tissues which oxidizes 5-3 hydroxy steroids to delta 5-3 unsaturated ketones. *Science.* 1951; 113:490-491.

**Sanne JL, Krueger KE.** Aberrant splicing of rat steroid 17 alpha-hydroxylase transcripts. *Gene.* 1995; 165:327-328.

**Sanne JL, Krueger KE.** Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: a study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J Neurochem.* 1995; 65:528-536.

**Schindler AE.** Steroid metabolism in foetal tissues--IV conversion of testosterone to 5alpha-dihydrotestosterone in human foetal brain. *J Steroid Biochem.* 1976; 7:97-100.

**Sekine T, Cha SH, Endou H.** The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pflugers Arch.* 2000; 440:337-350.

**Shankaran R, Ameen M, Daniel WL, Davidson RG, Chang PL.** Characterization of arylsulfatase C isozymes from human liver and placenta. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1078:251-257.

**Shapiro LJ.** Steroid sulfatase deficiency and the genetics of the short arm of the human X chromosome. *Adv Hum Genet.* 1985; 14:331-381, 388-389.

**Shimizu M, Tamura HO.** Identification and localization of two hydroxysteroid sulfotransferases in the human brain. *J. Health Sci.* 2002; 48:467-472.

**Stalvey JR, Meisler MH, Payne AH.** Evidence that the same structural gene encodes testicular and adrenal 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase. *Biochem Genet.* 1987; 25:181-190.

**Steckelbroeck S, Heidrich DD, Stoffel-Wagner B, Hans VH, Schramm J, Bidlingmaier F, Klingmuller D.** Characterization of aromatase cytochrome P450 activity in the human temporal lobe. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:2795-2801. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:4606.

**Steckelbroeck S, Stoffel-Wagner B, Reichelt R, Schramm J, Bidlingmaier F, Siekmann L, Klingmuller D.** Characterization of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in brain tissue: testosterone formation in the human temporal lobe. *J Neuroendocrinol.* 1999; 11:457-464.

**Steckelbroeck S, Watzka M, Reichelt R, Hans VH, Stoffel-Wagner B, Heidrich DD, Schramm J, Bidlingmaier F, Klingmuller D.** Characterization of the 5 $\alpha$ -reductase-3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase complex in the human brain. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:1324-1331.

**Steckelbroeck S, Watzka M, Lutjohann D, Makiola P, Nassen A, Hans VH, Clusmann H, Reissinger A, Ludwig M, Siekmann L, Klingmuller D.** Characterization of the dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism via oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase and 17-ketosteroid reductase activity in the human brain. *J Neurochem.* 2002; 83:713-726.

**Steckelbroeck S, Watzka M, Reissinger A, Wegener-Toper P, Bidlingmaier F, Bliesener N, Hans VH, Clusmann H, Ludwig M, Siekmann L, Klingmuller D.** Characterisation of estrogenic 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) activity in the human brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 86:79-92.

**Steckelbroeck S, Nassen A, Ugele B, Ludwig M, Watzka M, Reissinger A, Clusmann H, Lutjohann D, Siekmann L, Klingmuller D, Hans VH.** Steroid sulfatase (STS) expression in the human temporal lobe: enzyme activity, mRNA expression and immunohistochemistry study. *J Neurochem.* 2004; 89:403-417.

**Strömstedt M, Waterman MR.** Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995; 34:75-88.

**Toran-Allerand CD.** Gonadal hormones and brain development: cellular aspects of sexual differentiation. *Amer Zool.* 1978; 18:553-565.

**Tsutsui K, Ukena K, Usui M, Sakamoto H, Takase M.** Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci Res.* 2000; 36:261-273.

**Ugele B, St-Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P.** Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284:E390-398.

**Weidenfeld J, Siegel RA, Chowers I.** In vitro conversion of pregnenolone to progesterone by discrete brain areas of the male rat. *J Steroid Biochem.* 1980; 13:961-963.

**Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE, Akwa Y.** In vitro metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) to 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA and Delta5-androstene-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol in specific regions of the aging brain from Alzheimer's and non-demented patients. *Brain Res.* 2003; 969:117-125.

**Wise PM.** Estradiol: a protective factor in the adult brain. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000; 13 Suppl 6:1425-1429.

**Yau JL, Rasmuson S, Andrew R, Graham M, Noble J, Olsson T, Fuchs E, Lathe R, Seckl JR.** Dehydroepiandrosterone 7-hydroxylase CYP7B: predominant expression in primate hippocampus and reduced expression in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2003; 121:307-314.

**Zinder O, Dar DE.** Neuroactive steroids: their mechanism of action and their function in the stress response. *Acta Physiol Scand.* 1999; 167:181-188.

**Zwain IH, Yen SS.** Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain. *Endocrinology.* 1999; 140:880-887.

## **8. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. D. Klingmüller danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen. Mein ganz besondere Dank gilt Herrn Dr. S. Steckelbroeck für seine Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen, die kritische Durchsicht der Dissertation und die diesbezüglichen Publikationen.

Herrn PD Dr. M. Ludwig danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion-Analysen.

Herrn Prof. Dr. J. Schramm und Herrn Prof. Dr. Steinhäuser danke ich für die Überlassung der in dieser Arbeit verwendeten Gewebeprobe.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Endokrinologie des Institutes für Klinische Biochemie danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Aufnahme in ihrer Mitte. Mein besonderer Dank gilt Frau Petra Wegener, deren Unterstützung für das Gelingen der Arbeit von großem Wert war.

**Curriculum vitae**

Name: Christian Alexander Nassen  
Geburtsdatum: 1976 (Neuwied)  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch  
Konfession: römisch-katholisch

**Schulbildung**

---

1983 – 1987 Deutschherren – Grundschule Waldbreitbach  
1987 – 1993 Maximilian – zu – Wied – Realschule Neuwied  
1993 – 1996 Rhein – Wied – Gymnasium Neuwied  
06/1996 Abitur

**Zivildienst**

---

09/1996 – 09/1997 Malteser Hilfsdienst Neuwied

**Studium**

---

10/1997 – 11/2004 Studium der Humanmedizin an der Rheinischen Friedrich – Wilhelms –  
Universität Bonn  
10/2001 – 09/2002 Wissenschaftliche Hilfskraft, Klinische Biochemie, Isotopenlabor, Prof.  
Dr. med. Klingmüller

- 10/2002 – 03/2003 Studium im Rahmen des Sokrates/Erasmus – Programms an der Universität San Cristobal de La Laguna, Spanien
- 10/2003 – 09/2004 „Praktisches Jahr“ im Ev. Waldkrankenhaus Bad Godesberg
- 12/2004 Approbation
- 07/2005 Anstellung als Assistenzarzt in der Allgemein- und Viszeralchirurgie des Klinikum Lüdenscheids

### **Publikationen/Mitautorenschaften**

---

Steckelbroeck S, Nassen A, Ugele B, Ludwig M, Watzka M, Reissinger A, Clusmann H, Lutjohann D, Siekmann L, Klingmüller D, Hans VH.

Steroid sulfatase (STS) expression in the human temporal lobe: enzyme activity, mRNA expression and immunohistochemistry study.

J Neurochem. 2004; 89:403-417.

Steckelbroeck S, Watzka M, Lutjohann D, Makiola P, Nassen A, Hans VH, Clusmann H, Reissinger A, Ludwig M, Siekmann L, Klingmüller D.

Characterization of the dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism via oxysterol 7alpha-hydroxylase and 17-ketosteroid reductase activity in the human brain.

J Neurochem. 2002; 83:713-726.

Bonn, 19. Oktober 2006

Christian Alexander Nassen