

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie
Institut für Reproduktions-und Regenerationsbiologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. S. Schlatt-
Klinische Andrologie
-Chefärztin Prof. Dr. med. S. Kliesch -

Polymorphismen des neuentdeckten Exons 6a auf dem
LHCGR-Gen und ihre Assoziation zum Maldescensus testis

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Böckenfeld, Yvonne
aus Rheine
2012

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Zitzmann
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Wieacker
Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2012

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie
Institut für Reproduktions- und Regenerationsbiologie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. S. Schlatt -

Klinische Andrologie

- Chefärztin: Prof. Dr. med. S. Kliesch -

Referent: Prof. Dr. med. M. Zitzmann

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. P. Wieacker

ZUSAMMENFASSUNG

Böckenfeld, Yvonne

**Polymorphismen des neuentdeckten Exons 6a auf dem
LHCGR-Gen und ihre Assoziation zum Maldescensus testis**

Der Hodenhochstand (Maldescensus testis) ist heutzutage die häufigste kongenitale Fehlbildung bei neugeborenen Jungen. Die Betroffenen leiden an einer deutlich erhöhten Inzidenz von bösartigen Hodentumoren und Infertilität. In der inguinokrotalen Phase des Descensus spielen das Luteinisierende Hormon LH und der Luteinizing Hormone/ Choriongonadotropin Receptor (LHCGR) eine zentrale Rolle. Untersuchungen unseres Centrums zeigten ein auf dem LHCGR-Gen gelegenes neuartiges Exon mit drei darauf vorhandenen Polymorphismen: Exon 6a. Wir untersuchten daher, ob die Polymorphismen des Exon 6a mit einem Maldescensus testis in Zusammenhang stehen.

Methoden: Wir führten eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie durch. Darin eingeschlossen waren 278 Patienten mit Maldescensus testis, 277 infertile Männer ohne Hodenhochstand sowie 271 gesunde Männer mit normalen Samenparametern. Wir untersuchten und verglichen sowohl klinische, als auch endokrinologische Daten der verschiedenen Gruppen. Die Analyse der Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) führten wir mittels GeneScan und TaqMan durch.

Ergebnisse: Wir stellten bei den Patienten mit Maldescensus testis ein deutlich erniedrigtes Hodenvolumen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen fest. Zudem zeigte sich bei den Patienten mit Maldescensus ein deutlich erhöhter Spiegel an luteinisierendem Hormon (LH) sowie Follikel stimulierendem Hormon (FSH) bei normal hohen Testosteronwerten. Es fanden sich keine Mutationen auf Exon 6a. Die SNPs waren in allen drei Gruppen gleich verteilt. In den beiden infertilen Untersuchungsgruppen wiesen Träger der Polymorphismen rs 4637173 und rs 4490239 einen deutlich erhöhten Androgen-Sensitivitäts-Index sowie LH-Spiegel auf.

Bei Männern mit Maldescensus scheint der erhöhte LH-Spiegel notwendig zu sein, um normale Testosteronspiegel zu erreichen. Es gibt keinen spezifischen Genotyp des Exon 6a, der mit Maldescensus im Zusammenhang steht. Die Polymorphismen rs 4637173 und rs 4490239 scheinen jedoch bei infertilen Männern einen negativen Einfluss auf die Rezeptor-Funktion zu haben.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2012

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Polymorphismen des neuentdeckten Exons 6a auf dem LHCGR-Gen und ihre Assoziation zum Maldescensus Testis

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Institut für Reproduktions-und Regenerationsbiologie, klinische Andrologie

unter Anleitung von:

Prof. Dr. med. Michael Zitzmann

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, 21.05.2012
Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1. Der Maldescensus testis: Von den Anfängen bis heute.....	1
1.2. Der Descensus	2
1.3. Die hormonelle Steuerung.....	3
1.3.1. Das luteinisierende Hormon LH.....	4
1.3.2. Die Hypothalamus-Hypophysen-Achse	5
1.3.3. Der LH-Rezeptor (LHCGR) und Exon 6a.....	5
1.4. Die Rolle der Polymorphismen	8
1.5. Zielsetzung und Aufgabe:.....	9
<u>2. Methoden</u>	<u>10</u>
2.1. Patienten und Kontrollen.....	10
2.2. Klinische Parameter.....	12
2.3. DNA-Isolation und Analyse	14
2.3.1. Extraktion	14
2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion	14
2.3.3. Gelelektrophorese.....	15
2.3.4. Sequenzierung	16
2.3.5. Real-time PCR.....	18
<u>3. Ergebnisse</u>	<u>21</u>
3.1. Klinische Daten	21
3.2. Genetische Analysen	24
3.2.1. Mutationsscreening.....	24
3.2.2. Assoziationsstudie	24
3.2.3. Korrelation der SNP's zu klinischen Parametern	26
3.2.4. Haplotypen-Analyse	28
<u>4. Diskussion</u>	<u>31</u>

5. Literatur..... 37

6. Lebenslauf 45

7. Danksagung..... 46

1. Einleitung

1.1. Der Maldescensus testis: Von den Anfängen bis heute

Die Lage des Hodens außerhalb des Skrotums, nennt sich Maldescensus testis, Hodenhochstand oder im englischen Sprachraum Kryptorchismus (cryptorchidism).

Das Phänomen des nicht orthotop liegenden Hodens wurde erstmals im Jahre 1786 von Hunter beschrieben (37). Die darauf folgenden Versuche der operativen Reposition waren jedoch immer wieder von Misserfolgen geprägt, da die überwiegend kindlichen Patienten postoperativ an Wundinfektionen und Peritonitiden verstarben (11).

Die erste erfolgreiche Therapie des Hodenhochstands gelang daher erst im Gefolge der 1867 von dem Edinburgher Chirurgen Lister eingeführten Technik der antiseptischen Operation mit Carbolsäure. Der Kollege und Weggefährte Listers, Thomas Anandale führte am 5. Juli 1877 an einem 3-Jahre alten Jungen die erste Orchidopexie durch (11, 15). Im Laufe des nächsten Jahrhunderts wurde die Technik der Orchidopexie beständig, teilweise unter Verwendung bizarrer Methoden, verfeinert. So fixierte etwa Katzenstein 1902 den Hoden in einer Hauttasche am Oberschenkel (21), Cabot und Nesbit befestigten 1931 den Hoden mittels eines elastischen Gummibandes an Oberschenkel oder auch Fußsohle (25). Die Operationsberichte Katzensteins wie : „...hierbei nimmt der Hoden eine tiefblaue Färbung an, die sich jedoch allmählich zurückbildet“ (21) lassen erahnen dass es bei diesen frühen Operationsmethoden postoperativ häufig zu ischämiebedingten Atrophien des Hodens kam.

Das heute noch gebräuchliche Fowler-Stephens-Manöver zur Rückverlagerung eines intraabdominalen Hodens wurde erst im Jahre 1959 entwickelt und beruht auf einer Versorgung des Hodens über Kollateralkreisläufe des Ductus Deferens (16). Die dehnungsbedingte Ischämie durch Traktion an den verkürzten Gefäßen kann so vermieden werden (25). Das Fowler-Stephens-Manöver führt heute in 95 % der Fälle zu einem erfolgreich orthotop replaziertem Hoden (39).

Die Therapie des Hodenhochstandes wird heute möglichst vor dem 18. Lebensmonat durchgeführt, da ab diesem Alter mit einem signifikanten Keimzellverlust zu rechnen ist (12). Dennoch ist in etwa 56% der Patienten mit bilateralem Maldescensus und 8 % der Patienten mit unilateralem Maldescensus trotz einer frühen Orchidopexie mit einer Infertilität zu rechnen (12). Zudem ist bei Patienten mit Hodenhochstand von einem 5-fach erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Hodentumors auszugehen (41).

Der Hodenhochstand stellt zur Zeit bei männlichen Neugeborenen mit einer Prävalenz von 2-9% (9) die häufigste angeborene Fehlbildung dar.

Die Ätiologie dieser Fehlbildung ist noch unbekannt und Gegenstand aktueller Forschung. Ebenso ist der komplexe Mechanismus des Descensus sowie die Aktion, Interaktion und Wirkung daran beteiligter zellulärer und hormonaler Komponenten noch nicht voll verstanden.

1.2. Der Descensus

Die Entwicklung der männlichen Gonaden beginnt ab etwa der 5. Woche post conceptionem (p.c.) mit dem Einwandern der männlichen Urkeimzellen in die Gonadenleiste ventromedial der fetalen Urniere. Das diese überziehende Coelomepithel (= "Keimepithel") beginnt daraufhin zu proliferieren und die Hoden entwickeln sich dann zunächst auf der Oberfläche der Urniere. Ab etwa der 7. Woche p.c. löst sich jedoch diese enge Verbindung durch Regression der Urniere (42). Dabei bleiben Reste der Urniere mit dem Hoden verbunden und als kraniales und kaudales Gonadenlängsband erhalten (31)(26).

Das kaudale Gonadenlängsband wird auch als Gubernaculum Testis bezeichnet und reicht bis in das verdichtete mesenchymale Bindegewebe der Genitalwülste hinein. Durch das Wachstum der aus dem Becken heraufgewanderten Metaniere wird der Hoden nach caudolateral verschoben und das kraniale Versorgungsband löst sich auf (31)(40).

Ab etwa der 13. Woche p.c. ist der Hoden nur noch über das Gubernaculum mit dem inneren Leistenring verbunden und verhindert so ein wachstumbedingtes Hochwandern des Hodens im Abdomen (5). Diese transabdominale Phase des Descensus ist in der Regel in der 15. Woche p.c. abgeschlossen (19).

In der inguinokrotalen Phase von der 25.-35. Woche p.c. erfolgt der Abschluss des Descensus. Dabei verdickt sich das Gubernaculum durch Wassereinlagerung mit entsprechender Weitung des inguinokrotalen Kanales. Die anschließende Schrumpfung des Gubernaculums zusammen mit dem intraabdominalen Druck lassen den Hoden schließlich in das sich formende Skrotum gleiten (5).

1.3. Die hormonelle Steuerung

Die Rollen verschiedenster hormoneller Mediatoren auf den Descensus sind noch nicht abschließend geklärt. Versuche an Knock-out-Mäusen (46) (14) wiesen darauf hin, dass die Entwicklung und das Wachstum des Gubernaculums wie auch die Auflösung des cranialen Versorgungsbandes in der transabdominalen Phase maßgeblich von insulin-like-hormone-3 und seinem Rezeptor LGR8 gesteuert wird (1).

Da bei Patienten mit hypogonadotropem Hypogonadismus und Androgeninsensibilität der Descensus in der transabdominalen Phase normal verläuft und erst im Inguinalkanal stagniert, nimmt man an, dass die inguinoscrotale Phase des Descensus androgen-sensibel ist (8). Ein weiterer Hinweis auf die wichtige Rolle der Androgene in dieser Phase ist die Tatsache, dass ein Großteil der Fälle von Hodenhochstand in den ersten drei Monaten nach der Geburt spontan descendiert. In dieser Phase ist der Spiegel von Gonadotropinen im Rahmen einer sogenannten „Mini-Pubertät“ besonders erhöht (2)(45). Das dabei ausgeschüttete luteinisierende Hormon (LH) regt die Testosteronproduktion der Leydigzellen an.

Die Testosteronproduktion der fetalen Leydigzellen beginnt unter dem maternalen Schwangerschaftshormon humanes Choriongonadotropin (hCG) bereits sehr früh, ab der 14. Schwangerschaftswoche (18). Allerdings scheint das fetal gebildete LH das mütterliche hCG im Laufe der Schwangerschaft in seiner Wirkung abzulösen. Als

Hinweis auf diese Hypothese kann die Tatsache angenommen werden, dass hypogonadotrope Feten oft trotz normaler hCG-Spiegel einen Kryptorchismus entwickeln (33). Eine plausible Erklärung hierfür ist vor allem der bei diesen Kindern fehlende Einfluss des endogen gebildeten LH's auf den Descensus des Hodens.

Interessant ist in dieser Hinsicht auch die neu entdeckte Variante des luteinisierenden Hormons: Variant-LH (V-LH). Diese Hormonvariante zeigt auf Grund zweier Punktmutationen in der β -Untereinheit deutlich veränderte Eigenschaften (28). Zum einen besitzt das V-LH eine erhöhte hormonale Aktivität, zum anderen jedoch eine deutlich kürzere Halbwertszeit als der Wildtyp. Dies resultiert insgesamt in einer erniedrigten biologischen Aktivität des V-LH (23). Durch Untersuchungen an Neugeborenen konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz von V-LH bei Jungen mit Hodenhochstand umso höher ist, je länger die Schwangerschaft gedauert hat (20). Auch dies wird mit dem steigenden LH-Einfluss auf den Descensus in der späten Schwangerschaft erklärt:

Ist der Descensus in der ersten Schwangerschaftshälfte unter hCG verspätet, so kann er normalerweise in der 2. Hälfte unter endogener LH-Wirkung wieder aufgeholt werden. Ist die LH-Aktivität jedoch, wie beim V-LH reduziert, reicht dieser Stimulus nicht mehr zum Descensus aus.

Auffällig ist auch, dass Patienten mit Maldescensus trotz normaler Testosteronwerte deutlich erhöhte LH-Spiegel aufweisen (38). Dies deutet auf eine zumindest milde Leydig-Zell-Dysfunktion hin, in deren Zusammenhang vermehrt luteinisierendes Hormon gebildet werden muss, um normale Testosteronspiegel zu erreichen.

Subsummiert man diese Erkenntnisse, so wird deutlich dass man in der Erforschung der inguinokrotalen Phase des Maldescensus testis durchaus eine Störung auf LH oder LH-Rezeptor-Ebene ins Auge fassen sollte.

1.3.1. Das luteinisierende Hormon LH

Das luteinisierende Hormon (LH) entstammt der Gruppe der Gonadotropine. Hierzu gehören neben LH auch noch das follikelstimulierende Hormon (FSH), das humane

Choriongonadotropin (hCG) und strukturell auch das thyreoideastimulierende Hormon (TSH) welches jedoch nicht-gonadotrop wirkt. Die Hormone dieser Gruppe setzen sich aus je zwei Untereinheiten α und β zusammen. Dabei bildet die α -Untereinheit das bei allen vier Hormonen gleiche Grundgerüst. Die β -Untereinheit ist hingegen für jedes Hormon absolut spezifisch und verantwortlich für die entsprechende Wirkung (27).

LH wird im vorderen Hypophysenlappen, der Adenohypophyse synthetisiert und in Granula gespeichert.

1.3.2. Die Hypothalamus-Hypophysen-Achse

Die Freisetzung des LH wird pulsatil durch das in den Neuronen des Hypothalamus gebildete Dekapeptid Gonadotropinfreisetzendes Hormon (GnRH) stimuliert. Dieses wirkt über das Pfortadersystem auf die Adenohypophyse ein und bewirkt die Ausschüttung der gespeicherten Granula in den Blutkreislauf (27).

Das luteinisierende Hormon entfaltet seine Wirkung an den interstitiell liegenden Leydig-Zellen der männlichen Gonaden und regt diese zur Testosteronproduktion an. Gleichzeitig ist die Testosteronproduktion über einen negativen Rückkopplungsmechanismus mit der GnRH-Sekretion des Hypothalamus verbunden. Wird über die Leydig-Zellen zu viel Testosteron gebildet, fährt der Hypothalamus die Stimulation der Adenohypophyse zurück und mindert so indirekt auch die Stimulation der Leydig-Zellen.

Wird jedoch zu wenig Testosteron gebildet, so bewirkt dies wiederum eine vermehrte Ausschüttung von GnRH im Hypothalamus, eine erhöhte LH-Sekretion und somit eine Erhöhung des Testosteronspiegels. Durch diesen sensiblen Regelkreislauf bleibt die Ausschüttung von LH und Testosteron immer im Gleichgewicht (6).

1.3.3. Der LH-Rezeptor (LHCGR) und Exon 6a

Der LH/hCG-Rezeptor gehört zusammen mit dem FSH und TRH-Rezeptor in die Familie der Glykoprotein-Hormonrezeptoren. Die Glykoprotein-Hormonrezeptoren sind in der Gruppe der G-Protein (Guaninnukleotid-bindendes-Protein) vermittelten

Rezeptoren eine Besonderheit, da sie über eine besonders große extrazelluläre Domäne verfügen und auch mit entsprechend großen Liganden interagieren (35).

Die genetische Information für den LHCGR ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p21) lokalisiert und enthält nach früheren Studien 11 Exons die durch 10 Introns voneinander getrennt sind. Neueste Untersuchungen an Gewebe von *Macaca fascicularis* (Langschwanzmakak) und menschlichen Gewebeproben zeigen jedoch die Existenz eines bisher unbeschriebenen Exons, welches in Intron 6, also zwischen Exon 6 und 7 gelegen ist (22). Dieses wurde mittels Exon Trap Experimenten als eigenständiges, sich Exon 6 anschließendes Exon beschrieben und Exon 6a getauft. Diese Entdeckung dieses primatenspezifischen zusätzlichen Exons definiert die genomische Organisation des LHCGR-Gens neu. Folglich muss nun von 12 Exons und 10 Introns des humanen LHCGR ausgegangen werden (22).

Die Exons 1 bis 10 sind mit einer Größe von 69 bis 186 Basenpaaren (bp) bzw. 300 bp (Exon 6a) relativ kurz, wohingegen sich das Exon 11 mit 2022 bp deutlich von den anderen Exons abhebt (35). Die ersten 10 Exons kodieren für die große extrazelluläre Domäne des Rezeptors. Durch Versuche mit Chimären aus FSH und LH-Rezeptoren welche die LHCGR-extrazelluläre Domäne sowie die FSH-R transmembranäre und intrazelluläre Domäne enthielten, konnte gezeigt werden, dass der extrazelluläre Teil des Rezeptors spezifisch für die Hormonwirkung ist (10).

Die Bedeutung des neuentdeckten Exon 6a konnte bisher noch nicht geklärt werden. Bisherige Überlegungen lassen eine Rolle des Exons 6a in der Modulation der Rezeptoraffinität bzw. in der Modulation von LH/hCG Aktion vermuten (22).

Das große Exon 11 kodiert sowohl für einen kleinen c-terminalen Teil der extrazellulären Domäne als auch für die gesamte, die Zellwand 7-fach durchspannende transmembrane Domäne und den kleinen intrazellulären Teil des Rezeptors (4, 35). Diese auffällige Struktur des Rezeptors lässt, auch im Hinblick auf die anderen G-Protein-vermittelten Rezeptoren, welche nur einen kleinen extrazellulären Anteil besitzen, vermuten dass der LHCGR aus einer Fusion zweier Proteine hervorgegangen

ist. Dabei verband sich das Gen eines leucinreichem, ligandenbindenden Proteins (Exon 1-10) mit einem intronlosen Gen (Exon 11), welches ein membranär gebundenes G-Protein-vermittelndes Protein kodierte (35).

Der LHCGR entsteht schließlich in einem Reifungsprozess aus einem Vorläufermolekül und besteht aus einer Polypeptidkette mit 674 Aminosäureresten mit einem Molekulargewicht von 85-95 kDa (4).

1.3.3.1. Die Signalübertragung

Der LHCGR wird beim Mann vor allem auf der Oberfläche der Leydigzellen exprimiert. Bindet nun LH oder hCG an seine Oberfläche erfolgt zunächst eine Konformationsänderung, die zu einer Aktivierung eines G-Proteins führt. Dieses aktiviert seinerseits eine membrangebundene Adenylatcyclase welche daraufhin beginnt, aus ATP (Adenosintriphosphat) cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) herzustellen. cAMP wirkt dann als Botenstoff auf die Proteinkinase A ein, welche wiederum Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung aktiviert. Die aktivierten Transkriptionsfaktoren veranlassen daraufhin die Transkription steroidbildender Enzyme worauf die Testosteronproduktion in den Leydigzellen beginnt. Neben dem cAMP vermittelten Weg sind mittlerweile noch weitere Signalübertragungswege über den LHCGR bekannt, man geht jedoch davon aus, dass sie im Gegensatz zu ersterem eine untergeordnete Rolle in der Steroidsynthese spielen (4).

1.3.3.2. Die zentrale Funktion der extrazelluläre Domäne

Die Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne stellt daher den ersten wichtigen Schritt in der Signalübertragung an der Leydig-Zelle dar. Es zeigte sich in Experimenten, dass vor allem die Exons 1-8 für die Hormonbindung wichtig sind. Hierfür wurde das C'-Ende der extrazellulären Domäne Exon um Exon verkürzt und daraufhin die jeweilige Bindungsaffinität zu hCG getestet. Es zeigte sich, dass die Bindungsaffinität der verkürzten extrazellulären Domänen dabei zwar deutlich zurückging, dass jedoch selbst sehr kurze Stücke aus Exon 1 und 2 noch in der Lage waren, hCG zu binden. Beispielsweise beobachtete man bei einer Reduktion auf Exon 1-9 nur einen ca 10-fachen Rückgang der Bindungsfreudigkeit im Gegensatz zum

Wildtyp, bei einer Reduktion auf Exon 1-6 konnte man einen 150-fachen Rückgang der Affinität feststellen (4, 17).

Weiterhin zeigte sich, dass besonders die Bereiche um die Bindungen zwischen Exon 1 und 2, Exon 4 und 5, Exon 6 und 7 sowie zwischen Exon 9 und 10 wichtige Elemente der Affinität des Rezeptors zum Hormon sind. Veränderungen in diesen Bereichen wirkten sich besonders stark auf die Bindungsfreudigkeit des LHR aus (17).

1.4. Die Rolle der Polymorphismen

Das Wort „Polymorphismus“ ist abgeleitet aus dem Griechischen und heißt übersetzt: Vielgestaltigkeit. Polymorphismen bezeichnen Genvarianten in einer Population. Die häufigsten Polymorphismen sind Singlenukleotidpolymorphismen (SNP) bei denen es nur zum Austausch eines Nukleotids im DNA-Strang kommt. Je nachdem an welcher Stelle des Leserasters der SNP liegt kann es dadurch zu dem Austausch einer Aminosäure und damit auch zu einer Proteinveränderung kommen. Hierdurch können verschiedenste Funktionen im Körper beeinflusst werden.

Nach der SNP-Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ sind auf dem humanen LHCGR-Gen 310 Polymorphismen bekannt. Nur 4 dieser Polymorphismen sind in Exons gelegen und nonsynonym.

Der auf Exon 11 gelegene SNP rs13006488 tauscht an Aminosäurenposition 661 ein Serin in ein Prolin aber seine Frequenz ist als sehr gering einzustufen, da sie in HapMap Collection mit 0.00 angegeben wird (36).

Es wurde jedoch gezeigt, dass die extrazelluläre Domäne durch die 3 anderen, in ihren Exons liegenden Polymorphismen bzw SNPs, in ihren Eigenschaften verändert werden kann.

So führt der in einem Signalpeptid des Exon 1 liegende Polymorphismus rs 4539842 durch eine Insertion von 6 Basenpaaren an Position 55-60 zu einer Aktivitätserhöhung und Erhöhung der Membranexpression des LHCGR (32). Der dadurch sekundär erhöhte Östrogenspiegel ist ursächlich für ein jüngeres Erkrankungsalter und verschlechtertes

Langzeitüberleben von Brustkrebspatientinnen (31). Ähnliches konnte zu den beiden SNPs auf Exon 10 festgestellt werden, welche jeweils an Aminosäureposition 291 und 312 zu einem Austausch von Asparagin zu Serin führen. Hierbei konnte zumindest bei SNP N312S eine Verbindung zu erhöhtem Brustkrebsrisiko der Allelträgerinnen gezogen werden, doch auch bei SNP N291S zeigte sich zumindest in vitro eine Erhöhung der Rezeptorsensitivität (30).

Auf dem neu entdeckten Exon 6a des LH-Rezeptors sind bisher 3 SNPs bekannt. Damit liegen bereits 7 Polymorphismen in kodierenden Bereichen des LHCGR-Gens. Es ist möglich, dass auch die Polymorphismen auf Exon 6a konformierend auf Eigenschaften des LHCGR wirken.

1.5. Zielsetzung und Aufgabe:

Auf diese Überlegungen aufbauend ist das Ziel dieser Studie die Untersuchung der Frage, ob der Einfluss des LH-Rezeptors auf den Descensus der männlichen Gonaden einer Modulation durch 3 bekannte Polymorphismen auf dem neuentdeckten Exon 6a unterliegt. Weiterhin wurde Exon 6a auf das Vorhandensein eventueller ursächlicher Mutationen gescreent. Zusätzlich wurde untersucht, ob Verteilungsmuster der Polymorphismen in Zusammenhang mit dem Hormonstatus oder Phänotypus der Allelträger stehen. Um eine möglichst hohe Aussagekraft und Spezifität der Ergebnisse zu erreichen, wurden als Studienkollektiv weitgehend gesunde Patienten mit schweren Formen von Maldescensus testis untersucht. Patienten mit schwerwiegenden Vorerkrankungen wurden von der Studie ausgeschlossen.

2. Methoden

2.1. Patienten und Kontrollen

Im Institut für Reproduktionsmedizin (IRM) der WWU Münster erfolgte eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie an 278 Patienten mit Hodenhochstand, welche das Institut im Rahmen der Fertilitätssprechstunde konsultierten.

Zunächst wurden mit Hilfe der hauseigenen Datenbank Androbase 665 Patienten mit vermutetem oder gesichertem Maldescensus testis identifiziert. Die gesammelten klinischen Daten, als auch Hormon und Samenanalysen, wurden in die Datenbank eingegeben. Von 568 Patienten war im Labor des Instituts für Reproduktionsmedizin asserviertes Blut vorhanden. Aus dieser Kohorte konnten 278 Patienten als Studienteilnehmer ausgewählt werden (s.u.).

290 Patienten wurde nicht in die Studie eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren minderschwere Fälle von Maldescensus, welche auf hCG-Therapie ansprachen (37 Patienten), ebenso wurden Patienten mit Spontandescensus (18 Patienten) sowie Patienten mit fraglichem bzw. unbekannt behobenem Hodenhochstand (40 Patienten) nicht eingeschlossen. Auch Patienten mit beidseitiger Ablatio testis bzw. Orchidopexie mit anschließender beidseitiger Ablatio testis (20 Patienten) wurden nicht berücksichtigt. Diese Auswahl diente zunächst der Selektion von anamnestisch sicheren, schweren Fällen von Hodenhochstand mit verfügbaren Hormon und Samenanalysen. Um eine Verfälschung der Untersuchungsergebnisse durch eventuell mitbestehende schwerwiegende, fertilitätsbeeinflussende Erkrankungen zu vermeiden, wurden zudem weitere 77 Patienten ausgeschlossen: 15 dieser Patienten litten an Klinefelter-Syndrom, 17 Patienten waren an einem Hodentumor erkrankt, 4 Patienten hatten sich einer Vasektomie unterzogen, bei 7 Patienten bestand ein Lymphom, 8 Patienten litten unter sekundärem Hypogonadismus, bei 6 Patienten bestand eine chromosomale Aberration sowie bei weiteren 20 Patienten andere entsprechende Erkrankungen.

Die für unsere Studie ausgewählte Kohorte von 278 Männern mit sicher nachgewiesenem Maldescensus testis setzte sich wie folgt zusammen: 26 Patienten waren von noch bestehendem Hodenhochstand betroffen (8 beidseitig, 11 einseitig rechts, 7 einseitig links), 215 Patienten waren zuvor erfolgreich mittels Orchidopexie therapiert worden (85 beidseitig, 65 einseitig rechts, 49 einseitig links und 16 unbekannt), 37 Patienten waren zuvor mit hCG-Therapie und Orchidopexie behandelt worden (22 beidseitig, 8 einseitig rechts, 4 einseitig links und 3 unbekannt). Bei 14 der Patienten wurde zuvor eine einseitige Orchiectomie durchgeführt.

Die Kontrollgruppe wurde, um eine Selektions-Bias zu vermeiden, ebenfalls aus Patienten der Fertilitätssprechstunde ausgewählt. Mit Hilfe von Androbase wurden 277 Patienten ausgewählt die sich von den Fällen nur in der Absenz eines Hodenhochstandes unterschieden (n=277, gematchte Kontrolle).

Ein eigens als Erweiterung von Androbase geschriebenes Programm suchte systematisch nach zu den Fällen passenden Kontrollen. Dabei wurden folgende Kriterien angelegt: Vorhandensein gleicher klinischer Symptome (z.B. Varikozelen, Torsionen, etc) und entsprechender Wertebereich in der Spermienkonzentration. Dabei konnte der Wert der Kontrolle bei Spermienkonzentrationen zwischen 0,1 und $1 \times 10^6/\text{ml}$, $\pm 100\%$ des Fallwertes betragen, also einem Fall mit $0,8 \times 10^6/\text{ml}$ wurde somit beispielsweise eine Kontrolle zwischen 0,0 und $1,6 \times 10^6/\text{ml}$ zugeordnet; Fällen mit Spermienkonzentrationen von 1 bis $5 \times 10^6/\text{ml}$ wurden Kontrollen $\pm 50\%$ des Fallwertes zugeordnet, also beispielsweise einem Fall mit $3 \times 10^6/\text{ml}$ eine Kontrolle zwischen 1,5 und $4,5 \times 10^6/\text{ml}$ zugeordnet; Fällen zwischen 5 und $50 \times 10^6/\text{ml}$ wurden Kontrollen mit Werten $\pm 10\%$ des Fallwertes zugeordnet; $\pm 15\%$ des Fallwertes wurde Kontrollen von Fällen mit Werten zwischen 50 und $100 \times 10^6/\text{ml}$ zugeordnet; $\pm 20\%$ des Fallwertes bei Fällen mit Werten über $100 \times 10^6/\text{ml}$.

Diese Verteilung korreliert stark zu dem Verteilungskoeffizienten in der Spermienkonzentration der gesamten in Androbase von 1976-2007 gesammelten Patientenkohorte (über 18.000 Patienten). Kein Spermienkonzentrationsbereich wurde für Azoospermie sowie für Patienten mit Werten unter $0,1 \times 10^6/\text{ml}$ vergeben. Die

Kontrollpersonen wurden über Vergabe von Zufallsnummern aus allen verfügbaren Patienten mit kompletten klinischen Akten ausgewählt

Da Patienten mit Hodenhochstand ebenfalls an anderen Erkrankungen wie Varikozelen, Infektionen, Torsionen etc. leiden können, welche einen negativen Einfluss auf endokrinologische und klinische Parameter ausüben, wurde eine weitere Kontrollgruppe erhoben. Diese Gruppe (n=271; gesunde Kontrolle) konsultierte das Institut ebenfalls im Rahmen der Kinderwunschprechstunde, besaß jedoch keinerlei andrologischen Symptome bei normalen Ejakulatparametern nach den jeweils gültigen WHO Richtlinien (44).

Alle Patienten gaben nach Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur genetischen Analyse der von ihnen entnommenen Blutproben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Münster genehmigt und wird unter der Ethikvotumsnummer 4INie geführt.

2.2. Klinische Parameter

Alle Studienteilnehmer wurden einer vollständigen klinischen Untersuchung unterzogen. Die ultrasonographische Untersuchung des Skrotalinhaltes wurde mit einem 7,5 Mhz Konvexschallkopf (Ultrasound Scanner Type 2002 ADI, BK Medical, Gentofte, Dänemark) durchgeführt. Das Hodenvolumen wurde unter Zuhilfenahme der Ellipsoid-Methode berechnet (7).

Weiterhin wurde in einem Anamnesegespräch das Vorhandensein von Vorerkrankungen, besonders im Genitalbereich, Stoffwechselerkrankungen, Medikamenteneinnahme sowie Verletzungen und Infektionskrankheiten ermittelt. Weitere Anamnesedaten waren Zigaretten- und Alkoholkonsum, Umfang sportlicher Aktivitäten, einwirkende sonstige Noxen, Körpergewicht, Körpergröße und Body Mass Index (BMI).

Die Bestimmung der Spermioграмme erfolgte nach den gültigen Richtlinien der WHO(44).

Die Ermittlung der Spermienkonzentration erfolgte anhand unbeweglicher Spermatozoen in der Neubauer improved Zählkammer um eine Mehrfachzählung zu vermeiden. Hierzu wurde eine kleine Menge Ejakulat mit 10%iger NaCl-Lösung verdünnt. Bei normalwertigen Spermatozoenkonzentrationen erfolgte die Verdünnung in der Regel im Mischungsverhältnis 1:20, bei niedrigen Spermatozoenkonzentrationen musste eine geringere Verdünnung von 1:10 gewählt werden. Anschließend wurde ein Tropfen (10-20 μ l) des verdünnten Ejakulates in die Zählkammern gegeben und nach 5 Minuten im Phasenkontrastmikroskop bei 400facher Vergrößerung gezählt. Die ermittelte Spermienanzahl wurde nun durch das in die Zählkammer gegebene Ejakulatvolumen dividiert und in Millionen Spermatozoen pro Mililiter angegeben. Durch Multiplikation der so errechneten Spermienkonzentration mit dem Gesamtvolumen des Ejakulates wurde die Gesamtzahl an Spermien im Ejakulat ermittelt. Ein normalwertiges Spermogramm sollte eine Spermienkonzentration von 20×10^6 Spermatozoen/ml bzw eine Gesamtzahl von 40×10^6 Spermatozoen erreichen.

Die Bestimmung der Spermatozoenmotilität erfolgte auf einer Wärmeplatte bei 37°C. Es wurde ein definiertes Ejakulatvolumen von 10 μ l auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Hierdurch entstand ein gleichmäßiger Film von ca. 20 μ m Dicke der bei 400facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht wurde. Hierzu wurde die Vorwärtsbeweglichkeit von 2x100 Spermatozoen bestimmt und der Mittelwert errechnet. Je nach Vorwärtsbeweglichkeit erfolgte dann die Einteilung in schnell progressive Motilität, langsam progressive Motilität, nicht progressive Motilität oder Immotilität. Ein normalwertiges Spermogramm sollte mindestens 50 % schnell und langsam progressive bzw mindestens 25% schnell progressive Spermatozoen enthalten.

Die Beurteilung der Spermienmorphologie erfolgte mittels eines nach Papanicolau angefärbten Ejakulatausstriches unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 1000facher Vergrößerung. Hierbei wurden mindestens 100-200 Spermatozoen betrachtet. Morphologische Auffälligkeiten wurden nach Veränderungen des Spermatozoenkopfes, Mittelstückdefekten und Flagellumdefekten unterschieden. Die aktuellen WHO-Kriterien enthalten keinen gültigen Grenzwert für die Spermienmorphologie.(44)

Die Samenanalyse des Labors im Institut für Reproduktionsmedizin unterliegt einer konstanten internen und externen Qualitätskontrolle (QuaDeGA).

Die Bestimmung der Serumkonzentrationen von LH, FSH und SHBG erfolgte mittels Immunfluoreszierender Assays (Autodelphia, Perkin Elmer, Freiburg, Germany). Das Serumtestosteron wurde mittels eines kommerziell erworbenen Enzym Immuno Assay (DRG Instruments, Marburg, Deutschland) bestimmt. Der Gehalt an freiem Testosteron wurde aus dem Gesamt-Testosteron und der SHBG-Konzentration errechnet. Die Werte von Gesamt-LH und Gesamt-Testosteron wurden über Multiplikation in den Androgen Sensitivitäts Index (ADI) umgerechnet. Die externen Qualitätskontrollen für Hormonanalysen am IRM folgen der Deutschen Gesellschaft für Chemie e.V. Die Hormonassays unterstehen fortwährender interner Qualitätskontrolle.

2.3. DNA-Isolation und Analyse

2.3.1. Extraktion

Die DNA Extraktion erfolgte aus EDTA-Blutproben im Zentrallabor der Universitätsklinik mittels Biorobot EZ1 DSP (Qiagen, Düsseldorf, Germany).

2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion

Das zu untersuchende Exon 6a wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

Der Reaktionsansatz (50µl Gesamtvolumen) setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 5µl genomische DNA
- 1µl Exon 6a 150 fw Primer

- 1µl Exon 6a 150 rev Primer
- 2µl Desoxyribonukleotid Triphosphat 1mM (dNTP)
- 5µl Puffer 10x (20 nmol/l Tris-HCl (pH 8,3), 50 nmol/l KCl, 0,01 % Gelatine, 2 nmol/l MgCl₂, 0,2 mmol/l desoxy-NTPs)
- 0,4µl Taq-Polymerase (Promega Corp., Heidelberg, Deutschland)
- 25,6µl Aqua bidestillata (A.bidest.)

folgende Primer wurden verwandt:

Exon 6a 150 fw:

5'- CCG CTC CAG CCT GCC CTC CTC GGC CTC CCA AAG – 3'

Exon 6a 150 rev:

5'- CGC GGA TCC CTT TAT AAG CAG CCG GTA GAG CTG – 3'

Die PCR wurde im Robocycler Gradient 96 (Stratagene, Cedar Creek, Texas, USA) durchgeführt. Nach initialer Inkubation bei 94 °C über 2 min erfolgte in 35 PCR-Zyklen die Denaturierung bei 94°C für 50 Sekunden, Annealing bei 65°C über 50 Sekunden und Extension bei 72°C für 90 Sekunden. Der letzte Extensionsschritt betrug 10 Minuten mit anschließender Abkühlungsphase von 10 Minuten bei 6°C.

2.3.3. Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Das Prinzip der Gelelektrophorese ist die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld. Die durch ihre Phosphatgruppen negativ geladene DNA wandert von der Kathode zur Anode. Dabei besitzen unterschiedliche DNA-Fragmente abhängig von Größe und Ladung verschiedene Wanderungseigenschaften. Das Agarosegel besitzt zudem eine maschenartige Struktur, welche durch den Gehalt an Agarose in ihrer Größe beeinflussbar ist. Daher wird die Zusammensetzung des Gels auf das PCR Produkt abgestimmt.

Um eine optimale Wanderungsmatrix für das hergestellte Fragment von ca. 300 bp zu erzeugen, wurde ein 1,5 %iges Agarosegel gegossen.

Dafür wurden 50 ml 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) bestehend aus 40 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure-Na₂-Salz, 40 mM Essigsäure mit 0,75 g Agarose versetzt und solange aufgeköcht, bis die Agarose komplett gelöst war. Nach Abkühlen der Lösung wurde ca. 5 µl Ethidiumbromid beigemischt. Die Lösung wurde nun in ein mit Kamm versehenes Gelelektrophoresebett gegeben. Der Kamm wurde nach Aushärtung des Gels entfernt, und das Gel in eine Gelelektrophoresekammer (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit 1x TAE-Puffer gegeben. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit 6x Orange-G-Dye (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzt und zusammen mit einem Marker und einer Leerprobe (A.bidest) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-110 Volt (Spannungsquelle NBS Koch Light). Um die Banden nach der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, wurde das Gel mit UV-Licht der Wellenlänge 312nm bestrahlt (Geldokumentationsgerät MultiImage Light Cabinet, Alpha Innotech, Randburg, South Africa)). Das Ethidiumbromid wird hierdurch angeregt und strahlt bei Übergang in einen niedrigeren Energiezustand orangefarbenes Licht ab. Die Banden im Gel können somit detektiert werden.

Produkte mit diffuser Bandenausprägung wurden mit einem sterilen Skalpell unter einer UV-Lampe aus einem erneut hergestellten Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des High Pure PCR Produkt Purification Kits (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Produkte mit starker Bandenfärbung im Bereich um 300 bp konnten direkt aufgereinigt werden.

2.3.4. Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Sanger beruht auf der Kettenabbruchmethode. Hierbei werden mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Didesoxynukleosidtriphosphate eingesetzt, welche keine 3'-OH-Gruppe besitzen. Dadurch entstehen bei der Amplifikation Fragmente verschiedener Länge. Diese Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt.

Beim Austreten aus der Kapillare kann so durch die verschiedenen Fluoreszenzsignale der vier Farbstoffe die Basensequenz ermittelt werden.

Der Ansatz zur Sequenzierung (Gesamtvolumen 10µl) setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 1µl Big Dye 3.1 (Applied Biosystems, Darmstadt)
- 2µl Sequencing Buffer (5x) (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- 1,5µl Primer (1pmol)
- 1µl DNA
- 4,5µl A.bidest

Die Reaktion erfolgte in 96-Well Platten mittels Robocycler Gradient 96 (Stratagene, Cedar Creek, Texas, USA). Zunächst wurde der Ansatz bei 96°C für 4 Minuten inkubiert. Danach folgten 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 96°C für 20 Sekunden, Annealing bei 50°C für 10 Sekunden und Extension bei 60°C für 2 Minuten. Dann wurden die Proben bei 6°C für 10 Minuten heruntergekühlt.

Abschließend erfolgte die Sequenzierung der Proben im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster mit Hilfe des ABI 3730 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programmes Sequencher 4.0 (Gene Codes Corporation Inc., Ann Arbor, MI, USA) auf mögliche Mutationen untersucht und die SNP's in Androbase notiert.

2.3.5. Real-time PCR

Die Kontrollen der gesunden Probanden (n=271) und der gematchten Patienten (n=277) wurden mittels Allelic Discrimination und Real Time PCR auf die Verteilung der SNP's untersucht.

Hierbei wird während der PCR-Reaktion mittels über den Reaktionsgefäßen befindlichen optischen Fasern die Signalstärke fluoreszierender Sonden gemessen. Diese spezifischen Sonden lagern sich während der Reaktion an die komplementäre Zielsequenz der cDNA an. Dabei liegt ihre Zielsequenz zwischen den Bindungsstellen des reverse und forward Primers. Die Sonden sind zudem an beiden Enden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. VIC und FAM) bestückt. Der Farbstoff am 5'Ende nennt sich „reporter“, seine Fluoreszenz wird durch den am 3'Ende befindlichen „quencher“ unterdrückt. Trennt nun die Taq-Polymerase im Zuge der Elongation die Sonde vom komplementären Fragment ab, wird die Sonde dadurch zerteilt. Dies führt zu einer deutlich erhöhten Fluoreszenzintensität des reporters. Diese Fluoreszenz kann bereits während der Reaktion gemessen werden. Gibt man nun zwei, zu dem jeweiligen Allel komplementäre Sonden mit jeweils spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen in die Reaktion, sind drei Reaktionsmöglichkeiten vorhanden. Wenn beide Sonden binden ist die Farbintensität beider Fluorochrome ähnlich und von einem Heterozygoten SNP auszugehen. Bindet jedoch nur eine Sonde, ist die Fluoreszenz eines Farbstoffes hervorgehoben und der SNP ist homozygot auf das jeweilige Allel.

Für die Reaktion (20 µl Gesamtvolumen) wurden folgende Komponenten pipettiert:

- 0,5 µl Taq Man Universal Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- 0,5 µl Assay-Mix (40x) bestehend aus den Primern und den jeweiligen Sonden (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- 4,5 µl A.bidest.
- 5 µl DNA

folgende Primer mit entsprechenden Sonden (Kleinbuchstaben markieren die SNP Position) wurden verwandt:

SNP c.599A>G (S196N) (rs 4637173)

LHR 6A 196 fw:

5'-GGCAATAAAGGAGCTCACCTTAAA-3'

LHR 6A 196 rev:

5'CTCTTCTTTTGCTTCACATCTATCTCTTCA-3'

LHR 6A 196 (VIC-markiert):

5'-TTCCAATCCaTGTTTTTC-3'

LHR 6A 196 (FAM-markiert):

5'-CAATCCgTGTTTTTC-3'

SNP c.653A>G (S117N) (rs 4490239)

LHR 6A 241-117 fw:

5'-GGATTGGAATGACTCTGAAATGAAGAGA-3'

LHR 6A 241-117 rev:

5'-GCACCAAGGATACCAATTTTTAGAAATCCA-3'

LHR 6A 241-117 (VIC-markiert):

5'-AAAAGAAGAGATCaTCTCAG-3'

LHR 6A 241-117 (FAM-markiert):

5'-AAAAGAAGAGATCgTCTCAG-3'

SNP c.748T>G (S212N) (bisher keine Datenbanknummer vergeben)

LHR 6A 334-212 fw:

5'-GGTGCACCTTTGTATAGTACTT-3'

LHR 6A 334-212 rev:

5'-TGGTCACAGCTTTGTAACATGACAA-3'

LHR 6A 334-212 (VIC-markiert):

5'-TTGTGTAGATGTAAtTTTA-3'

LHR 6A 334-212 (FAM-markiert):

5'-TTTGTGTAGATGTAAgTTTA-3'

Die PCR und Allelic Discrimination erfolgte mittels ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Das Temperaturprofil für die PCR-Reaktion setzte sich folgendermaßen zusammen: Zunächst Anlagerung der Sonden bei 50°C für eine Minute, dann Denaturierung bei 95°C über 15 Minuten und schließlich 35 Zyklen von 95°C für 15 Sekunden gefolgt von 60°C über 1 Minute. Die Allelic Discrimination erfolgte bei 60°C über 1 Minute.

2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der klinischen Daten wurde mit den Programmen GraphPadPrism version 5.00 für Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) oder mit Statistical Program for the Social Sciences (SPSS INC., Version 14.0, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Häufigkeitsverteilungen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test untereinander verglichen. Hormonwerte und Samenparameter der Maldescensusgruppe und der beiden Kontrollen wurden als median und range untereinander per parameterfreiem Mann-Whitney-Test verglichen. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

Alle genetischen Analysen wurden mit Stata/SE (StataCorp LP, version 9.1, College Station, TX, USA) unter Verwendung spezifischer genetischer Unterprogramme durchgeführt: die Verteilung des Hardy Weinberg Gleichgewichtes wurde mittels HWSNP getestet. Unterschiede in der Allelhäufigkeit zwischen Fällen und Kontrollen wurden mittels GENCC analysiert. QTLsNP kam zum Vergleich von Merkmalen zwischen verschiedenen Genotypen zur Anwendung. Dieses Vorgehen unterstellt ein kodominantes genetisches Modell um sowohl auf additive, als auch auf multiplikative Effekte testen zu können. Es ist jedoch ebenso möglich, unter Verwendung dieser Methoden auf dominante und rezessive Modelle zu testen.

Die Haplotypen-Analyse sowie die LD Determination wurden mit Haploview 3.32 durchgeführt. Das Programm PHASE Version 2.1 kam zur Bestimmung individueller Haplotypen zum Einsatz.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten

Der Vergleich der Häufigkeitsverteilungen der klinischen Diagnosen von Patienten mit Maldescensus testis und gematchten Kontrollen (Tabelle 1a) zeigt keinen signifikanten Unterschied beider Gruppen. Dies bestätigt die angewandten Kriterien zur Auswahl einer gematchten Kontrollgruppe, da diese sich von den Fällen wie gewünscht nur im Fehlen von Maldescensus testis unterscheidet.

Tabelle 1a: *Klinische Diagnosen (in Prozentangabe des Gesamtkollektivs, signifikante Werte $p \leq 0,05$ sind fettgedruckt)*

	Maldescensus (n = 278)	gematchte Kontrollen (n = 277)	gesunde Kontrollen (n = 271)	P^a
Diagnosen				
Maldescensus (aktuell/Zustand nach)	100 % (278)	0 % (0)	0 % (0)	<0.001 / nd
Varikozele (aktuell/Zustand nach)	10.8 % (30)	11.6 % (32)	0 % (0)	0.776 / nd
Infektionen (aktuell/Zustand nach)	7.9 % (22)	6.9 % (19)	0 % (0)	0.635 / nd
endokrine Erkrankungen (zB Schilddrüse, Nebenniere)	3.6 % (10)	2.9 % (8)	0 % (0)	0.637 / nd
Metabolische Erkrankungen (zB Diabetes)	10.1 % (28)	13 % (36)	0 % (0)	0.281 / nd
Chronische Erkrankungen (zB Asthma, Bluthochdruck)	5 % (14)	4 % (11)	0 % (0)	0.545 / nd

Der Vergleich der anthropometrischen Daten ist in Tabelle 1b dargestellt und zeigt einige Auffälligkeiten

Tabelle 1b: klinische Daten der 3 untersuchten Gruppen [median (range)] signifikante Werte $p \leq 0,05$ sind fettgedruckt

	Maldescensus (n = 278)	gematchte Kontrollen (n = 277)	gesunde Kontrollen (n = 271)	P^a
Diagnosen				
Alter [y]	33 (17 - 48)	33 (18 - 58)	34 (20 - 53)	0.374 / <0.001
Größe [cm]	183 (161 - 203)	182 (158 - 204)	181 (157 - 202)	0.041 / 0.033
Gewicht [kg]	85 (47 - 160)	86 (59 - 160)	84 (51 - 138)	0.858 / 0.045
BMI [kg/m²]	25.6 (17.7 - 45.3)	26.2 (17.7 - 44.8)	25.4 (17.4 - 42.3)	0.132 / 0.201
Hodenvolumen [Gesamtvolumen in ml]	31 (3 - 116)	39 (6 - 96)	52 (21 - 109)	<0.001 / <0.001
LH [U/l]	4.7 (0.6 - 45.4)	3.7 (0.9 - 20.9)	3.0 (0.8 - 8.1)	<0.001 / <0.001
FSH [U/l]	10.2 (0.9 - 86.2)	5.75 (1.1 - 67.4)	3.3 (0.6 - 19.8)	<0.001 / <0.001
Testosteron [nmol/l]	14.4 (0.9 - 40.6)	14.4 (2.8 - 35.3)	14.8 (5.5 - 35.4)	0.553 / 0.219
ASI^b	69.2 (8.0 - 721.9)	56.4 (8.1 - 336.0)	44.7 (7.1 - 173.5)	<0.001 / <0.001
LH/Testosterone Ratio [U/nmol]	0.32 (0.04 - 21.67)	0.27 (0.05 - 1.97)	0.20 (0.05 - 0.91)	<0.01 / <0.001
SHBG [nmol/l]	31 (7 - 281)	31 (10 - 81)	32 (8 - 86)	0.922 / 0.477
freies Testosteron [pmol/l]	294 (13 - 1183)	299 (69 - 735)	308 (137 - 850)	0.836 / 0.111
Prolaktin [mU/l]	186 (58 - 1470)	178 (2 - 2200)	193 (54 - 791)	0.440 / 0.399
Estradiol [pmol/l]	65 (12 - 125)	64 (13 - 264)	65 (15 - 164)	0.063 / 0.817
PSA [µg/l]	0.6 (0.2 - 2.4)	0.6 (0.2 - 3.3)	0.6 (0.2 - 2.4)	0.993 / 0.833

Tabelle 1b: klinische Daten der 3 untersuchten Gruppen [median (range)] signifikante Werte $p \leq 0,05$ sind fettgedruckt

	Maldescensus (n = 278)	gematchte Kontrollen (n = 277)	gesunde Kontrollen (n = 271)	<i>P</i>^a
Diagnosen				
Azoospermie	94 (33.8 %)	96 (34.7 %)		0.883 / nd
mit < 0.1x10⁶/ml	23 (8.3 %)	23 (8.3 %)		0.991 / nd
mit >= 0.1x10⁶/ml	151 (54.3 %)	158 (57.0 %)	271 (100.0 %)	0.730 / <0.001
sexuelle Abstinenz [d]	4 (2 - 28)	4 (1 - 14)	4 (1 - 14)	0.002 / <0.001
Samenkonzentration [10⁶/ml]	4.4 (0.1 - 180)	5.0 (0.1 - 189)	51.5 (20 - 313)	0.531 / <0.001
Samenvolumen [ml]	3.8 (0.7 - 12.5)	3.7 (0.8 - 10)	3.4 (0.5 - 12)	0.353 / 0.008
Totale Spermienzahl [10⁶]	16 (0.1 - 649)	15 (0.2 - 567)	180 (24 - 1872)	0.580 / <0.001
a+b Motilität [%]	42 (1 - 76)	42.5 (0 - 66)	51 (23 - 75)	0.755 / <0.001
normale Morphologie [%]	10 (0 - 60)	8 (0 - 37)	16 (4 - 39)	0.559 / <0.001

Maldescensus-Patienten zeigen im Vergleich sowohl zu gematchten als auch gesunden Kontrollen eine leicht höhere Körpergröße (1,83m vs. 1,82m/1,81m).

Weiterhin ist das Gesamthodenvolumen der Männer mit Maldescensus testis mit durchschnittlich 31 ml deutlich vermindert. Der Vergleich mit den Kontrollgruppen zeigt, dass nicht nur die gesunde Kontrolle mit durchschnittlich 52 ml signifikant über dem Wert der Patienten mit Maldescensus liegt, sondern ebenso die gematchte Kontrollgruppe mit einem Median von 39 ml ein deutlich höheres Gesamthodenvolumen besitzt.

Damit assoziiert ist der signifikant erhöhte Spiegel an follikel-stimulierendem Hormon (FSH) bei Patienten mit Hodenhochstand. Dieser liegt mit 10,2 U/l deutlich über den Werten der Kontrollgruppen von 5,75 (gematchte Gruppe) 3,3 (gesunde Gruppe). Auffällig ist ebenso der signifikant erhöhte Spiegel des luteinisierenden Hormones (LH) von 4,7 U/l im Vergleich zu beiden Kontrollen.

Damit einhergehend zeigt sich sowohl der Androgen Sensitivitäts Index (ASI= Produkt aus LH und Testosteron) als auch die LH/Testosteron Ratio der Maldescensus-Patienten deutlich über dem Wert der Kontrollen.

Da der Spiegel an freiem und Serum-Testosteron der Maldescensus-Patienten sich nicht signifikant von den Kontrollgruppen unterscheidet, ist anzunehmen, dass die erhöhte Ausschüttung an LH zur Aufrechterhaltung des normalwertigen Testosteronspiegels notwendig ist.

Wie bereits in anderen Studien bestätigt, zeigt sich auch in unseren Untersuchungen eine im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe hochsignifikant verminderte Samenqualität und -quantität der Hodenhochstand-Patienten.

3.2. Genetische Analysen

3.2.1. Mutationsscreening

Die Mutationsanalyse zeigte keine Mutationen auf Exon 6a bei Patienten mit Maldescensus testis.

3.2.2. Assoziationsstudie

Alle untersuchten Allele von Exon 6a befinden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE).

Tabelle 2 zeigt die Allelhäufigkeit und die Genotypverteilung der 3 SNP's in den drei untersuchten Gruppen.

Tabelle 2: Allelfrequenz in den 3 untersuchten Gruppen

	Maldezensus (n = 278)	gematchte Kontrollen (n = 277)	gesunde Kontrollen (n = 271)	P
196 Exon 6a (HW- Test)	0.134	0.385	0,126	
C Frequenz	17.1 % (95)	16.8 % (92)	20.0 % (108)	0.917 / 0.214
T Frequenz	82.9 % (461)	83.2 % (454)	80.0 % (432)	
CC	4,3 % (12)	3,6 % (10)	5,5 % (15)	
CT	25,5 % (71)	26 % (72)	28,8 % (78)	
TT	70,1 % (195)	69 % (191)	65,3 % (177)	
CC + CT / TT				0.963 / 0.250
CC / CT + TT				0.965 / 0.502
241 Exon 6a (HW- Test)	0.134	0.177	0.125	
A Frequenz	82.9 % (461)	84.1 % (466)	80.1 % (434)	0.291 / 0.226
G Frequenz	17.1 % (95)	15.9 % (88)	19.9 % (108)	
AA	70,1 % (195)	71,8 % (199)	65,7 % (178)	
AG	25,5 % (71)	24,5 % (68)	28,8 % (78)	
GG	4,3 % (12)	3,6 % (10)	5,5 % (15)	
AA + AG / GG				0.670 / 0.509
AA / AG + GG				0.660 / 0.263
334 Exon 6a (HW- Test)	1.000	0.696	0.359	
G Frequenz	37.8 % (210)	36.1 % (200)	36.5 % (198)	0.565 / 0.671
T Frequenz	62.2 % (346)	63.9 % (354)	63.5 % (344)	
GG	14,4 % (40)	12,3 % (34)	14,8 % (40)	
GT	46,8 % (130)	47,7 % (132)	43,5 % (118)	
TT	38,8 % (108)	40,1 % (111)	41,7 % (113)	
GG + GT / TT				0.768 / 0.496
GG / GT + TT				0.464 / 0.902

Die Analyse der MAF's (minor allele frequencies) zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

Bei Anwendung des Chi-Quadrat-Tests sind keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf eine dominante oder rezessive Analyse der Allele feststellbar.

Die Analyse der Allelkombinationen zeigt in allen untersuchten Gruppen lediglich das Vorkommen von 3 Haplotypen: TAT, TAG, CGT. (Tabelle 3)

Tabelle 3

Die Haplotypenverteilung in den 3 untersuchten Gruppen (berücksichtigt wurde nur eine Häufigkeit über 1%)

Haplotyp Exon 6a	Maldescensus (n = 278)	gematchte Kontrollen (n = 277)	gesunde Kontrollen (n = 271)	P
TAT	45,1 %	47,3 %	43,3 %	0,467 / 0,546
TAG	37,8 %	35,8 %	36,7 %	0,507 / 0,706
CGT	17,1 %	15,9 %	20,0 %	0,590 / 0,215

Die Haplotypenverteilung zwischen den untersuchten Gruppen unterscheidet sich nicht signifikant und zeigt somit keine Assoziation zu Maldescensus Testis.

3.2.3. Korrelation der SNP's zu klinischen Parametern

Die Untersuchung auf den Zusammenhang einzelner SNP's zu quantitativen Eigenschaften von hormonellen Parametern zeigt Auffälligkeiten.

So kann eine Korrelation einzelner SNP's mit dem Spiegel an LH sowie dem ASI nachgewiesen werden. (Tabelle 4)

Tabelle 4

Analyse einzelner SNP's (QTLSNP, kodominantes Modell, additiver Effekt)

die Assoziation von SNP und LH, Testosteron, ASI kann für $p \leq 0,05$ (fettgedruckt) angenommen werden

	Maldescensus (n = 278)	gematchte Kontrollen (n = 277)	gesunde Kontrollen (n = 271)
LH [U/l]			
196 exon 6a	0.113	0.050	0.447
241 exon 6a	0.113	0.047	0.440
334 exon 6a	0.853	0.086	0.100
Testosteron [nmol/l]			
196 exon 6a	0.414	0.269	0.684
241 exon 6a	0.414	0.316	0.685
334 exon 6a	0.555	0.286	0.808
Androgen Sensitivity Index (ASI)			
196 exon 6a	0.032	0.030	0.560
241 exon 6a	0.032	0.036	0.555
334 exon 6a	0.845	0.354	0.359

Ein Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel kann für keine der untersuchten Gruppen und für keinen der untersuchten Haplotypen gefunden werden.

Ein erhöhter LH-Spiegel ist in der gematchten Kontrollgruppe signifikant mit dem Vorhandensein der SNPs 196 und 241 in Verbindung zu bringen. Kein Zusammenhang ist zwischen LH-Wert und SNP 341 zu ziehen.

Eine deutlich statistisch signifikante Beziehung ist zwischen Androgen Sensitivitäts Index (ASI) und den SNP's 196 sowie 241 zu finden: Hier ist sowohl in der Gruppe mit Maldescensus testis als auch bei den gematchten Kontrollen ein signifikanter Zusammenhang zum ASI ersichtlich. Diese Korrelation kann nicht in der gesunden Kontrollgruppe beobachtet werden.

Wieder kann keine signifikante Verbindung von SNP 341 zu erhöhtem ASI aller Gruppen gezogen werden.

Auf Grund des mehrfach fehlenden signifikantem Einfluss von SNP 341, kann in den weiteren Überlegungen von einer niedrigen Relevanz dieses SNP's in Bezug auf klinische Parameter ausgegangen werden.

3.2.4. Haplotypen-Analyse

In der Haplotypenanalyse werden auf Grund der niedrigen Signifikanz im Bezug auf SNP 341 die Haplotypen TAT und TAG unter TA(N) zusammengefasst und als ein Haplotyp analysiert. Es bleiben somit nur die Allele CGT und TA(N). (Tabelle 5)

Tabelle 5

Haplotyp Analyse (QTLSNP, kodominantes Model, additiver Effekt) - Assoziation von Haplotyp und LH, Testosteron, ASI bei $p \leq 0,05$

	Maldeszensus (n = 278)	gematchte Kontrollen (n = 277)	gesunde Kontrollen (n = 271)
LH [U/l]			
CGT/CGT vs. other	0.114	0.054	0.343
Testosteron [nmol/l]			
CGT/CGT vs. other	0.383	0.234	0.846
Androgen Sensitivity Index (ASI)			
CGT/CGT vs. other	0.034	0.034	0.561

Der Vergleich des homozygoten Polymorphismus-Haplotypen CGT/CGT mit den anderen Haplotypen (CGT/TA(N), TA(N)/TA(N)) im kodominanten Modell zeigt eine deutliche Korrelation zwischen dem Haplotyp CGT und erhöhtem ASI in beiden infertilen Gruppen ($p = 0,034$).

In der gematchten Kontrollgruppe verfehlt der Haplotyp CGT/CGT nur knapp die Signifikanzgrenze (0,054 bei $p < 0,05$) zu einer Korrelation mit LH.

In der gesunden Kontrollgruppe kann kein Zusammenhang in Bezug auf alle drei Parameter erkannt werden.

Es wird deutlich, dass der Polymorphismus-Haplotyp nur in den beiden infertilen Untersuchungsgruppen einen Einfluss auf klinische Werte hat.

Untersucht man beide infertilen Gruppen und vergleicht homozygote Träger aller drei Polymorphismen (CGT/CGT) mit Trägern der anderen Haplotypen, ergibt sich folgender Zusammenhang: (Tabelle 6)

Tabelle 6

Vergleich von LH, Testosteron und ASI zwischen Patienten mit CGT/CGT Genotyp und allen anderen Genotypen

	infertile Patienten (n = 555)
LH [U/l]	
CGT/CGT (n=22) vs. andere	7.4 (1.7 - 29.5) vs. 5.3 (0.6 - 45.4) 0.017
Testosteron [nmol/l]	
CGT/CGT (n=22) vs. andere	16.6 (8.0 - 32.0) vs. 14.9 (1.0 - 41.0) 0.146
Androgen Sensitivitäts Index (ASI)	
CGT/CGT (n=22) vs. andere	123.4 (21.9 - 690) vs. 78.6 (8.0 - 721) 0.003

Demnach zeigt der Haplotyp CGT/CGT in der Gruppe infertiler Patienten einen deutlich positiven Einfluss auf LH-Spiegel und ASI. Der LH-Wert der CGT/CGT Gruppe liegt mit median 7,4 U/l deutlich über dem Wert der anderen Genotypen mit etwa 5,3 U/l.

Ähnliches gilt für den ASI, der bei Patienten mit homozygoter Form aller drei Polymorphismen mit 123,4 erheblich über dem Wert der anderen Haplotypen mit 78,6 liegt.

Der Testosteronwert der CGT/CGT-Gruppe zeigt sich im Vergleich mit 16,6 nmol/l zu 14,9 nmol/l ebenfalls leicht erhöht, ist jedoch mit p=0,146 nicht statistisch signifikant.

Somit zeigt sich eine hochsignifikante Korrelation des homozygoten SNP Genotypes CGT/CGT mit erhöhten hormonalen Parametern LH-Spiegel und ASI bei infertilen männlichen Patienten mit und ohne Maldescensus testis. Dieser Zusammenhang kann nicht bei gesunden Männern beobachtet werden.

Kein Haplotyp der SNP's auf Exon 6a kann jedoch ausschließlich mit Maldescensus testis in Verbindung gebracht werden.

4. Diskussion

Der Grad der testikulären Schädigung und damit auch der Gonadotropinspiegel ist bei Patienten mit Maldescensus testis deutlich höher als bei infertilen Männern ohne Hodenhochstand.

Dieses Phänomen kann bereits im Säuglingsalter mit deutlich erhöhten Gonadotropin-Spiegeln beobachtet werden (38) und besteht offensichtlich auch im Erwachsenenalter weiter. So konnten wir auch in unserer Studie einen signifikant höheren LH,- und FSH Spiegel der Männer mit uni- oder bilateralem Maldescensus im Vergleich zu infertilen und gesunden Männern ohne Maldescensus nachweisen.

Diese Erkenntnis deckt sich mit den Untersuchungen von Lee et al. (2001) und de Gouveia Brazao et al (2003). Sie zeigten, dass Maldescensus-Patienten im Gegensatz zu gesunden und infertilen Männern, neben erhöhten Gonadotropin-Spiegeln signifikant erniedrigte Inhibin B-Werte bei normal hohen Testosteronspiegeln aufweisen (13, 24). Inhibin B ist gemeinsam mit FSH ein sensitiver Marker für die Spermatogenese und Sertoli-Zell-Funktion (43).

Ähnliche Ergebnisse zeigen Studien an Frauen mit inaktivierenden Mutationen des LHCGR. Der Östrogen-, und Progesteronspiegel der Betroffenen ist bis auf einen fehlenden Peak im mittleren Zyklusdrittel im Normalbereich. Auffällig ist der, bei Mutationsträgerinnen jedoch stark erhöhte LH-Spiegel bei leicht erhöhten FSH-Werten (3) .

In Zusammenschau mit diesen Daten legt unsere Studie eine primäre testikuläre Schädigung, wahrscheinlich auf Leydig-Zell-Ebene, im Zusammenhang mit Maldescensus testis nahe.

Ebenso konnten auch wir keine signifikante Abweichung des Testosteronspiegels von Männern mit Maldescensus im Vergleich zur infertilen und auch zur gesunden Kontrollgruppe feststellen.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die an Kindern aufgestellte These der Kompensation einer Leydig-Zellen-Dysfunktion über erhöhte LH-Spiegel (38) auch auf erwachsene Männer übertragbar ist.

Wir überlegten daher, inwiefern Varianten des LHCGR die zu einer sinkenden Gonadotropin-Sensitivität führen, im Zusammenhang mit Maldescensus stehen können. In vorangegangenen Studien wurden bereits ähnliche Überlegungen zu dem insLQ-Polymorphismus auf Exon 1 und dem N291S- Polymorphismus auf Exon 10 durchgeführt. Basis waren Studien, die eine erhöhte Aktivität des LHCGR mit insLQ-Polymorphismus und N291S-Polymorphismus im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor zeigten (30-32). Dabei konnte, wie bereits in 1.4. dargestellt ein bei untersuchten Brustkrebspatientinnen signifikant jüngeres Erkrankungsalter bei deutlich schlechterem Outcome ursächlich mit den Polymorphismen in Verbindung gebracht werden.

Eine daraufhin durchgeführte Untersuchung unserer Maldescensus-Kohorte und einer gematchten infertilen sowie einer gesunden Kontrollgruppe konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen milder Leydigzell-Dysfunktion bei Maldescensus Testis und 291 Ser –Polymorphismus und 312 Asn-Polymorphismus bzw. auf Exon 10 nachweisen (36).

In Untersuchungen des Instituts für Reproduktionsmedizin der Universität Münster konnte die Existenz eines bisher unbekanntes, primatenspezifischen Exons, welches zwischen den bisher bekannten Exons 6 und 7 gelegen ist, nachgewiesen werden (22). Der bisher bekannte LHCGR ist somit Ergebnis eines Spleißvorgangs bei dem Exon 6a aus der mRNA entfernt wird. Nach Kossack sind die nicht gespleißten Rezeptorprodukte mit Exon 6a von zentraler Rolle in der Rezeptorregulation und Hormonwirkung. Darauf aufbauend untersuchten wir den Zusammenhang der drei auf Exon 6a bekannten Polymorphismen mit der postulierten Leydig-Zell-Dysfunktion bzw LH-Insensibilität bei Maldescensus testis.

In unseren Untersuchungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der MAFs (minor allele frequencies) aller drei SNPs zwischen Maldescensus-Patienten,

gematchter infertiler Kontrollgruppe und gesunder Kontrollgruppe. Im Chi-Quadrat-Test ließen sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf eine dominante oder rezessive Analyse der Allele feststellen. Es zeigte sich jedoch, dass in der Maldescensus-Gruppe und in der infertilen, gematchten Kontrollgruppe Träger der Polymorphismen 196 Exon 6a und 241 Exon 6a eine signifikante Korrelation zu erhöhtem Androgen-Sensitivitäts-Index aufwiesen. Diese Tendenz konnte man für beide Gruppen ebenfalls im Bezug auf erhöhten LH-Spiegel erkennen, verfehlte in der Maldescensus-Kohorte mit 0,113 jedoch knapp die Signifikanzgrenze von 0,05. Dieser Zusammenhang war nicht für die gesunde Kontrollgruppe zu finden. Es zeigte sich weiterhin, dass der dritte untersuchte Polymorphismus keinerlei Einfluss auf die klinischen Parameter der drei Gruppen zu haben schien. Daher konnte er in den weiteren Überlegungen vernachlässigt werden.

Männer mit homozygotem Polymorphismus-Haplotyp CGT/CGT zeigten im kodominanten Modell in beiden infertilen Gruppen im Vergleich zu den anderen Haplotypen noch deutlicher signifikante Assoziation zu erhöhtem ASI. Wieder war dieser Zusammenhang nicht in der gesunden Kontrollgruppe nachzuweisen, allerdings auch nicht spezifisch für die Maldescensus-Gruppe.

Innerhalb der infertilen Gruppe (Männer mit Maldescensus testis und gematchte infertile Männer) zeigten die Homozygoten Polymorphismus-Träger einen signifikant höheren LH- Wert und auch ASI als die Heterozygoten bzw. nicht-Allelträger. Diese Beobachtung konnte wieder nicht für gesunde Männer getroffen werden, hier scheint das Vorliegen der Polymorphismen keinen Einfluss auf die Gonadotropinwerte oder den ASI zu haben.

Die Wirkung von Veränderungen im LHCGR bzw. luteinisierendem Hormon, die durch SNPs hervorgerufen werden können, wird gegenwärtig intensiv untersucht. So konnte die Nähe des 291NS-Polymorphismus auf Exon 10 zu einer Glykosilierungsstelle demonstriert werden. Hierbei wird 291S (Ser) im Gegensatz zu N291 (Asn) nicht glykosiliert, was zu einer leicht erhöhten Rezeptoraktivität führt (29)(34). Diese Veränderung scheint zu Fertilitätsvorteilen und damit einhergehend zu natürlicher

Selektion zu führen, denn die Verteilung von N291S befindet sich in der kaukasischen Bevölkerung nicht mehr im Hardy-Weinberg-Equilibrium (36). Ähnliches konnte für den insLQ-Polymorphismus auf Exon 1 festgestellt werden, dessen Insertionsstelle in einer hydrophoben Region des Signalpeptids gelegen ist und dadurch den Transport des Rezeptorproteins zum endoplasmatischen Retikulum beeinflusst (31). Die dadurch veränderte Konformation des Proteins beeinflusst die Bindungsaktivität des Rezeptors positiv (31). Interessant ist hierbei die Assoziation zu Brustkrebs. So konnte kein gehäuftes Auftreten des insLQ-Allels bei Brustkrebserkrankten im Vergleich zur Allelverteilung bei gesunden Frauen festgestellt werden (32). Allerdings scheint das insLQ-Allel mit einem jüngeren Erkrankungsalter und aggressiveren Tumorformen bei bereits Erkrankten in Verbindung zu stehen. Hier ist eine interessante Parallele zu unseren Studienergebnissen zu ziehen:

Die drei SNPs sind in allen drei Kollektiven gleich verteilt, das heißt es gibt keinen direkten Zusammenhang zwischen Verteilung der Polymorphismen und Maldescensus oder Fertilität.

Allerdings haben in beiden infertilen Gruppen 196 Exon 6a und 241 Exon 6a negativen Einfluß auf LH-Wert und ASI. Dies zeigt sich besonders, wenn die SNPs in homozygoter Form vorliegen. Das heißt, ähnlich wie nur brustkrebserkrankte Frauen in Erkrankungsalter und Outcome negativ von insLQ-Polymorphismus beeinflusst werden, sind nur infertile Männer negativ von 196 exon 6a und 241 exon 6a beeinflusst.

Es ist also zu überlegen, dass die beiden SNPs zu kleinen strukturellen Veränderungen des LHCGR führen, die mit leichten Eigenschaftsveränderungen desselbigen einhergehen. Diese Veränderung scheint jedoch bei gesunden Männern nicht ausreichend, um einen Effekt auf den Hormonstatus haben zu können. Bei Männern mit bereits gestörtem Hormonstatus, beispielsweise Patienten mit Maldescensus, kann diese Veränderung möglicherweise die LH-Desensibilität des LHCGR soweit verstärken, dass der LH-Wert signifikant ansteigt. Hier zeigt sich eine Parallele zu insLQ-Trägerinnen, die zwar nicht häufiger an Brustkrebs erkranken, aber deutlich aggressivere Tumoren im Erkrankungsfall entwickeln.

Interessant in dieser Hinsicht ist auch, dass infertile homozygote Träger aller drei SNPs deutlich höhere LH-Werte entwickeln als heterozygote Träger. Dies spricht ebenfalls für einen Einfluss der Polymorphismen auf die Rezeptoraktivität oder Rezeptorexpressivität.

Einschränkend muss gesagt werden, dass nur 22 infertile Studienteilnehmer Träger des homozygoten Polymorphismus-Haplotyps CGT/CGT sind und somit die Aussagekraft dieser These auf Grund dieses relativ kleinen Untersuchungskollektives möglicherweise beschränkt ist.

Weiterhin wurden die Männer mit Maldescensus testis im Rahmen unserer Fertilitätssprechstunde rekrutiert. Das heißt, es wurde eine Selektion infertiler Maldescensus-Patienten, also besonders schwerwiegender Maldescensus-Fälle vorgenommen.

Eine weitere interessante Entdeckung unserer Studie ist die im Gegensatz zu beiden Kontrollgruppen, höhere Körpergröße der Männer mit Maldescensus testis in Verbindung mit der bei diesen Männern verschobenen LH/Testosteron Ratio. Wir vermuten, dass die bei diesen Männern vorliegende, auf leichter LH-Resistenz beruhende Androgeninsuffizienz, neben dem unvollständigen Descensus der Hoden auch an dem erhöhten Körperwachstum beteiligt sein könnte.

Zusammenfassend konnte unsere Studie keine Assoziation von Maldescensus testis mit einem spezifischen LHCGR-Genotyp bezüglich der Polymorphismen auf Exon 6a feststellen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die primäre testikuläre Schädigung bei Männern mit Maldescensus von einem erhöhten LH-Spiegel begleitet ist, der vermutlich nötig ist um einen normalen Testosteronspiegel zu halten.

Interessanterweise stellte sich jedoch heraus, dass bei infertilen Männern zwei der drei untersuchten Polymorphismen zu deutlichen Veränderungen des LH-Spiegels und des ASI führen. Besonders deutlich zeigt sich dieser Effekt bei Männern mit homozygotem Vorliegen beider Polymorphismen. Diese Beobachtung ist nicht spezifisch für Maldescensus-testis sondern scheint im Allgemeinen mit Infertilität im Zusammenhang zu stehen. Der LHCGR scheint somit durchaus einem modulierenden Einfluss durch

SNPs zu unterliegen. Die dadurch hervorgerufene verminderte LH-Sensibilität des Rezeptors scheint jedoch nur bei bereits gestörtem Hormonstatus einen messbaren Effekt in der Hypothalamus-Hypophysen-Achse hervorzurufen. In weiteren Studien sollte die genaue Funktion des Exon 6a in der Rezeptorregulation beleuchtet werden und die beiden Polymorphismen in ihrer Wirkung auf die Translation oder Prozessierung des Rezeptorproteins untersucht werden. Zudem sollte untersucht werden, inwiefern Mutationen oder Polymorphismen in Enzymen der Steroidgenese oder im Androgenrezeptor mit Maldescensus testis in Verbindung stehen. Die Kausalität der SNPs im Bezug auf die Infertilität sollte ebenfalls weiter untersucht werden.

5. Literatur

1. Adham IM, Agoulnik AI. Insulin-like 3 signalling in testicular descent. *Int J Androl.* 2004 Oct;27(5):257-65.
2. Andersson AM, Toppari J, Haavisto AM, Petersen JH, Simell T, Simell O, Skakkebaek NE. Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: Peak of inhibin B levels in infant boys exceeds levels in adult men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Feb;83(2):675-81.
3. Arnhold IJ, Lofrano-Porto A, Latronico AC. Inactivating mutations of luteinizing hormone beta-subunit or luteinizing hormone receptor cause oligo-amenorrhea and infertility in women. *Horm Res.* 2009;71(2):75-82.
4. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev.* 2002 Apr;23(2):141-74.
5. Barteczko KJ, Jacob MI. The testicular descent in human. origin, development and fate of the gubernaculum hunteri, processus vaginalis peritonei, and gonadal ligaments. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2000;156:III,X, 1-98.
6. Behre HM, Kliesch S, Nieschlag E. VII Männliche Gonaden In: Allolio B, Schulte HM, editors. *Praktische Endokrinologie.* 1.th ed. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg; 1996; p. 351-420.

7. Behre HM, Nashan D, Nieschlag E. Objective measurement of testicular volume by ultrasonography: Evaluation of the technique and comparison with orchidometer estimates. *Int J Androl.* 1989 Dec;12(6):395-403.

8. Boehmer AL, Brinkmann O, Bruggenwirth H, van Assendelft C, Otten BJ, Verleun-Mooijman MC, Niermeijer MF, Brunner HG, Rouwe CW, Waelkens JJ, Oostdijk W, Kleijer WJ, van der Kwast TH, de Vroede MA, Drop SL. Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sep;86(9):4151-60.

9. Boisen KA, Kaleva M, Main KM, Virtanen HE, Haavisto AM, Schmidt IM, Chellakooty M, Damgaard IN, Mau C, Reunanen M, Skakkebaek NE, Toppari J. Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two nordic countries. *Lancet.* 2004 Apr 17;363(9417):1264-9.

10. Braun T, Schofield PR, Sprengel R. Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J.* 1991 Jul;10(7):1885-90.

11. Coley WB. I. the treatment of the undescended or maldescended testis associated with inguinal hernia. *Ann Surg.* 1908 Sep;48(3):321-50.

12. Cortes D, Thorup JM, Visfeldt J. Cryptorchidism: Aspects of fertility and neoplasms. A study including data of 1,335 consecutive boys who underwent testicular biopsy simultaneously with surgery for cryptorchidism. *Horm Res.* 2001;55(1):21-7.
13. de Gouveia Brazao CA, Pierik FH, Erenpreiss Y, de Jong FH, Dohle GR, Weber RF. The effect of cryptorchidism on inhibin B in a subfertile population. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003 Jul;59(1):136-41.
14. Emmen JM, McLuskey A, Grootegoed JA, Brinkmann AO. Androgen action during male sex differentiation includes suppression of cranial suspensory ligament development. *Hum Reprod.* 1998 May;13(5):1272-80.
15. Fischer MC, Milen MT, Bloom DA. Thomas annandale and the first report of successful orchiopexy. *J Urol.* 2005 Jul;174(1):37-9.
16. Fowler R, Stephens FD. The role of testicular vascular anatomy in the salvage of high undescended testes. *Aust N Z J Surg.* 1959;22:92-106.
17. Hong S, Phang T, Ji I, Ji TH. The amino-terminal region of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor contacts both subunits of human choriogonadotropin. I. mutational analysis. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):13835-40.

18. Huhtaniemi IT, Korenbrot CC, Jaffe RB. HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977 May;44(5):963-7.
19. Hutson JM, Hasthorpe S. Abnormalities of testicular descent. *Cell Tissue Res.* 2005 Oct;322(1):155-8.
20. Kaleva M, Virtanen H, Haavisto AM, Main K, Skakkebaek NE, Huhtaniemi I, Irjala K, Toppari J. Does variant luteinizing hormone (V-LH) predispose to improper testicular position in late pregnancy? *Pediatr Res.* 2005 Sep;58(3):447-50.
21. Katzenstein M. Eine neue operation zur heilung der ectopia testis congenita. *Dtsch Med Wschr.* 1902;28:937-8.
22. Kossack N, Simoni M, Richter-Unruh A, Themmen AP, Gromoll J. Mutations in a novel, cryptic exon of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene cause male pseudohermaphroditism. *PLoS Med.* 2008 Apr 22;5(4):e88.
23. Lamminen T, Huhtaniemi I. A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. *Eur J Pharmacol.* 2001 Feb 23;414(1):1-7.

24. Lee PA, Coughlin MT, Bellinger MF. Inhibin B: Comparison with indexes of fertility among formerly cryptorchid and control men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2576-84.
25. Meyer T, Hocht B. Historical development of the surgical treatment of the undescended testicle. *Zentralbl Chir.* 2003 Jun;128(6):537-42.
26. Moore, KL, Vidhya, T, Persaud, N. *Embryologie*. 5.Auflage ed. Viebahn C, translator; München: Urban&Fischer; 2007.
27. Nieschlag E, Behre HM, editors. *Andrology: Male reproductive health and dysfunction*. Heidelberg: Springer; 2000 (.
28. Pettersson K, Ding YQ, Huhtaniemi I. An immunologically anomalous luteinizing hormone variant in a healthy woman. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Jan;74(1):164-71.
29. Piersma D, Verhoef-Post M, Berns EM, Themmen AP. LH receptor gene mutations and polymorphisms: An overview. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Jan 2;260-262:282-6.
30. Piersma D, Verhoef-Post M, Look MP, Uitterlinden AG, Pols HA, Berns EM, Themmen AP. Polymorphic variations in exon 10 of the luteinizing hormone receptor: Functional consequences and associations with breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Sep 30;276(1-2):63-70.

31. Piersma D, Berns EM, Verhoef-Post M, Uitterlinden AG, Braakman I, Pols HA, Themmen AP. A common polymorphism renders the luteinizing hormone receptor protein more active by improving signal peptide function and predicts adverse outcome in breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Apr;91(4):1470-6.
32. Powell BL, Piersma D, Kevenaar ME, van Staveren IL, Themmen AP, Iacopetta BJ, Berns EM. Luteinizing hormone signaling and breast cancer: Polymorphisms and age of onset. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Apr;88(4):1653-7.
33. Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, Matfin G, de Zoysa PA, Azcona C, MacColl GS, Jacobs HS, Conway GS, Besser M, Stanhope RG, Bouloux PM. Idiopathic gonadotrophin deficiency: Genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001 Aug;55(2):163-74.
34. Richter-Unruh A, Martens JW, Verhoef-Post M, Wessels HT, Kors WA, Sinnecker GH, Boehmer A, Drop SL, Toledo SP, Brunner HG, Themmen AP. Leydig cell hypoplasia: Cases with new mutations, new polymorphisms and cases without mutations in the luteinizing hormone receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002 Jan;56(1):103-12.
35. Segaloff DL, Ascoli M. The lutropin/choriogonadotropin receptor ... 4 years later. *Endocr Rev.* 1993 Jun;14(3):324-47.

36. Simoni M, Tuttelmann F, Michel C, Bockenfeld Y, Nieschlag E, Gromoll J. Polymorphisms of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene: Association with maldescended testes and male infertility. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 Mar;18(3):193-200.
37. Sonneland SG. Congenital perineal testicle. *Ann Surg*. 1924 Nov;80(5):716-27.
38. Suomi AM, Main KM, Kaleva M, Schmidt IM, Chellakooty M, Virtanen HE, Boisen KA, Damgaard IN, Kai CM, Skakkebaek NE, Toppari J. Hormonal changes in 3-month-old cryptorchid boys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Mar;91(3):953-8.
39. Taran I, Elder JS. Results of orchiopexy for the undescended testis. *World J Urol*. 2006 Aug;24(3):231-9.
40. van der Schoot P, Emmen JM. Development, structure and function of the cranial suspensory ligaments of the mammalian gonads in a cross-species perspective; their possible role in effecting disturbed testicular descent. *Hum Reprod Update*. 1996 Sep-Oct;2(5):399-418.
41. Virtanen HE, Bjercknes R, Cortes D, Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E, Thorsson AV, Thorup J, Main KM. Cryptorchidism: Classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatr*. 2007 May;96(5):611-6.

42. Virtanen HE, Cortes D, Rajpert-De Meyts E, Ritzen EM, Nordenskjold A, Skakkebaek NE, Toppari J. Development and descent of the testis in relation to cryptorchidism. *Acta Paediatr.* 2007 May;96(5):622-7.
43. von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, Nieschlag E. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Jul;84(7):2496-501.
44. WHO. Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. 4.Auflage ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1999.
45. Winter JS, Faiman C, Hobson WC, Prasad AV, Reyes FI. Pituitary-gonadal relations in infancy. I. patterns of serum gonadotropin concentrations from birth to four years of age in man and chimpanzee. *J Clin Endocrinol Metab.* 1975 Apr;40(4):545-51.
46. Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF, Engel W, Adham IM. Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol.* 1999 May;13(5):681-91.

6. Lebenslauf

7. Danksagung

Herr Prof. Dr. Michael Zitzmann sowie Frau Prof. Dr. Manuela Simoni möchte ich für die freundliche Überlassung der Thematik und die Möglichkeit der Bearbeitung danken.

Ebenso danke ich Herr Dr.med. Frank Tüttelmann der mich im klinischen Teil dieser Arbeit maßgeblich unterstützte und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt Nicole Terwort und Sabine Borchert, die mich durch ihre konstruktive und kritische Anleitung und fachliche Beratung stets hilfreich und sehr freundlich unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets ermutigten und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich mich auch bei Herr Prof. Dr.med. Eberhard Nieschlag bedanken, der durch seine jahrzehntelange Forschung das Institut für Reproduktionsmedizin aufgebaut und international bekannt gemacht hat und somit den Grundstein für diese und viele weitere Arbeiten legte.

Danke